

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

Everton Allan Ferreira

Caracterização química e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* do extrato hexânico e óxido de baccharis obtidos das raízes de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)

Juiz de Fora
2019

Everton Allan Ferreira

Caracterização química e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* do extrato hexânico e óleo de baccharis obtidos das raízes de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos naturais bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

**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)

Ferreira, Everton Allan.

Caracterização química e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica in vivo do extrato hexânico e óxido de baccharis obtidos das raízes de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) / Everton Allan Ferreira. -- 2019.

97 p.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

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

1. *Baccharis dracunculifolia*. 2. óxido de baccharis. 3. inflamação. 4. anti-inflamatório. 5. produtos naturais. I. Alves da Silva Filho, Ademar, orient. II. Título.

"Caracterização química e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* do extrato hexânico e óxido de baccharis obtidos das raízes de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae)"

Everton Allan Ferreira

ORIENTADOR: Ademar Alves da Silva Filho

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 30/07/2019

Thaíse Gonçalves de Araújo
(Universidade Federal de Uberlândia – UFU)

Rodrigo Luiz Fabri
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Ademar Alves da Silva Filho
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida, minha família e amigos. Por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, por permitir também que tudo acontecesse ao longo dessa caminhada, não somente nestes anos como universitário, mas também em todos os momentos, Ele sim é o maior Mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Agradeço a minha mãe Maria Aparecida dos Santos Ferreira, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai Renato Augusto Ferreira Filho que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e que para mim foi muito importante. Obrigado meu irmão, que nos momentos de minha ausência dedicados aos estudos sempre fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente! Obrigado! Primos e tias pela contribuição valiosa. Obrigado a minha avó que sempre esteve de prontidão a qualquer necessidade de ajuda. Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Ao Grupo NIPPAN pelo companheirismo e disposição para cada momento de dificuldade onde precisei de cada um, em especial ao Lucas Sales Queiroz, amigo que com seu bom humor tornou mais fácil passar por tantas dificuldades encontradas no decorrer deste trabalho, desejo a você muito sucesso! Lívia Mara Silva, companheira das manhãs e tardes no laboratório e das aulas de monitoria, sempre me incentivando e ajudando a fazer o melhor, te desejo grandes conquistas, pois você merece. Lorena Rodrigues Riani, por compartilhar comigo todo o conhecimento e experiência nas atividades laboratoriais. Lara Aleixo por compartilhar um pouco de sua experiência contribuindo com o desenvolvimento do trabalho, assim como aqueles que de alguma forma me auxiliaram a chegar onde estou. Aos alunos de iniciação científica, Ismael, Lauriene, Thalyta, Matheus, Mirela, Monique, Marcela, Igor, Renato, Beatriz pelo companheirismo e auxílio durante parte ou todo o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Ademar Alves Da Silva Filho, pela orientação, apoio e confiança. E também pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pelos conselhos e direcionamentos que foram muito importantes não só para o trabalho, mas para a vida.

Prof. Dr. Orlando Vieira de Souza, pelo empenho, dedicação e paciência ao guiar-me na execução de toda a parte experimental biológica deste trabalho, bem como Guilherme Cabral pela ajuda no decorrer dos experimentos.

À Profa. Dra. Thaíse Gonçalves de Araújo e ao Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri pelo paciente trabalho de revisão da redação. Aos suplentes da banca Profa. Dra. Elita Scio Fontes e Prof. Dr. Nicolas de Castro Campos Pinto que prontamente aceitaram o convite para participação, tenho certeza que vão engrandecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilson Macedo e equipe por contribuir sempre que possível em parceria para o enriquecimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto pela atenção e empenho para ajudar em todos os momentos.

Aos técnicos dos laboratórios de toda faculdade que me ajudaram direta e indiretamente, especialmente Jésus, Eder, Nívea, Paulo Dimas, Carol, Fáusia e João Pablo, aos secretários Árlem e Sulivam, da coordenação da pós-graduação pelo apoio e suporte.

À Faculdade de Farmácia pelo ambiente criativo e amigável que proporciona para o aprendizado, à direção e administração, aos seus funcionários pelo zelo e cuidado para que pudesse ter um ambiente propício para desenvolver minhas atividades, em especial obrigado à Nádia Severino, um exemplo de ser humano, que com seu café me resgatava o âmago a cada dia. À Universidade Federal de Juiz de Fora, ao seu corpo docente, que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presente.

Agradeço a todos os professores da faculdade de farmácia por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, não somente por terem me ensinado, mas também por serem exemplos dignos de pessoas e profissionais da área que escolhi seguir. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados, aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Agradeço ao CNPQ, a CAPES e a FAPEMIG (Processo PPM 00296-16) pela bolsa de Mestrado e suporte oferecido para a realização do presente trabalho. Muito obrigado!

*“Iniziare un nuovo cammino ci spaventa, ma dopo ogni passo
ci rendiamo conto di quanto fosse pericoloso rimanere fermi.”*

Roberto Benigni

RESUMO

Inflamação é um processo complexo que envolve diversos mecanismos, nos quais diferentes células recrutadas por quimiotaxia são as principais responsáveis por produzir mediadores que atuam na microcirculação do local afetado. Quando o processo inflamatório persiste, múltiplas vias induzem a inflamação aguda para o tipo crônico. Os produtos naturais têm sido estudados com objetivo de encontrar novos agentes com potencial anti-inflamatório de forma mais efetiva e menos tóxica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* do extrato hexânico e do triterpeno óxido de baccharis isolado das raízes da espécie *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae), bem como a caracterização química do extrato testado. Para isso, após a coleta das raízes, as mesmas foram secas, moídas e submetidas à maceração em hexano, produzindo o extrato bruto. O extrato foi submetido a técnicas cromatográficas, onde foi obtido 0,2 g de uma substância isolada, que através do RMN de ^{13}C e ^1H foi identificado como o triterpeno óxido de baccharis. A caracterização química do extrato hexânico por meio da análise em CG-EM evidenciou além do óxido de baccharis a presença de outros compostos, como o espatulenol, a friedelina e o friedelanol. Os ensaios anti-inflamatórios *in vivo* foram realizados em camundongos *Swiss* utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, fenol, capsaicina, histamina. Além desses ensaios foram realizadas avaliações das atividades das enzimas MPO e NAG, dosagem de NO e avaliação histopatológica das orelhas inflamadas. Os resultados obtidos sugerem que OBac possui atividade na via inflamatória envolvida com a ativação da PKC e FLA₂, enquanto o EHBd possui maior ação pela via inflamatória que envolve a oxidação. Tanto o extrato hexânico das raízes de *B. dracunculifolia* quanto o óxido de baccharis demonstraram atividade inibitória também na atividade de MPO e NAG, bem como no doseamento de NO. Assim, este trabalho demonstrou pela primeira vez para o extrato proveniente das raízes e o composto isolado seus potenciais anti-inflamatórios tópicos.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, óxido de baccharis, inflamação, anti-inflamatório, produtos naturais, triterpeno

ABSTRACT

Inflammation is a complex process involving different mechanisms, which different cells are recruited by chemotaxis and are responsible for producing mediators that act on the microcirculation of the affected site. When the inflammatory process persists, different mechanisms induce the chronic inflammation. Natural products have been studied in order to find new potential anti-inflammatory agents with more effectiveness and less toxicity. The aim of this work was to evaluate the *in vivo* anti-inflammatory activity of the hexane extract and baccharis oxide triterpene isolated from roots of the specie *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), as well as the chemical characterization of the extract tested. For this, after collection of the roots, they were dried, ground and subjected to maceration in hexane, producing the crude extract. The extract was subjected to chromatographic techniques, where 0.2 g of triterpene was obtained, which was identified as baccharis oxide through NMR of ^{13}C and ^1H . The chemical characterization of hexane extract by GC-MS analysis showed the presence of baccharis oxide in addition to other compounds such as spatulenol, friedelin and friedelanol. *In vivo* anti-inflammatory assays were performed on *Swiss* mice using the model of ear crotch, phenol, capsaicin, histamine-induced ear edema. Besides these assays were performed evaluations of the activities of the enzymes MPO and NAG, in addition the NO dosage and histopathological evaluation of the inflamed ears. The results showed that OBac has affinity for the inflammatory pathway involved with the activation of PKC and FLA₂, whereas EHBd has higher affinity for the inflammatory pathway involving oxidation. Both *B. dracunculifolia* hexane root extract and baccharis oxide showed inhibitory activity on MPO and NAG activity, as well as NO dosing. Therefore, this work showed for the first time that extract from the roots and the isolated compound its potential topical anti-inflammatory.

Key words: *Baccharis dracunculifolia*, baccharis oxide, inflammation, anti-inflammatory, natural products, triterpene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração representando a estrutura da pele.....	16
Figura 2: Representação de linhagens celulares provenientes da célula-tronco hematopoiética que atuam na inflamação.	21
Figura 3: Exemplos de substâncias naturais com atividade anti-inflamatória.	24
Figura 4: Tipos de esqueletos triterpênicos.....	25
Figura 5: Triterpenos avaliados em três modelos de atividade anti-inflamatória (Carragenina, EPP e TPA).....	27
Figura 6: Representação da estrutura dos triterpenos avaliados nos estudos.....	27
Figura 7: Abelha coletando resina na <i>Baccharis dracunculifolia</i>	30
Figura 8: Estruturas químicas de algumas substâncias encontradas nas raízes de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	33
Figura 9: Estrutura do óxido de Baccharis.....	34
Figura 10: Biossíntese simplificada do óxido de baccharis a partir do óxido de esqualeno ...	34
Figura 11: Foto ilustrativa do processo de maceração das raízes de <i>B. dracunculifolia</i> com hexano.....	37
Figura 12: Foto ilustrativa do CG-EM utilizado para as análises.....	38
Figura 13: Representação gráfica da programação da eluição utilizada na análise por CG-EM.	39
Figura 14: Foto ilustrativa do preparo do extrato e da coluna Cromatográfica Líquida a Vácuo.	40
Figura 15: Fluxograma da obtenção do extrato hexânico das raízes de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e isolamento do óxido de baccharis.....	42
Figura 16: Aspecto do extrato hexânico obtido das raízes de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EHBd).....	47
Figura 17: Representação matemática do cálculo do índice de Kovats.....	49
Figura 18: Cromatograma do EHBd.....	50
Figura 19: Espectro de massas do OBac gerado em espectro de massas sob energia de ionização de 70 eV.....	51
Figura 20: Compostos encontrados no EHBd por meio de CG-EM.....	52
Figura 21: Frações obtidas do EHBd por fracionamento cromatográfico em CLV.....	53
Figura 22: CCD das frações (A) e das subfrações obtidas da fração 2 (B).....	53
Figura 23: Aspecto cristalino do composto isolado.....	54
Figura 24: Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) do OBac.....	56
Figura 25: Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) do OBac.....	57

Figura 26: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por óleo de cróton.	59
Figura 27: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por fenol.....	62
Figura 28: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por capsaicina.	64
Figura 29: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por histamina.	67
Figura 30: Avaliação de atividade enzimática de MPO no tratamento tópico com EHBd e OBac nas orelhas inflamada dos camundongos induzidas por óleo de cróton.	69
Figura 31: Avaliação de atividade enzimática de NAG no tratamento tópico com EHBd e OBac nas orelhas inflamadas dos camundongos induzidas por óleo de cróton.....	71
Figura 32: Doseamento de NO no tratamento tópico com EHBd e OBac nas orelhas inflamada dos camundongos induzidas por óleo de cróton.	73
Figura 33: Fotomicrografia de cortes transversais das orelhas inflamadas (modelo de indução com óleo de cróton) após 24 h do tratamento (coloração hematoxilina e eosina a 100x).....	76
Figura 34: Fotomicrografia de campos de cortes transversais das orelhas inflamadas (modelo de indução com óleo de cróton) após 24 h do tratamento (coloração hematoxilina e eosina a 200x).	77
Figura 35: Inibição na formação de edema feita pela Dexametasona, EHBd e OBac avaliadas através das medidas de espessura, e inibição das atividades enzimáticas (MPO e NAG) e dosagem de NO na dose 0,1 mg/orelha.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frações obtidas na Cromatografia Líquida a Vácuo.	40
Tabela 2: Frações obtidas da coluna cromatográfica clássica com acetonitrila 100%.....	41
Tabela 3: Constituintes químicos do EHBd identificados pelo CG-EM.....	51
Tabela 4: Sinais obtidos no RMN de ^{13}C e ^1H de óxido de baccharis isolado de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e dados da literatura.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características do processo inflamatório agudo e crônico.....	19
Quadro 2: Alguns efeitos de triterpenos derivados de três núcleos diferentes.	28
Quadro 3: Atividades relatadas da <i>B. dracunculifolia</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
CC	Cromatografia Clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CEEA	Comissão e Ética na Experimentação Animal
CG-EM	Cromatógrafo de fase Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas
CGRP	Gene da Calcitonina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
COX	Ciclooxigenase
DCF	Dexclorfeniramina
DEX	Dexametasona
DMSO	Dimetil sulfóxido
EHBd	Extrato Hexânico das raízes de <i>Baccharis dracunculifolia</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EPP	Etilfenilpropiolato
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FLA ₂	Fosfolipase A 2
FR	Fração
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HTBA	Hexadeciltrimetilamônio
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
ICE	Instituto de Ciências Exatas
NOS-2	Isoforma 2 da Óxido Nítrico sintetase
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₂	Leucotrieno C ₂
NO	Óxido Nítrico
OBac	Óxido de Baccharis
OBS	Oxido de Baccharis Sintetase
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Proteína Quinase C
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFR	Subfração
SI	Similaridade
SP	Substância P
TMB	Tetrametilbenzidina
TMS	Tetrametilsilano
TPA	12-O-tetracanoilforbol-13-acetato
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	ESTRUTURA FISIOLÓGICA E FUNÇÃO DA PELE	16
1.2.	INFLAMAÇÃO	18
1.2.1.	Aspectos gerais da inflamação	18
1.2.2.	Manifestações celulares na inflamação	20
1.2.3.	Fármacos e substâncias naturais na inflamação	22
1.3.	TRITERPENOS	24
1.4.	<i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> D. C. (ASTERACEAE).....	29
1.4.1.	Composição química e atividades biológicas de extratos das raízes de <i>B. dracunculifolia</i>	30
2.	OBJETIVOS	36
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1.	OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS RAÍZES DE <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> (EHBD).....	37
3.2.	ANÁLISE DO EHBD POR CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	38
3.2.1.	Preparo da amostra	38
3.3.	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EHBD E ISOLAMENTO DO ÓXIDO DE BACCHARIS.....	39
3.3.1.	Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)	39
3.3.2.	Cromatografia em Coluna Clássica (CC)	41
3.4.	IDENTIFICAÇÃO DO OBAC	41
3.5.	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS TÓPICAS DO EHBD E OBAC.....	42
3.5.1.	Animais	42
3.5.2.	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton	43
3.5.3.	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol	43
3.5.4.	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina	44
3.5.5.	Edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica de histamina	44

3.5.6.	Determinação de atividade de mieloperoxidase (MPO) e <i>N</i> -acetil- β - <i>D</i> -glucosaminidase (NAG)	45
3.5.7.	Dosagem de Oxido Nítrico (NO)	46
3.5.8.	Análise histopatológica.....	46
3.5.9.	Análise estatística	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1.	OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS RAÍZES E FRACIONAMENTO	47
4.2.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EHBd POR CG-EM	48
4.3.	ISOLAMENTO DO ÓXIDO DE BACCHARIS	52
4.4.	ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS TÓPICAS DO EHBd E OBac	58
4.4.1.	Efeitos do EHBd e OBac no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton	58
4.4.2.	Efeitos do EHBd e OBac no modelo de edema induzido por fenol.....	61
4.4.3.	Efeito do EHBd e OBac no modelo de edema induzido por capsaicina	64
4.4.4.	Efeito do EHBd e OBac no modelo de edema induzido por histamina	66
4.4.5.	Influência do EHBd e OBac na atividade de MPO	68
4.4.6.	Influência dos EHBd e OBac na atividade de NAG	70
4.4.7.	Influência dos EHBd e OBac no doseamento de NO	72
4.4.8.	Análise histopatológica dos efeitos do EHBd e OBac.....	74
5.	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A - Protocolo CEUA	97

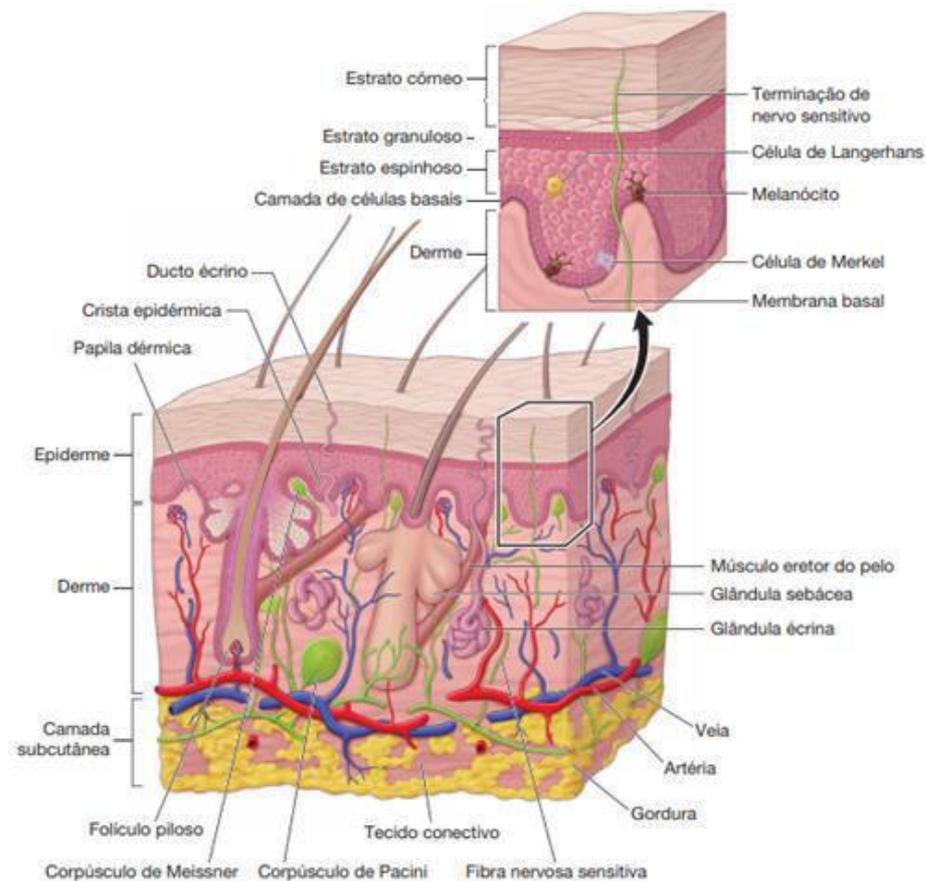
1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRUTURA FISIOLÓGICA E FUNÇÃO DA PELE

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e constitui aproximadamente um sexto do peso corporal total (Kanitaks, 2002). Além disso, é um órgão sofisticado e dinâmico que comunica o interior do corpo ao ambiente externo a sua volta, possuindo inúmeras funções que vão muito além desse papel (Monteiro-Riviere, 1997), incluindo as funções de barreira física, imunológica e proteção contra lesões por radiação ultravioleta, síntese de vitamina D, regulação térmica, entre outras (Kolarsick et al., 2011; Kanitaks, 2002; Haake et al., 2000; Monteiro-Riviere 1997).

Este órgão é comumente subdividido em três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A camada mais superficial (epiderme), embora amplamente variável, mede entre 50 mm e 100 mm de espessura (Rees, 2004), contendo principalmente queratinócitos, com populações menores de células de Langerhans e melanócitos (Kolarsick et al., 2011).

Figura 1: Ilustração representando a estrutura da pele.



Fonte: Adaptado de Farage e colaboradores (2007).

Epiderme é um sistema cuja atividade metabólica é amplamente regulada pela integridade da barreira de permeabilidade (Wickett and Visscher, 2006; Jackson et al., 1993), sendo responsável por manter o equilíbrio entre pele clinicamente normal e seca (McCallion e Li Wan Po, 1993). Esta função reside na camada mais externa da epiderme, o estrato córneo, um tecido dinâmico e metabolicamente interativo (Elias, 1996). Sua integridade depende de sua composição lipídica, principalmente de colesterol, ceramidas e ácidos graxos livres (Wickett and Visscher, 2006; Jackson et al., 1996). A pele é considerada clinicamente seca quando o conteúdo de umidade cai abaixo de 10 %, o estrato córneo se torna menos flexível e começa a rachar ou fissurar (McCallion e Li Wan Po, 1993). Essa desidratação pode resultar, por exemplo, em capacidade reduzida de inibir a entrada de microrganismos patogênicos (Jackson et al., 1993).

As principais células que constituem a epiderme são queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merckel (James et al., 2011; Koster e Roop, 2004; Freinkeil e Woodley, 2001). Os chamados queratinócitos (80-85 % da epiderme), são os responsáveis pela integridade da estrutura epidérmica, e também estão envolvidos na resposta imunológica do tecido cutâneo, uma vez que expressam diferentes citocinas, quimiocinas e também moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). No processo de diferenciação celular os queratinócitos passam a produzir a queratina, uma proteína resistente e impermeável que preenche as células mais superficiais da epiderme (corneócitos) e que promove força mecânica, mantêm a estrutura do queratinócito e contribui na adesão celular. As propriedades estruturais e funcionais dos queratinócitos presentes na epiderme de humanos e pequenos mamíferos são semelhantes (Farage et al., 2007; Chan, 2004).

Já os melanócitos que representam cerca de 10 a 13 % das células na camada basal (Brenner e Hearing, 2008), são responsáveis por produzir a melanina, uma substância polimérica que absorve na faixa de cor ultravioleta (UV) (Farage et al., 2007). As células de Langerhans (4 % da epiderme) estão localizadas nas camadas suprabasais da epiderme da pele e das mucosas, onde desempenham importante papel na reposta imune cutânea (Chan, 2004). Este tipo celular se movimenta na epiderme e possui receptores de membrana ligados ao processo imunológico (por exemplo, MHC-II, IgG e fator do complemento C3). Essas células fazem o reconhecimento, captação, processamento e apresentação de antígenos e haptenos à linfócitos tipo T. Em processos como a dermatite de contato e processos alérgicos verifica-se que esse tipo celular se torna mais evidente (Norris, 2004; Haake et al., 2000). Já as células de Merkel (que representam 1 % da epiderme) estão localizadas no estrato basal (Ross et al., 1993) e atuam como mecanorreceptores, além de contribuir no desenvolvimento do plexo nervoso na

porção superior da derme (Pasparakis et al., 2014; Wickett and Visscher, 2006; Haake et al., 2000).

A derme é uma camada composta predominantemente por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Brincat et al., 2005) (Figura 1), contudo, também contém fibras nervosas, receptores sensoriais, ácido hialurônico (responsável pelo turgor normal da derme devido à extraordinária capacidade de retenção de água) e glicosaminoglicanos (GAGs) de suporte (Brincat et al., 2005). A presença dos vasos sanguíneos na derme favorece a infiltração de células migratórias importantes do sistema de defesa do corpo, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, etc (Darlenski et al., 2011; Ryan, 2004).

Os diferentes tipos celulares coordenam uma interação muito bem sucedida nas camadas da pele, permitindo por exemplo, com que este órgão responda de maneira rápida e efetiva, a estímulos nocivos, como extremos de temperatura, ação de toxinas, radiação ultravioleta e organismos patogênicos, para proporcionar e garantir a manutenção da homeostasia cutânea (Burbach et al., 2000). Considerando todo esse aspecto de defesa, a pele vai muito além do que simplesmente uma barreira física entre o interior do corpo e o meio externo, sendo também uma extensão do sistema imunológico (Kupper e Fuhlbrigge, 2006; Williams e Kupper, 1996).

Já na hipoderme, a camada mais profunda da pele, encontram-se porções secretoras das glândulas, pelos, vasos e nervos e, as principais células que a constituem, os adipócitos (Koster e Roop, 2004; Kupper e Fuhlbrigge, 2004). Essa porção da pele é formada pelas camadas areolar e a lamelar (Guirro e Guirro, 2002). Sua função é de depósito nutritivo de reserva, isolamento térmico e proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos, além de facilitar a mobilidade da pele (Sampaio e Rivitti, 2001).

1.2. INFLAMAÇÃO

1.2.1. Aspectos gerais da inflamação

Funcionalmente, a inflamação é definida como um conjunto de respostas tissulares do organismo à estimulação por patógenos invasores ou sinais endógenos, como células danificadas, com o objetivo de eliminar a causa inicial da lesão, depurar células necróticas e reparar o tecido lesado (Serhan et al., 2007; Bhagwat et al., 1999). Classicamente, a inflamação pode ser caracterizada por 5 sinais, os quais são chamados de sinais cardinais da inflamação: dor, calor, tumor (inchaço), rubor (vermelhidão) e perda de função (Gautam et al., 2009). Todo

e qualquer estímulo capaz de iniciar um processo inflamatório desencadeia a ativação de uma gama de mediadores químicos, os quais terão suas atividades centradas principalmente sobre eventos vasculares e celulares (Tasaka, 2006). Estes mediadores são geralmente as quimiocinas, citocinas e substâncias derivadas do ácido araquidônico (Serhan et al., 2005), as quais tem maior relevância de acordo com o grau e tipo de inflamação, são os responsáveis pelo processo inflamatório agindo em células pró-inflamatórias por meio de receptores específicos (Luster et al., 2005).

As características gerais do processo inflamatório agudo e crônico estão resumidas no Quadro 1. A inflamação imediatamente após o estímulo se torna uma inflamação aguda, onde a persistência do estímulo pode levar ao processo crônico com aparecimento de doenças como artrite reumatoide e asma (Levy et al., 2014; Silverthorn, 2003).

Quadro 1: Características do processo inflamatório agudo e crônico.

	Inflamação	
	Aguda	Crônica
Agente	Patógenos orgânicos, radiação ionizante, agentes químicos, trauma mecânico	Persistência do estímulo inflamatório inicial, autoimune
Células	Neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos	Macrófagos, linfócitos, fibroblastos
Mediadores	Aminas vasoativas, eicosanoides, quimosinas, EROs	IFN- γ , citocinas, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas
Início	Imediato	Tardio
Duração	Poucos dias	Meses ou anos
Evolução	Cicatrização com restituição, formação de abscesso ou cronificação	Destruição tecidual e fibrose

Fonte: Adaptado de Cruvinel (2010).

As inflamações do tipo aguda evoluem a partir de uma fase vascular que se inicia imediatamente após o dano e envolve basicamente a microcirculação. Em condições normais, apenas uma fração dos capilares que compõem a rede tecidual ficam livres para passagem de substâncias (Cray et al., 2009). No entanto, quando ocorre uma agressão, surge também uma vasodilatação local e recrutamento da maioria dos capilares da rede, seguida de aumento da permeabilidade capilar. Inicialmente, saem do leito capilar eletrólitos e pequenas moléculas, constituindo o transudato e, posteriormente, saem moléculas maiores como albumina e fibrinogênio, constituindo o exsudato (Cruvinel et al., 2010). Com a saída de proteínas para o espaço extravascular também há a saída de água, que leva à marginalização dos leucócitos, os

quais passam a circular junto ao endotélio. O endotélio local então se torna ativado e os endoteliócitos passam a expressar moléculas de adesão em sua superfície, que colaboram para a maior aderência dos leucócitos e eventual migração destes para os tecidos (Ashley et al., 2012). Também são ativados componentes do sistema complemento, do sistema gerador de cininas e do sistema da coagulação. Células do sistema imune (macrófago) residentes no tecido lesado também liberam citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- α e quimiocinas, estimulando a inflamação (Cruvinel et al., 2010).

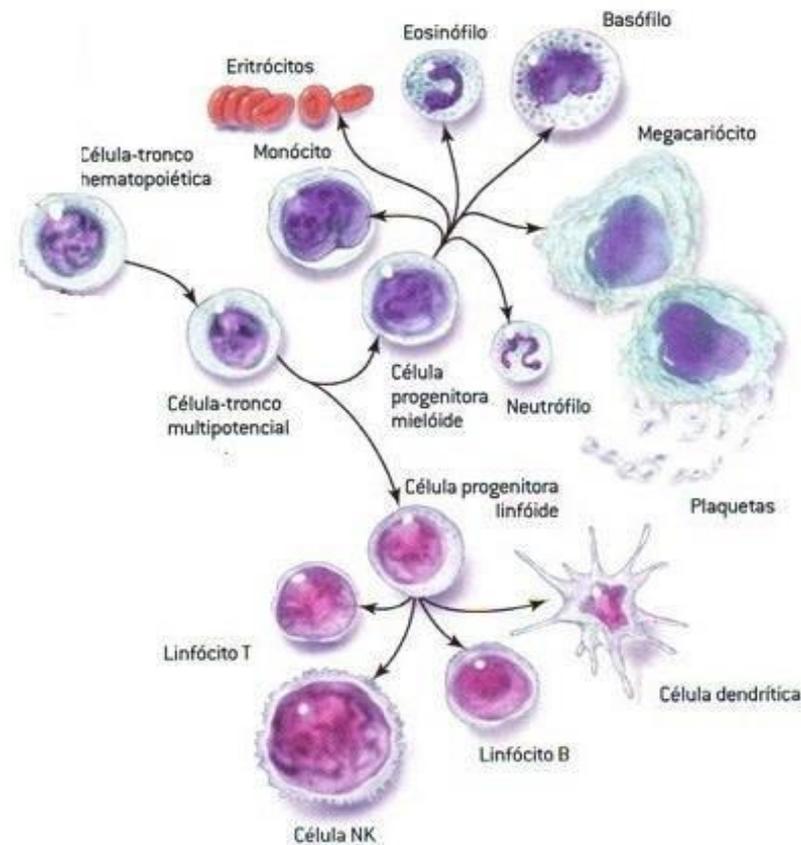
Na inflamação crônica da pele, a permanência do agente lesivo pode levar à persistência do processo inflamatório, o que pode levar a cronificação da inflamação, sendo observada nessa etapa a destruição tecidual, e conseqüentemente o aparecimento do sinal cardinal da perda de função (Cruvinel et al., 2010). Essa é uma fase caracterizada pelo longo período de duração que varia de acordo com os mediadores celulares e humorais envolvidos, levando, assim, ao aparecimento de enfermidades cutâneas (Tasaka, 2006). Essas doenças (dermatites, eczemas e psoríase) conferem um aspecto desagradável à pele, necessitando de tratamento prolongado. Comumente, os pacientes abandonam o tratamento, o que pode ocasionar o ressurgimento ou agravamento das lesões. Os mecanismos patogênicos das doenças inflamatórias cutâneas são distintos, a inflamação pode surgir a partir de um agente irritativo, uma lesão mecânica ou por meio de um processo alérgico, desse modo, não envolvem necessariamente o mesmo perfil e, como consequência, não possuem o mesmo tipo de tratamento (Firestein et al., 2004).

1.2.2. Manifestações celulares na inflamação

As principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória são originárias do sistema imune e, de forma geral, são classificadas como: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Freire e Van Dyke, 2013; Junqueira et al., 2004), e estão representadas na Figura 2.

O tipo de célula que predomina no local da inflamação varia de acordo com o estágio da lesão e do tipo de estímulo. Em geral, as primeiras células que chegam ao parênquima após a lesão são as polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), predominando os neutrófilos, os primeiros a chegar e, subseqüentemente, os macrófagos teciduais (Buckley et al., 2013).

Figura 2: Representação de linhagens celulares provenientes da célula-tronco hematopoiética que atuam na inflamação.



Fonte: Adaptado de Revista Scientific American edição especial Ciência e Saúde nº 3, 2006. Disponível em <<https://afh.bio.br/sistemas/cardiovascular/5.php>>.

Ao mesmo tempo em que as células envolvidas no processo inflamatório são diferentes quanto a morfologia, ao estímulo para ativação celular, ao tempo para liberação do mediador e ao conteúdo liberado, elas possuem características em comum quanto a presença de receptores, estocagem de enzimas hidrolíticas, capacidade de fagocitar, secretar e de gerar de metabólitos lipídicos do ácido araquidônico (Serhan et al., 2008; Alencar, 2007).

Por ser um processo fisiopatológico complexo, a inflamação é regulada por múltiplas vias de sinalização e requer a interação de diferentes tipos celulares que regem um amplo espectro de respostas, incluindo maturação e função das células imunes, bem como homeostase tecidual (Medzhitov, 2008). Em alguns casos, a resposta inflamatória pode ser exacerbada ou de forma inadequada nos tecidos do próprio organismo, podendo então produzir danos ao local em questão. Dentro deste contexto deve-se considerar estratégias para impedir que a inflamação se agrave e se torne um problema ainda maior. Assim, a utilização de substâncias anti-

inflamatórias é de vital importância para o controle do equilíbrio homeostático do tecido afetado pela inflamação (Freire e Van Dyke, 2013; Gilroy et al., 2004).

1.2.3. Fármacos e substâncias naturais na inflamação

Desde o início dos tempos a humanidade utiliza as plantas como uma fonte para curar afecções, doenças, dores, etc (Singh, 2015; Pan et al., 2014; Junior, Bolzani e Barreiro, 2006; Veiga Junior, Pinto e Maciel, 2005). Um dos processos mais comuns no corpo humano, porém incômodo em determinadas condições, e que afeta qualquer indivíduo, é a inflamação. Antigamente, sem se saber quais os mecanismos eram responsáveis para a melhoria do quadro inflamatório, os curandeiros usavam unguentos, emplastos ou infusões feitas com as folhas de *Myrtus communis* (murto) em doentes com dores, febre ou inchaço, porque sabiam que a planta tinha propriedades que diminuía a febre e a dor (Luengo, 2005). Nos Jogos Olímpicos da Antiguidade na Grécia os atletas que sofriam lesões musculares eram tratados com extratos vegetais, a fim de aliviar a dor e os inchaços (Leung et al., 2015). Com isso, em meio ao limitado conhecimento de sua época, Hipócrates (460 – 377 a.C.) observou que a casca de uma determinada árvore poderia ter fins medicamentosos anti-inflamatórios. Esta árvore, conhecida como salgueiro branco (*Salix alba*), foi caracterizada mais tarde por ser a fonte da primeira substância anti-inflamatória relatada (ácido salicílico) (Vane, 1971; Smith e Willis, 1971). Após muitos séculos, em 1828, Johann A. Buchner descobriu o princípio ativo responsável por tal atividade anti-inflamatória e a nomeou de “salicina” e, em 1838, o químico italiano Raffaele Piria conseguiu obter o ácido salicílico da salicina. Em 1874, a partir do ácido salicílico, o ácido acetilsalicílico foi sintetizado por Herman Kolbe na Alemanha, e em 1971, Vane e seus colaboradores identificaram o mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico pelo bloqueio das enzimas cicloxigenase (COX), mesmo que ainda não se falasse das duas isoformas dessa enzima (Vane, 1971).

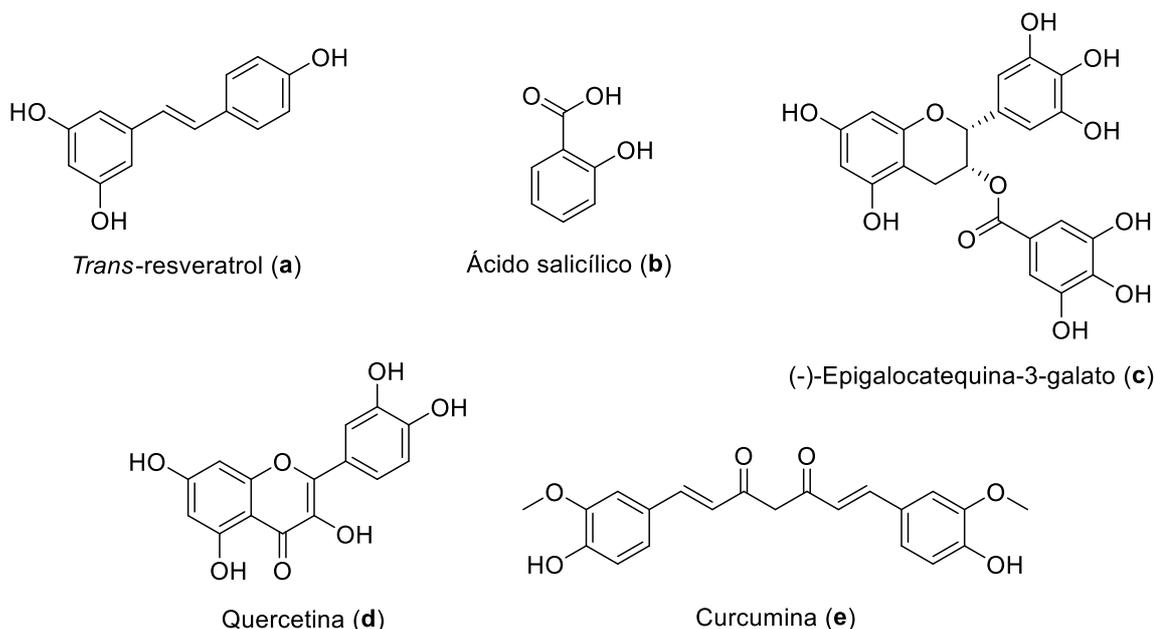
Na segunda metade do século XX, vários outros anti-inflamatórios foram desenvolvidos, como a antipirina, a fenacetina, a fenilbutazona, os fenamatos (ácido mefenâmico, ácido meclofenâmico), a indometacina, o naproxeno e os oxicans (Raz e Needleman, 1988). Além disso, foram descobertos fármacos com mecanismos diferentes da inibição da COX, como os corticoides, os quais se caracterizam por ter uma estrutura esteroidal, semelhante a hormônios endógenos, que agem em nível nuclear (Rhen e Cidlowski, 2005). Em 1952, a exploração do uso tópico desses esteroides iniciou-se, e para esta finalidade Sulzberger e Witten desenvolveram um protótipo de corticosteroide, denominado composto “F”, posteriormente

chamado de Hidrocortisona (Sulzberger e Witten, 1953). Então, em 1953, diversos projetos visando novos processos e estratégias de modificação molecular foram sendo desenvolvidas, gerando assim diversos outros fármacos corticosteroides, dentre eles a prednisolona, fluorohidrocortisona (1955), fluorometalona (1959), acetato de triancinolona (1960), fluorandrenolona (1961), dexametasona (1962) (Petrillo et al., 2017; Vandewalle, 2017) e, em 1969, foi publicada a síntese de um corticoide 1000 vezes mais potente que a cortisona, o clobetasol (Chatzidionysiou et al., 2017).

Devido sua diversidade de vias de atuação, os anti-inflamatórios podem atuar em muitas etapas dos processos inflamatórios. Podemos citar substâncias que bloqueiam a biossíntese de mediadores pró-inflamatórios por interação direta com uma enzima chave (por exemplo, inibição da COX-2) (Suleyman et al., 2007), a diminuição da expressão enzimática (por exemplo, compostos anti-inflamatórios esteroidais) (Barnes, 2006) e a redução dos níveis de substrato (por exemplo, diminuição da liberação de ácido araquidônico) (Ong et al., 2015). Além disso, um composto pode atuar inibindo a liberação de mediadores (por exemplo, inibição da liberação de histamina) (Criado et al., 2010), bloqueando a interação do receptor com mediador de células alvo (por exemplo, antagonistas do receptor de leucotrieno) (Lima et al., 2002), ou por imunossupressão, que resulta em uma resposta inflamatória menos agressiva a um agente alérgico por exemplo (Attur et al., 2000).

Fármacos frequentemente utilizados hoje (paracetamol, nimesulida, naproxeno e diclofenaco) possuem algumas limitações, devido aos efeitos adversos causados pelo uso contínuo e indiscriminado dessas substâncias que, em sua maioria, possuem elevada toxicidade hepática (Bittencourt, 2011). Neste contexto, os produtos naturais anti-inflamatórios têm sido estudados com intuito de reduzir os efeitos adversos causados pelos fármacos convencionais atualmente utilizados, bem como para melhorar o espectro de ação dos mesmos, já que a inflamação pode ser desencadeada por diferentes vias (Koeberle e Werz, 2014). O potencial dos produtos naturais da "medicina popular", com mecanismos de ação muitas vezes desconhecidos, mas com eficácia e segurança (pré) clínicas comprovadas, tem sido amplamente negligenciado (Harvey, 2008.). Vantagens e desvantagens são discutidas em relação aos recentes avanços na farmacologia molecular de produtos naturais anti-inflamatórios. Algumas das substâncias naturais com ação anti-inflamatória estão representadas abaixo na Figura 3 (Koeberle e Werz, 2014).

Figura 3: Exemplos de substâncias naturais com atividade anti-inflamatória.



Fonte: Adaptado de Koeberle e Werz, 2014.

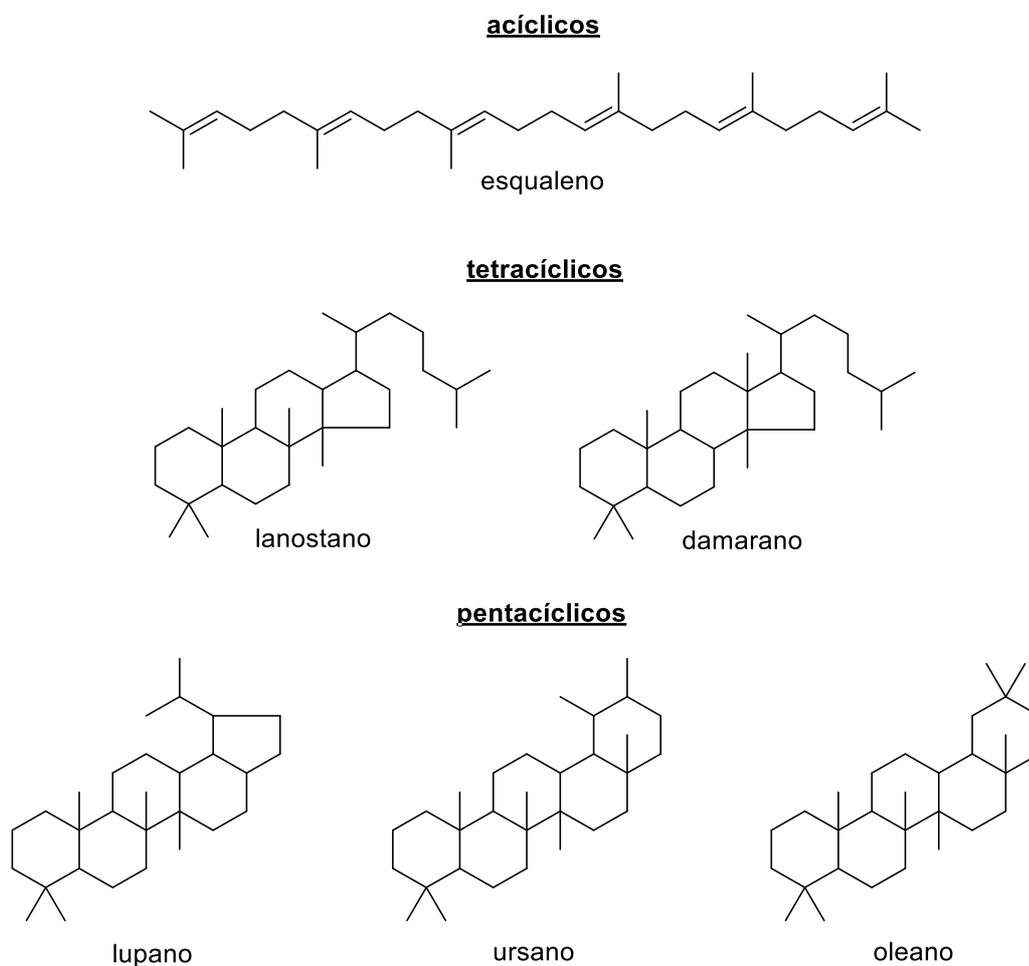
Dentre os produtos naturais que desempenham alguma atividade biológica estão presentes os terpenos, dos quais muitas estruturas pertencentes a esse grupo já foram estudadas e registradas com atividades anticâncer, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-hiperglicêmica, analgésica, anti-inflamatória e antiparasitária (Guimarães et al., 2014). Dentro desse conjunto de terpenos está a sua principal classe, os triterpenos, compostos muitas vezes relatados como bons agentes anti-inflamatórios (Sun et al., 2018; Jeong et al., 2014; Safayhi e Sailer, 1997; Ríos, 2000; Del Carmen Recio et al., 1995; Harborne e Baxter, 1993).

1.3. TRITERPENOS

Triterpenos compreendem um grande grupo de metabólitos secundários naturais com estruturas cíclicas relativamente complexas. São moléculas constituídas por trinta átomos de carbono (seis unidades de isopreno) e esqueleto carbônico em geral pode ser tetracíclico (comuns em animais) ou pentacíclico (comum em vegetais) com algumas exceções (Ríos, 2000). Esses anéis podem variar em sua estrutura entre 5 e 6 carbonos levando assim a classificação para cada tipo, como por exemplo, os pentacíclicos, ursanos, oleanos e lupanos (Patročka, 2003) (Figura 4).

Em muitos casos, os triterpenos extraídos das plantas são os princípios ativos responsáveis por efeitos anti-inflamatórios, além de efeitos antitumorais, antiproliferativos e anti-HIV (Sun et al., 2018).

Figura 4: Tipos de esqueletos triterpênicos.



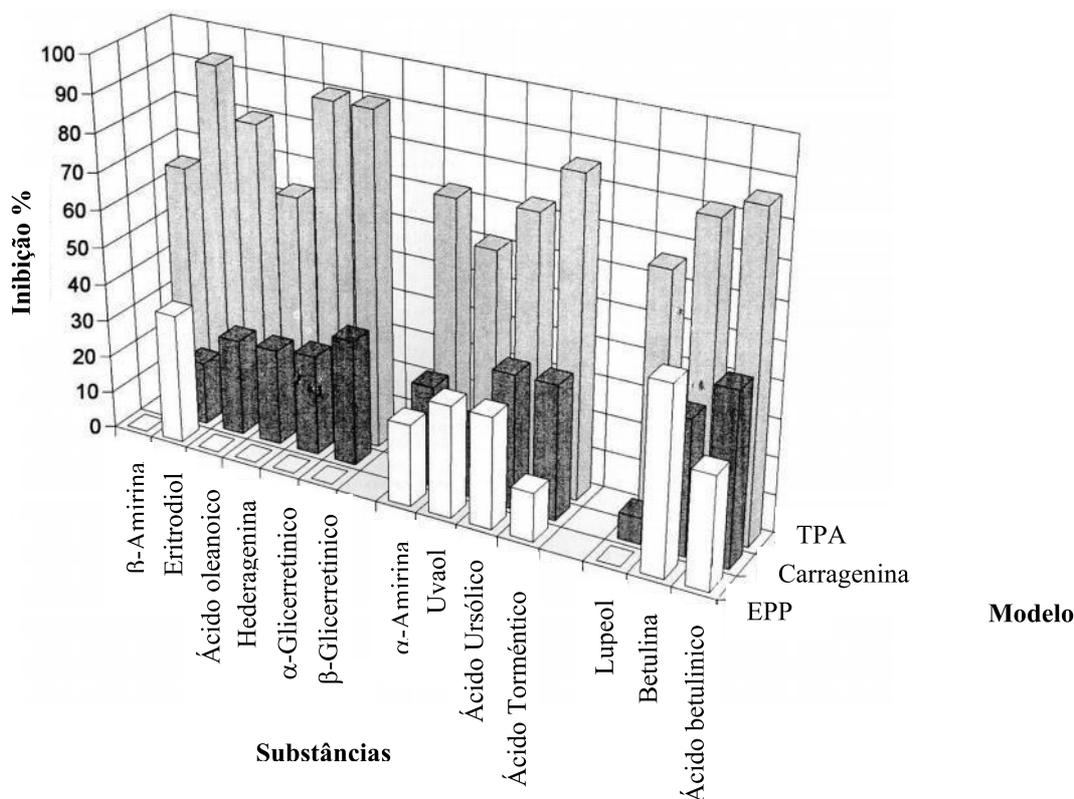
Fonte: Gross, 1985.

Com relação às atividades anti-inflamatórias, muitos triterpenos se mostraram como moléculas ativas em diferentes modelos experimentais *in vivo*, tais como o edema da pata traseira e de orelha induzidos por diferentes agentes flogísticos (Han e Bakovic, 2015; Del Carmem Recio et al., 1995). Existem também alguns triterpenos ativos frente às enzimas inflamatórias, como lipoxigenase (5-LOX), elastase e fosfolipase A₂ (FLA₂), ou ainda, atuando como inibidores da liberação de histamina, colagenase e interleucina, peroxidação lipídica e processos mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs), metabolismo de corticoides endógenos e atividades de complemento e proteína-quinase (Jeong et al., 2014; Safayhi e Sailer, 1997; Harborne e Baxter, 1993).

Em certos casos, o mecanismo de ação anti-inflamatório depende do tipo de esqueleto e/ou substituintes dos triterpenos. Por exemplo, β -boswelliácidos (triterpenos derivados do núcleo ursano) inibem marcadamente a atividade da 5-LOX, enquanto o mecanismo principal do ácido 18- β -glicirretínico (triterpenos derivados do núcleo oleanano) é a inibição do metabolismo endógeno de corticóides. Alguns triterpenos lanostanos são ativos contra a FLA₂ (por exemplo, ácidos ganoderico e desidrotumulósico) e os compostos com anéis altamente insaturados podem atuar como anti-peroxidativos (como, por exemplo, o celastrol) (Ríos, 2000).

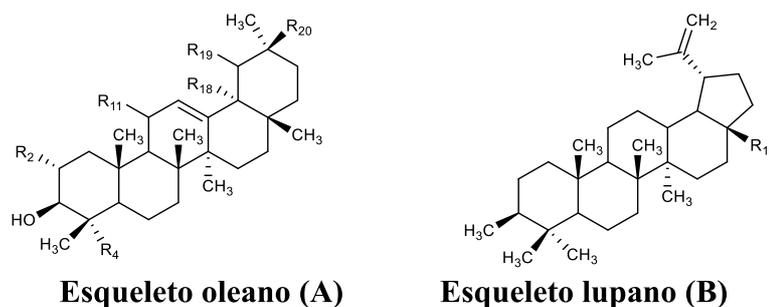
Del Carmen Recio e colaboradores, em 1995 relacionaram, em três modelos, (carragenina, EPP e TPA) algumas estruturas moleculares de triterpenos com suas atividades anti-inflamatórias (Figuras 5 e 6), evidenciando que todos os triterpenóides avaliados tiveram atividade pronunciada dependendo do método testado, sendo o modelo de inflamação induzido por 12-*O*-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), um éster de forbol, o mais sensível às amostras testadas, sugerindo como os principais alvos da ação, o metabolismo do ácido araquidônico, a cascata do complemento e a interação com o receptor de glicocorticoide. Deste modo, pode-se inferir que o modelo de indução inflamatória feito por ésteres de forbol (óleo de cróton e derivados) pode ser um ótimo modelo de avaliação e direcionamento para amostras com potencial anti-inflamatório.

Figura 5: Triterpenos avaliados em três modelos de atividade anti-inflamatória (Carragenina, EPP e TPA).



Fonte: Adaptado de Del Carmen Recio e colaboradores, 1995.

Figura 6: Representação da estrutura dos triterpenos avaliados nos estudos.



	R ₂	R ₄	R ₁₁	R ₁₇	R ₁₈	R ₁₉	R ₂₀	
A	H	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	H	α-amirina (f)
A	H	CH ₃	H	CH ₂ OH	H	CH ₃	H	Uvaol
A	H	CH ₃	H	COOH	H	CH ₃	H	ácido ursólico
A	OH	CH ₃	H	COOH	H	CH ₃	OH	ácido tormentico
A	H	CH ₃	H	CH ₃	H	H	CH ₃	β-amirina
A	H	CH ₃	H	CH ₂ OH	H	H	CH ₃	Eritrodíol
A	H	CH ₃	H	COOH	H	H	CH ₃	ácido oleanólico
A	H	CH ₂ OH	H	COOH	H	H	CH ₃	hederagenina
A	-	CH ₃	=O	CH ₃	OH	H	COOH	ácido 8α-hidroxicirretínico
B	-	-	-	CH ₃	-	-	-	Lupeol
B	-	-	-	CH ₂ OH	-	-	-	Betulina
B	-	-	-	COOH	-	-	-	ácido betulínico

Fonte: Adaptado de Del Carmen Recio e colaboradores, 1995.

A partir de vários estudos *in vivo*, *in vitro* e em humanos, Han e Bakovic (2015), demonstraram que muitos compostos triterpenoides presentes em frutas e vegetais podem proteger contra inflamação e outras doenças, conforme resumido no Quadro 2. Vários mecanismos podem explicar as propriedades biológicas antioxidantes e anti-inflamatórias dos triterpenoides (Han e Bakovic, 2015).

Quadro 2: Alguns efeitos de triterpenos derivados de três núcleos diferentes.

Oleano
<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Antiproliferativo • Redução da atividade do fator promotor de necrose tumoral alfa (TNF-α) • Reduz níveis de colesterol no sangue • Redução do risco de aterosclerose • Efeitos benéficos sobre o estresse oxidativo e inflamação • Prevenção de isquemia miocárdica
Ursano
<ul style="list-style-type: none"> • Reduz níveis de TNF-α no plasma • Diminui a produção de superóxido • Redução de LDL e apolipoproteína B-100 • Indução do aumento das concentrações de HDL e apolipoproteína A-I • Inibição da enzima COX-2 em 10 % • Inibição de respostas Th1 • Supressão de miocardite e conferindo efeitos protetores às cardiomiopatias • Redução do estresse oxidativo, fluxo de HBP e apoptose em células cardíacas • Liberação de NO • Inibição da glicogênese excessiva • Redução do nível de ROS intracelular e prevenção de lesão oxidativa induzida por H₂O₂ • Normalização da expressão / ativação de caspases • Aumento da relação Bcl-2 / Bax para modular a apoptose • Redução da contorção induzida pelo ácido acético e alívio da dor induzida por formaldeído
Lupano
<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante • Cardiotônico • Anti-hiperlipidêmico • Anti-inflamatória • Alteração do sistema redox de tecidos • Diminui os níveis de EROs • Indução de atividades de CAT e SOD • Mediação da sintase do NO através do direcionamento (PI3K) / Akt e TPA • Reduz o colesterol total triglicérides e níveis de fosfolipídios

Fonte: Adaptado de Han e Bakovic, 2015.

Sabendo que os triterpenoides possuem potencial ação no controle da inflamação, se faz necessário explorar estas potencialidades, com o intuito de encontrar moléculas capazes de superar as limitações que os tratamentos atuais apresentam (Sun et al., 2018; Zhang et al., 2017;

Satoshi et al., 2016; Batlouni, Zhang et al., 2015; 2010; Mohammad, 2009; Ríos, 2000; Safayhi e Sailer, 1997; Del Carmen Recio et al., 1995; Harborne e Baxter, 1993).

Tendo em vista os problemas gerados por inflamações cutâneas agudas que podem se agravar, ou até mesmo doenças inflamatórias de pele de característica crônica, precisamos de alternativas às já existentes, dessa forma, levando em consideração a atividade anti-inflamatória de triterpenos, entre as espécies vegetais de interesse medicinal que são capazes de sintetizá-los, está a *Baccharis dracunculifolia*.

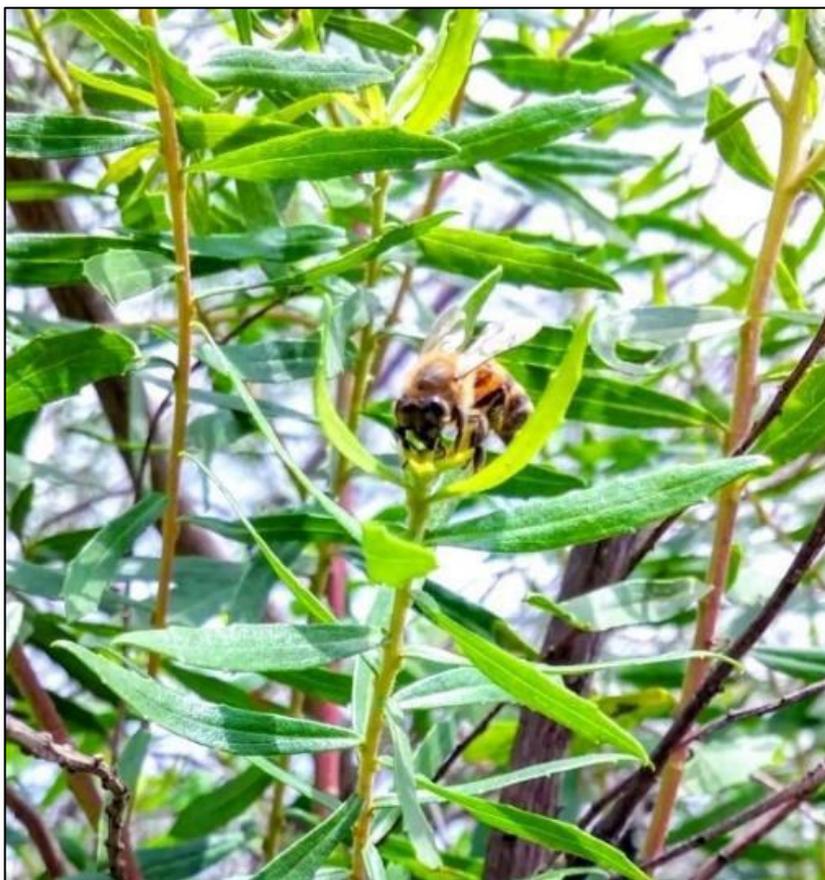
1.4. *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae)

Baccharis dracunculifolia pertence ao gênero *Baccharis*, o qual é considerado o maior gênero da família Asteraceae, apresentando cerca de 500 espécies distribuídas pelo continente americano (Da Silva Filho et al., 2009; Missima et al., 2007; Park et al., 2004; Giuliano, 2000). Muitas espécies deste gênero são utilizadas pela população, na forma de chás e infusos, para o tratamento de vários tipos de enfermidades. Dentre estas, destacam-se os usos para os males do estômago, do fígado e inflamação, bem como antioxidantes e desintoxicantes do organismo (Abad e Bermejo, 2007). Quimicamente, o gênero *Baccharis* é caracterizado por possuir principalmente terpenos, flavonoides e fenilpropanoides (Da Silva Filho et al., 2004).

Conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha, a espécie *B. dracunculifolia* é nativa do Brasil e ocorre frequentemente nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, em sua maioria nas áreas de cerrado, áreas em processo de sucessão e em pastagens abandonadas (Park et al., 2004). Esta espécie é um arbusto, podendo chegar a 4 metros de altura, em suas folhas estão presentes tricomas tectores e glandulares, os quais além de atuarem como barreira contra o ataque de predadores, auxiliam na interação dessa espécie com as abelhas para a coleta do material resinoso e produção da própolis verde (Spring, 2000; Teixeira et al., 2005).

Segundo Sawaya e colaboradores (2004), *B. dracunculifolia* é a principal fonte botânica de material coletado pelas abelhas (Figura 7) para a produção da própolis verde produzida nos estados de Minas Gerais e São Paulo.

Figura 7: Abelha coletando resina na *Baccharis dracunculifolia*.



Fonte: Autor, 2017.

1.4.1. Composição química e atividades biológicas de extratos das raízes de *B. dracunculifolia*

Estudos com a *B. dracunculifolia* se baseiam em sua maioria nas partes aéreas da planta, mostrando variadas atividades biológicas como mostra o quadro 3.

Quadro 3: Atividades relatadas da *B. dracunculifolia*.

Tipo de extrato	Atividade	Ref.
Óleo essencial das folhas	Anti-ulcerogênica	Queiroga (1990), Klopel (2007) e Massignani (2009)
Óleo essencial das folhas	Antifúngica (<i>C. albicans</i>)	Gelinski et al., 2007
	Anti-ulcerogênica	Lemos et al., 2007.

Extrato hidroalcoólico das partes aéreas	Leishmanicida Antiplasmodica	Da Silva Filho et al., 2009.
Extrato etanólico das partes aéreas	Anti-poliiovírus tipo 1	Búfalo et al., 2009.
Óleo essencial das folhas		
Óleo essencial das folhas	Antiproliferativa de linfócitos	Massignani et al., 2009
Extrato hidroalcoólico das partes aéreas	Baixa citotoxicidade	Búfalo et al., 2010.
Óleo essencial das folhas		
Óleo essencial das folhas	Leishmanicida Esquistossomicida	Parreira et al., 2010.
Extrato hidroalcoólico das folhas	Anti-inflamatória Anti-hipernociceptiva	dos Santos et al., 2010.
Óleo essencial das folhas	Fitotóxica (alelopatia)	Ibañes e Zoppolo, 2011.
Extrato em acetato de etila das partes aéreas	Anti-inflamatória	Cestari, 2011.
Extrato metanólico das partes aéreas	Antibacteriana (<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> e <i>C. neoformans</i>)	Fabri et al., 2011
Óleo essencial das folhas	Antibacteriana (<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>)	Ferronato et al., 2007; Pereira et al., 2011
Extrato glicólico das partes aéreas	Antioxidante	Guimarães et al., 2012
Extrato hexânico das partes aéreas	Antibacteriana (<i>P. brasiliensis</i>)	Johann et al., 2012.
Extrato etanólico das partes aéreas	Antioxidante	Figueiredo-Rinhel, 2013
Extrato hidroalcoólico das folhas	Anti-inflamatória	Bchiega et al., 2013
Extrato hidroalcoólico das partes aéreas	Hepatoprotetora	Rezende et al., 2014
Extrato etilacetato das partes aéreas	DNA-protetora	Munari et al., 2014

Óleo essencial das partes aéreas	Carrapaticida (<i>R. microplus</i>)	de Assis Lage, 2015
Óleo essencial das folhas	Antibacteriana (<i>S. mutans</i>)	Pereira et al., 2016
Extrato metanólico das partes aéreas	Modulação de insulina, protetora do pâncreas	Hocayen, 2016
Extrato hidroalcoólico das partes aéreas	Anti-inflamatória Antinociceptiva	Ramos Campos et al., 2016.
Extrato hidroalcoólico das partes aéreas	Antioxidante	Figueiredo-Rinhel, 2017
Óleo essencial das folhas	Inseticida (<i>C. macellaria</i>)	Chaaban et al., 2017
Extrato etanólico das folhas	Inseticida (<i>S. frugiperda</i> e <i>A. aegypti</i>)	Da Silva et al., 2017
Óleo essencial das folhas	Sinergismo com antibacterianos	Salazara, 2018

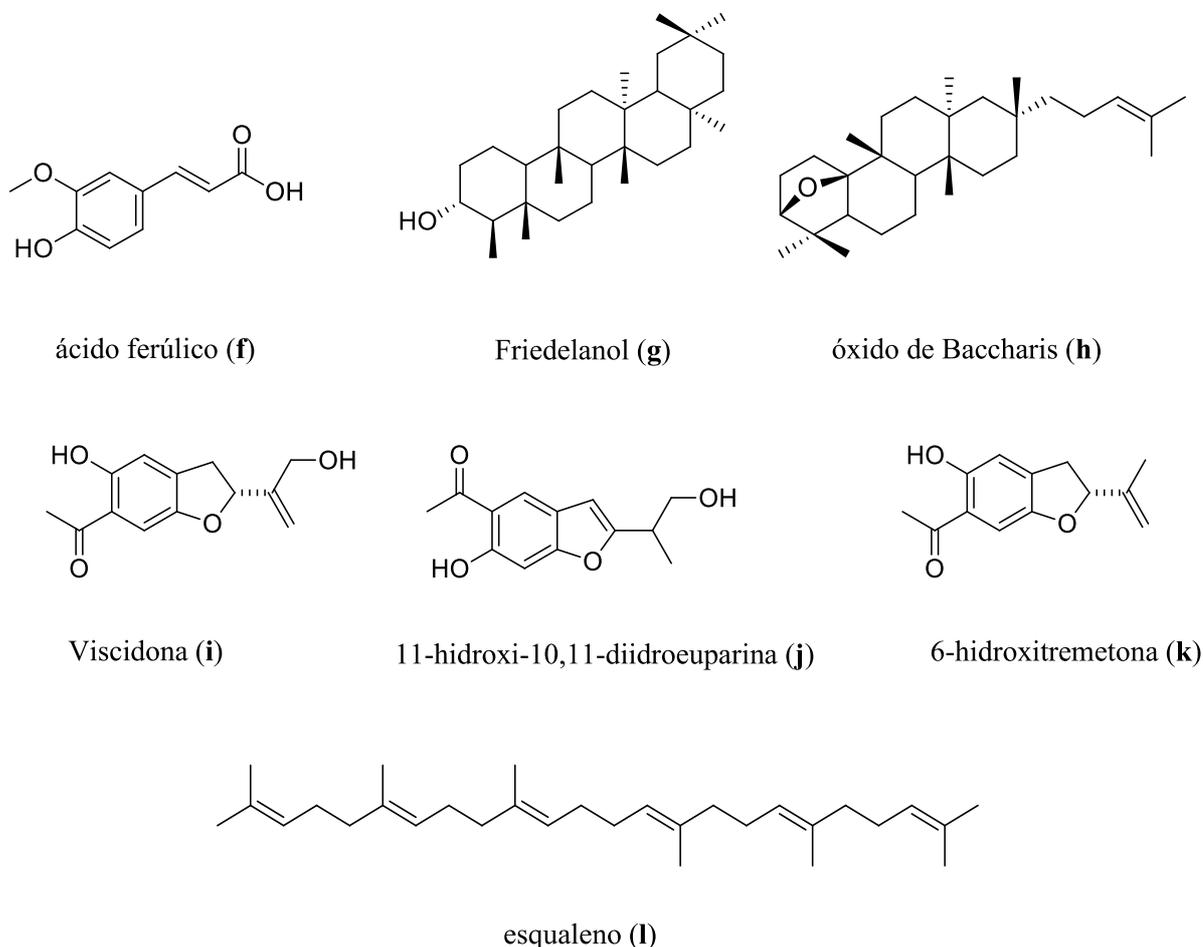
Fonte: Autor, com base em dados da literatura, 2019.

Bohlmann (1981), fez o primeiro estudo envolvendo as raízes de *B. dracunculifolia*, identificando o friedelanol (**g**), óxido de Baccharis (**h**), viscidona (**i**), 11-hidroxi-10,11-diidroeuvarina (**j**), 6-hidroxitremetona (**k**) e esqualeno (**l**) (Figura 8).

Da Silva Filho e colaboradores (2004), em seus estudos fitoquímicos e biológicos com *B. dracunculifolia*, isolaram e identificaram no extrato hidroalcoólico das raízes os metabólitos, ácido ferúlico (**f**), friedelanol (**g**) e óxido de baccharis (**h**). Estudos posteriores com o mesmo tipo de extrato identificaram outros compostos nas raízes de *B. dracunculifolia* como, viscidona (**i**), 11-hidroxi-10,11-diidroeuvarina (**j**) e 6-hidroxitremetona (**k**) (Missima et al., 2007).

Em estudos dos compostos isolados, Da Silva Filho e colaboradores (2004), chegaram à conclusão de que o óxido de baccharis (**c**) possui atividade tripanocida frente as formas tripomastigotas de *Tripanossoma cruzi*, enquanto o ácido ferúlico (**f**) e a viscidona (**i**) tiveram atividade frente às cepas de *Plasmodium falciparum* (Da Silva Filho et al., 2004).

Figura 8: Estruturas químicas de algumas substâncias encontradas nas raízes de *Baccharis dracunculifolia*.

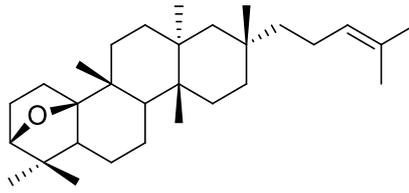


Fonte: Adaptado Sforcin e colaboradores, 2012, Missima e colaboradores, 2007 e Da Silva Filho e colaboradores, 2004.

Como exposto da espécie *B. dracunculifolia*, poucos estudos químicos ou farmacológicos foram realizados com as substâncias ou os extratos obtidos de suas raízes. Entre as substâncias encontradas nas raízes desta planta que possuem grande potencial biológico, está o triterpeno óxido de baccharis, avaliado nesse estudo.

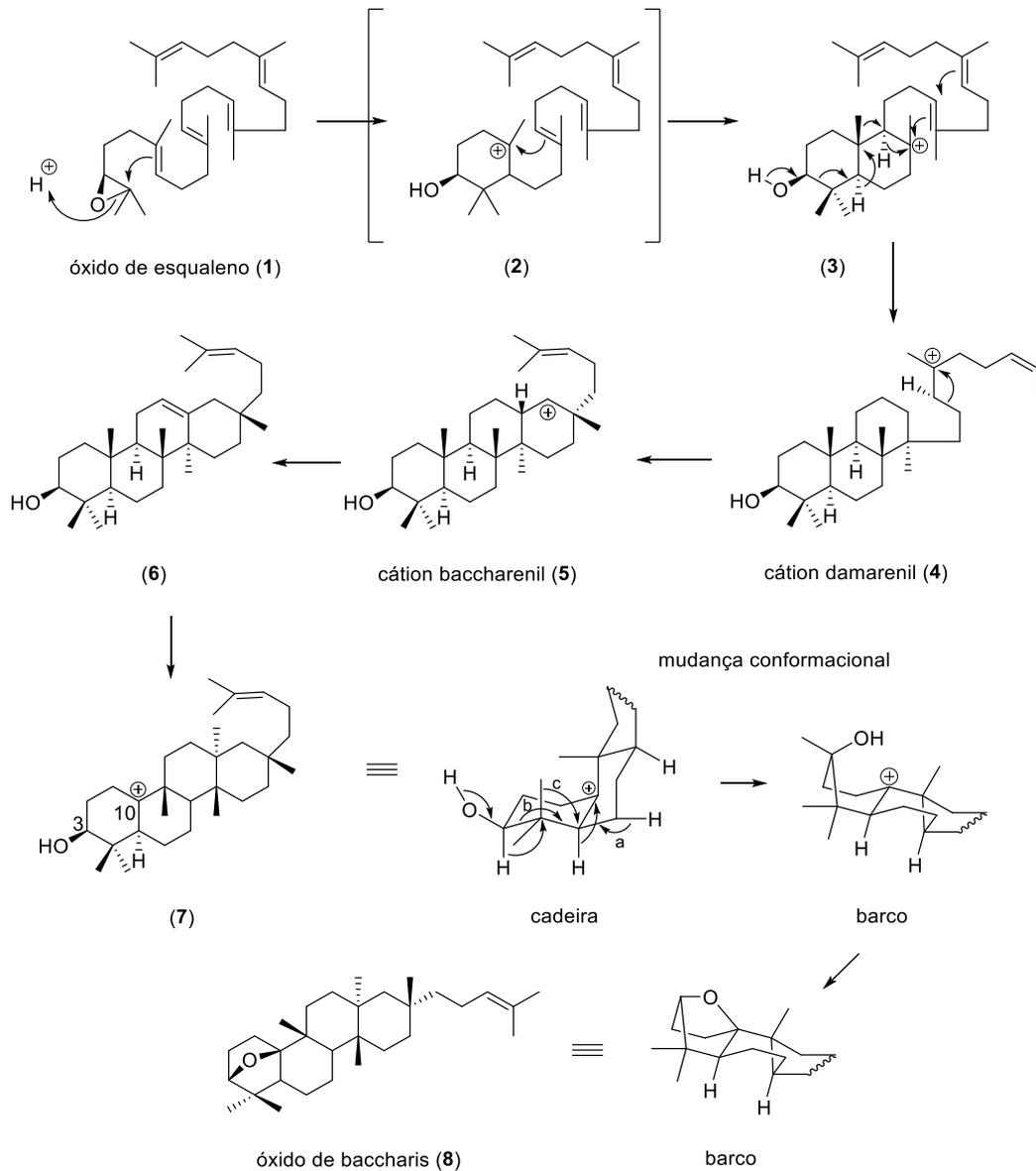
1.4.2. Óxido de Baccharis

Óxido de Baccharis (Figura 9) é um triterpeno tetracíclico com uma ponte oxídica nas posições 3 e 10 no anel A de seu esqueleto triterpênico. Sua fórmula molecular é $C_{30}H_{50}O$ com massa atômica de aproximadamente 426,76 g/mol e seu ponto de fusão é aproximadamente 148°C (Frode, 1973).

Figura 9: Estrutura do óxido de Baccharis.

Fonte: Autor, 2019.

Os triterpenos desse tipo se originam da via do ácido mevalônico passando pelo esqualeno, o qual sofre uma oxidação formando o 2,3-oxidosqualeno (Harrison, 1990). O óxido de baccharis surge a partir de mudanças conformacionais feitas pela enzima óxido de baccharis sintetase (OBS) como demonstrado resumidamente na figura 10 (Shibuya, 2008).

Figura 10: Biossíntese simplificada do óxido de baccharis a partir do óxido de esqualeno

Fonte: Adaptado de Phillips e colaboradores, 2006; Shibuya e colaboradores, 2008.

O cátion tetracíclico baccarenil (**5**) é formado a partir do cátion damarenil (**4**) pela expansão do anel D (Figura 10). Sucessivos rearranjos favorecidos pela enzima OBS levam a **6** e **7** sem a formação de um quinto anel (via de formação da β -amirina). O ponto-chave da biossíntese está ligado a formação do carbocátion terciário em C-10 (**7**). Um ataque intramolecular do grupo 3-hidroxil no carbono desprotonado C-10 com mudança conformacional de cadeira para barco nos anéis A e B de **7** produz o óxido de baccharis (**8**), a revisão da biossíntese completa foi descrita por Shibuya e colaboradores (2008).

Dentre mais de 100 tipos de esqueletos triterpênicos naturais, o óxido de baccharis é o único composto com o esqueleto tetracíclico com 4 anéis de 6 membros (6-6-6-6) e uma ponte oxídica (ponte 3,10-oxidica no anel A). Além desse composto existe apenas o dendropanóxido, um triterpeno pentacíclico (6-6-6-6-6) relatado em espécies do gênero *Dendropanax* e *Rhododendron*, com ponte 3,10-oxidica (Shibuya, 2008).

O óxido de baccharis foi reportado pela primeira vez por Anthonsen e colaboradores em 1970, em estudos com a espécie *Baccharis hamifolia*. Este triterpeno é encontrado com maior frequência em raízes de espécies do gênero *Baccharis*, sendo relatado nas espécies *B. hamifolia* (Anthonsen et al., 1970), *B. salicifolia* (Domínguez et al., 1972), *B. eleagnoides* (Rehder et al., 1990), *B. dracunculifolia* (Da Silva Filho et al., 2004) e também em *Rhododendron campanulatum* (Painuli et al., 2015).

O primeiro estudo sobre as atividades biológicas do óxido de baccharis foi reportado por Da Silva Filho e colaboradores em 2004. Neste estudo foi investigada a ação tripanocida deste triterpeno, numa concentração de 500 μ M, frente ao parasito *Tripanossoma cruzi*. Posteriormente, Herrera-Martínez e colaboradores (2012), mostraram que o óxido de baccharis inibiu o crescimento de *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Contudo, considerando o potencial anti-inflamatório de triterpenos, nenhum estudo sobre a avaliação da atividade anti-inflamatória do óxido de baccharis foi relatado na literatura. Além disso, apesar da importância medicinal da espécie *B. dracunculifolia*, extratos de suas raízes ainda não foram avaliados quanto às suas propriedades anti-inflamatórias tópicas.

Neste sentido, este trabalho descreve a obtenção e a caracterização do extrato hexânico e do óxido de baccharis, com um método alternativo ao já descrito, a partir das raízes de *B. dracunculifolia* e, de forma inédita, a avaliação das suas propriedades anti-inflamatórias tópicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- ❖ Realizar a caracterização química e a avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do extrato hexânico e do óxido de baccharis obtidos das raízes de *Baccharis dracunculifolia*, visando obter uma alternativa em potencial para o tratamento de inflamações cutâneas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar quimicamente o extrato hexânico das raízes de *B. dracunculifolia* por meio da análise em CG-EM;
- ❖ Isolar o óxido de baccharis a partir do extrato hexânico das raízes de *B. dracunculifolia*;
- ❖ Realizar a identificação do óxido de baccharis por meio de análise em RMN de ^1H e ^{13}C ;
- ❖ Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia* e do óxido de baccharis utilizando o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, fenol, capsaicina e histamina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS RAÍZES DE *Baccharis dracunculifolia* (EHBd)

Exemplares da espécie *B. dracunculifolia* foram coletados no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, entre as Faculdades de Farmácia e Economia. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob número 47.482. As plantas coletadas foram devidamente lavadas com água corrente e divididas em partes aéreas e raízes. As raízes foram cortadas finamente e secas em estufa sob temperatura controlada (40 °C) e, em seguida, moídas em moinho de facas.

Após obtenção do pó, o mesmo foi submetido à maceração em frasco de vidro transparente, utilizando hexano como líquido extrator (Figura 11). A cada 72h até esgotamento, o solvente foi filtrado e rotaevaporado, sendo o resíduo transferido progressivamente para um frasco devidamente pesado e identificado como extrato hexânico das raízes de *B. dracunculifolia* (EHBd).

Figura 11: Foto ilustrativa do processo de maceração das raízes de *B. dracunculifolia* com hexano.



Fonte: Autor, 2017.

3.2. ANÁLISE DO EHBd POR CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

3.2.1. Preparo da amostra

Considerando a necessidade de análise e caracterização de sua composição química, o EHBd foi analisado por CG-EM, utilizando equipamento da marca SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010 Plus, equipado com injetor AOC-20i (Figura 12) e uma coluna Restek Rtx-5MS capilar de sílica fundida (5 % de difenilsiloxano e 95 % de dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de filme).

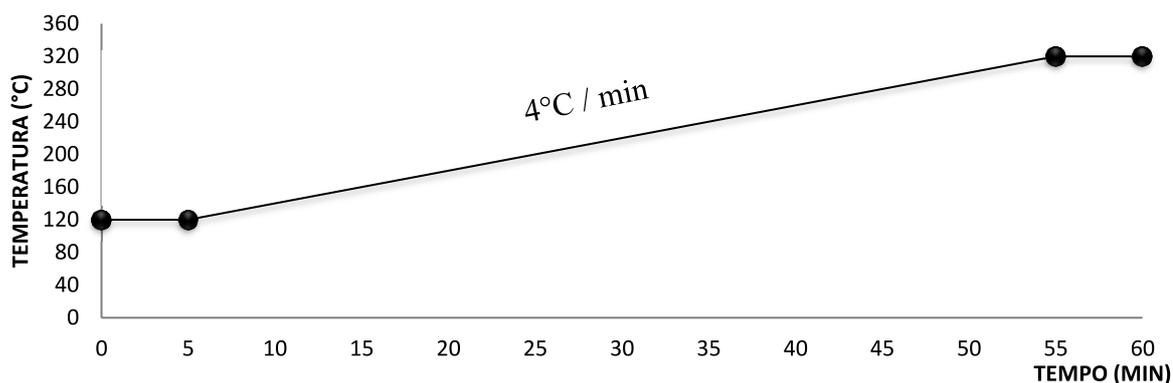
Figura 12: Foto ilustrativa do CG-EM utilizado para as análises.



Fonte: Autor, 2018.

A eluição foi programada da seguinte maneira: começando por 5 minutos a 120°C indo até 320°C em uma taxa de aquecimento de 4°C/min, depois mais 5 minutos a 320°C (Figura 13), temperatura de injeção de 150°C no modo Split com taxa 1:10, gás hélio como gás de arraste, pressão de 80,8 kPa, fluxo da coluna de 1 mL/min com injeção de 8 µL de amostra. O Espectrômetro de Massas operou em modo de ionização eletrônica (70 eV), e o detector foi programado para registrar taxas de massas entre 40 e 500 Da. O processamento dos dados foi feito através do software GCMS Solution, versão 2.5. Usou-se o padrão de *n*-alcanos (C₇ a C₃₀), da marca Supelco, diluindo 100 µL da amostra em 100 µL de hexano (grau HPLC), obtendo uma solução de 200 µL na concentração de 500 µg/mL.

Figura 13: Representação gráfica da programação da eluição utilizada na análise por CG-EM.



Fonte: Autor, 2019.

Os resultados das análises espectrométricas obtidas foram avaliados tendo-se como base os padrões de fragmentação gerados, além do índice de similaridade calculado pelo *software*. Além disso, para identificação dos prováveis compostos presentes, foi feito também o cálculo dos índices relativos de Kovats dos compostos, os quais foram calculados e confrontados aos dados da literatura, da biblioteca do aparelho e do banco de dados online (Adams, 2012; <<http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>>; <www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EHBd E ISOLAMENTO DO ÓXIDO DE BACCHARIS

3.3.1. Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)

Com o intuito de isolar o óxido de baccharis (OBac), o extrato EHBd foi submetido a fracionamento cromatográfico por cromatografia de baixa pressão conhecida usualmente como CLV. Inicialmente, parte do EHBd foi misturado a Celite, resultando em uma pastilha seca. Em seguida, a coluna de CLV (10 cm de diâmetro) foi empacotada com uma mistura de sílicas (3 partes de sílica 40-63 mesh e 1 parte de sílica 70-230 mesh), resultado em altura de 10 cm (Figura 14). A eluição da CLV foi realizada em gradiente de concentração, começando com hexano 100 % e finalizando com acetato de etila 100 %, conforme resumido na Tabela 1.

Tabela 1: Frações obtidas na Cromatografia Líquida a Vácuo.

Fração	Peso (g)	Fases Móveis	Proporção %
1	0,4021	Hexano	100
2	1,8750	Hexano : Acetato de Etila	98:2
3	1,0796	Hexano : Acetato de Etila	95:5
3.1	0,0591	Hexano : Acetato de Etila	95:5
3.2	0,4568	Hexano : Acetato de Etila	95:5
4	1,4938	Hexano : Acetato de Etila	90:10
5	2,4860	Hexano : Acetato de Etila	70:30
6	1,4511	Hexano : Acetato de Etila	50:50
7	3,4392	Acetato de Etila	100

Fonte: Autor, 2019.

Figura 14: Foto ilustrativa do preparo do extrato e da coluna Cromatográfica Líquida a Vácuo.

Fonte: Autor, 2017.

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e/ou por CG-EM para verificar a presença do óxido de baccharis. Para isso, a CCD foi utilizada como fase móvel a mistura de hexano e acetato de Etila (9:1 v/v) acidificada com ácido acético glacial e, como revelador, anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento de aproximadamente 90°C até aparecimento das manchas.

3.3.2. Cromatografia em Coluna Clássica (CC)

Após a realização da CLV e, considerando a presença da substância de interesse na fração 2 (1,875 g), esta fração foi submetida a coluna cromatográfica clássica (3 cm de diâmetro), sendo esta empacotada com sílica (40-63 mesh; altura de 20 cm). A eluição foi executada de forma isocrática com acetonitrila 100 %. As subfrações obtidas foram avaliadas por CCD e as que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram agrupadas conforme o fluxograma na figura 15, e são representadas na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2: Frações obtidas da coluna cromatográfica clássica com acetonitrila 100%.

Subfração	Peso (g)	Fases Móveis	Proporção %
1 – 2	0,8592	Acetonitrila	100
3 – 13	0,2005	Acetonitrila	100
14 – 15	0,3258	Acetonitrila	100

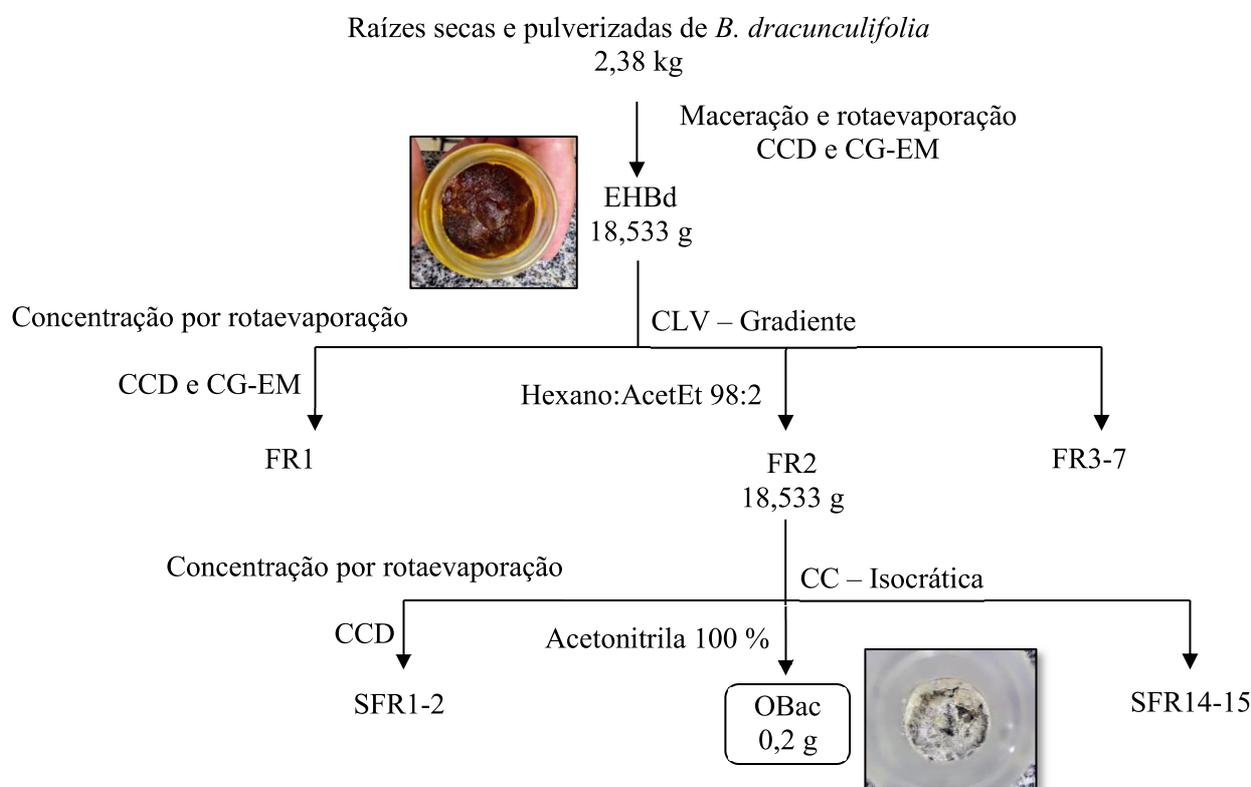
Fonte: Autor, 2019.

Após o agrupamento das subfrações e avaliação por CCD foi observado que na subfração SFR3-13 (200 mg) havia a presença de única mancha. A amostra agrupada foi submetida posteriormente a análises de RMN de ^{13}C e ^1H para a identificação.

3.4. IDENTIFICAÇÃO DO OBac

A identificação do composto isolado foi realizada por RMN de ^{13}C e ^1H . A amostra obtida foi analisada utilizando CDCl_3 e TMS como referência interna, em espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE III 500 MHz, localizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF e operado a 500 MHz (RMN de ^1H) e 125 MHz (RMN de ^{13}C). Os dados obtidos foram tratados no programa MestReNova e comparados com dados obtidos na literatura. O processo de extração e isolamento do óxido de baccharis está resumido na Figura 15.

Figura 15: Fluxograma da obtenção do extrato hexânico das raízes de *Baccharis dracunculifolia* e isolamento do óxido de baccharis.



Fonte: Autor, 2019.

3.5. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS TÓPICAS DO EHBd E OBad

A atividade anti-inflamatória tópica foi investigada em camundongos *Swiss* através do modelo de edema de orelha, sendo utilizados diferentes agentes flogísticos como agentes indutores da inflamação. A aplicação tópica desses agentes é utilizada para mimetizar doenças inflamatórias cutâneas semelhantes àquelas que acometem os humanos.

3.5.1. Animais

Foram utilizados camundongos (25-30 g) *Swiss*, machos, com 30-35 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFJF. Os ensaios foram feitos no Laboratório de Química Biomedicinal e Farmacologia Aplicada na Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (47 x 34 x 18 cm) com tampa gradeada em aço inox e comedouro embutido em “V”, contendo aproximadamente 3 cm de cama de maravalha, ração

comercial tipo Nuvilab[®], água *ad libitum*, manutenção da temperatura ambiente em 22 ± 4 °C e ciclo de luz de 12/12h. Os animais foram ambientados na sala de experimento durante 24 h antes da realização dos ensaios. Em cada gaiola, foram acondicionados 8 animais. Os protocolos utilizados foram aprovados pela CEEA da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 022/2018) e estão anexados no final do trabalho (ANEXO A).

3.5.2. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton

O edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos foi realizado de acordo com o método descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982) com algumas modificações. O edema de orelha foi induzido em grupos com 8 camundongos cada ($n = 8$) usando 20 µL de óleo de cróton 2,5 % (v/v, diluído em acetona), o qual foi aplicado na superfície interna da orelha direita, e na orelha esquerda foi aplicado 20 µL de acetona (veículo). Após 15 minutos, o tratamento foi realizado na orelha direita com o EHBd, a substância isolada OBac nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha e dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) como controle positivo, enquanto o controle negativo recebeu 20 µL de solução salina como tratamento. Um grupo que não sofreu indução nem foi tratado (basal) foi adicionado ao estudo. A espessura das orelhas (mm) foi medida após 6 e 24 horas para acompanhar a evolução do edema, enquanto que o peso (massa em mg) foi quantificado após 24 horas (discos de 6mm) em 24 horas. Para eutanásia foram utilizadas cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Os fragmentos das orelhas foram removidos por *punch* metálico (Richter 0,6 mm) e pesados em balança analítica (AY220, Shimadzu). A diferença entre a espessura e peso das orelhas direita e esquerda de cada camundongo de cada grupo determinou a medida do edema. Dois fragmentos de orelha obtidos foram conservados em formaldeído 10 % (v/v) para análise histopatológica e restante foi utilizada para determinar proteínas totais e os marcadores inflamatórios (mieloperoxidase e *N*-acetil- β -*D*-glucosaminidase).

3.5.3. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

O edema de orelha induzido por fenol foi realizado com base no que foi descrito por Lim e colaboradores (2004) com algumas modificações. Os camundongos foram separados em grupos com 8 camundongos cada ($n = 8$) assim como no modelo anterior. Para a indução foi usado 20 µL de fenol 10 % (v/v, diluído em acetona) aplicados na superfície interna da orelha

direita do animal, e na orelha esquerda foi aplicado 20 μ L de acetona (veículo). Após 15 minutos, o tratamento foi realizado na orelha direita com o EHBd, a substância isolada OBac nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha e dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) como controle positivo, enquanto o controle negativo recebeu 20 μ L de solução salina. Um grupo basal também foi adicionado. A espessura da e o peso da orelha (mm) foram medidos após 2 horas da mesma maneira descrita no modelo anterior.

3.5.4. Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

O edema de orelha induzido por capsaicina foi realizado com base no que foi descrito por Silva e colaboradores (2018) com algumas modificações. Os camundongos foram separados em grupos com 8 camundongos cada ($n = 8$) assim como nos outros modelos deste trabalho, posteriormente foram tratados na orelha direita com o EHBd, a substância isolada (OBac) nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha e dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) como controle positivo, 20 μ L de solução salina como controle negativo, enquanto o grupo basal não foi tratado. Após 1 hora do tratamento foi realizada a indução da inflamação com a aplicação de 20 μ L de capsaicina 0,01 mg/ μ L na superfície interna da orelha direita do animal, na orelha esquerda foi aplicado apenas 20 μ L de acetona (veículo). Os animais foram eutanasiados com sobredosagem anestésica (cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg) após 30 min da aplicação da capsaicina. A diferença da espessura (medidas em micrômetro digital) e peso dos fragmentos (6 mm) obtidos das orelhas direita e esquerda dos animais, foi o parâmetro para determinação do edema.

3.5.5. Edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica de histamina

Para a avaliação do edema de orelha induzido por histamina foi utilizado como base o método de Brand e colaboradores (2002) com algumas modificações. Os camundongos foram separados em grupos com 8 camundongos cada ($n = 8$) e, posteriormente foram tratados na orelha direita com o EHBd e a substância isolada OBac nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) e dexclorfeniramina (0,1 mg / orelha) como controles positivos, e por fim 20 μ L de solução salina como controle negativo, um grupo não sofreu indução nem foi tratado (basal). Após 30 min, os animais foram anestesiados (cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg) e 10 μ L de histamina previamente preparada em solução salina

(100 mg/mL) foi aplicada por via intradérmica nas orelhas direitas dos camundongos, enquanto que nas orelhas esquerdas foi aplicado apenas a solução salina. As medidas da espessura e peso das orelhas foram feitas após 1h da indução da mesma maneira descrita nos modelos anteriores.

3.5.6. Determinação de atividade de mieloperoxidase (MPO) e *N*-acetil- β -*D*-glucosaminidase (NAG)

Para medir a atividade da MPO e NAG, após a pesagem, foram congelados 3 fragmentos das orelhas anteriormente obtidas de cada grupo, as quais foram trituradas em almofariz com 1 mL de HTBA 0,5 % em tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4). Após a trituração completa das orelhas foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4). Os homogenatos foram transferidos para tubos de ensaio, centrifugados a 7000 RPM por 10 min a 4°C e o sobrenadante de cada tubo transferido para tubos *Eppendorf* devidamente identificados.

A atividade de MPO foi medida de acordo com Bradley e Priebat (1982) com algumas modificações. Quadruplicatas de 35 μ L de TMB 1,6 mM em DMSO, 105 μ L H₂O₂ 0,0003 % em tampão fosfato de sódio (pH 5,4) e 70 μ L de sobrenadante previamente obtido foram colocadas em placas de 96 poços, e em seguida, incubou-se durante 5 min a 37 °C. Após incubação foi adicionada 140 μ L de H₂SO₄ para interromper a reação. O experimento foi feito em quadruplicata. A atividade foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (THERMOPLATE[®], TP-READER) com comprimento de onda de 450 nm sendo expressa em densidade óptica por biópsia (mDO/biópsia).

O sobrenadante também foi utilizado para avaliar a atividade de NAG. De acordo com o método descrito por Sanchez e Moreno (1999), também com algumas modificações, quadruplicatas de 200 μ L de *p*-nitrofenil-acetamida- μ -*D*-glicopiranosídeo (2,24 mM) em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5) e 100 μ L de sobrenadante foram aplicadas em placas de 96 poços e incubados a 37 °C durante 10 min, após a incubação foi adicionado 100 μ L de tampão glicina 0,2 M pH 10,6 para parar a reação. A atividade foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (THERMOPLATE[®], TP-READER) com comprimento de onda de 405 nm sendo expressa em densidade óptica por biópsia (mDO/biópsia).

3.5.7. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para a dosagem do óxido nítrico, foi seguido o método de Green e colaboradores (1982) com algumas modificações. Três fragmentos de orelhas de cada grupo foram congelados e triturados em almofariz com 3 mL de PBS (pH 7,4). Os homogenatos obtidos foram transferidos para tubos de ensaio e centrifugados a 7000 RPM durante 15 min a 4°C, e os sobrenadantes foram transferidos para tubos *Eppendorf* devidamente identificados. 150 µl de sulfonamida a 1 % e α -naftiletilenodiamina a 0,1 %, ambos em ácido fosfórico a 5 % foram unidos para formar o reagente de Griess e foram aplicados em placas de 96 poços juntamente com 150 µL de sobrenadante. A dosagem de NO foi determinada colorimetricamente usando espectrofotômetro (SHIMADZU®, UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer) com comprimento de onda de 540 nm, após 30 min de reação. Para isso, também foi feita uma curva de quantificação com nitrito de sódio (NaNO₂) a 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µM em PBS (pH 7,4). O experimento foi realizado em triplicata.

3.5.8. Análise histopatológica

Após eutanásia e medidas de espessura e peso, dois fragmentos de orelha de todos os grupos obtidos do experimento feito com a indução por óleo de cróton foram preservados em formalina 10 % até o que fosse submetido ao processo histológico. As biópsias foram desidratadas e blocadas em parafina, as quais foram submetidas a cortes transversais de 4 µm em um micrótomo, coradas com hematoxilina e eosina. A avaliação da intensidade do edema (espessura do corte), presença de vasodilatação e infiltração de leucócitos foram avaliadas em áreas representativas com aumentos de 100x e 200x de forma visual subjetiva, onde foram feitas fotomicrografias utilizando um microscópio (Olympus BX4) acoplado a uma câmera fotográfica digital e software Imagepro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

3.5.9. Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A diferença entre os grupos foi avaliada por análises de variância (one-way anova) seguidas pelo teste de Newman-Kleus. O n (número de animais) é indicado nas legendas. As diferenças estatísticas

foram consideradas significativas em valores de P menores que 0,001 ($P < 0,001$). Os cálculos foram realizados utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism versão 7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS RAÍZES E FRACIONAMENTO

Foram obtidos 2,38 kg de pó como resultado da colheita após secagem e moagem do material botânico, o qual foi submetido à extração por maceração em um frasco de vidro transparente com hexano. O líquido resultante da extração foi filtrado e concentrado com auxílio de um rotaevaporador ($50 \pm 5^\circ \text{C}$). O produto resultante desse processo feito a cada 72 h até esgotamento do material foi transferido para um frasco devidamente identificado, fornecendo 18,533 g de extrato bruto (EHBd) (Figura 16).

Figura 16: Aspecto do extrato hexânico obtido das raízes de *Baccharis dracunculifolia* (EHBd).



Fonte: Autor, 2017.

EHBd foi extraído por meio de maceração em frasco de vidro, onde foram obtidas grandes quantidades de extrato bruto, o qual tem aspecto ceroso devido a sua alta carga de compostos lipofílicos. Antes do fracionamento, o extrato foi submetido a análises cromatográficas de CCD e CG-EM para a pesquisa de substâncias. Assim, foi observado o perfil cromatográfico do

extrato de acordo com os parâmetros descritos na metodologia, e, juntamente com os relatos da literatura da presença do composto de interesse, no gênero e na própria espécie (Missima et al., 2004; Frode, 1973), foi sugerida a presença do OBac no extrato.

Para o fracionamento foi necessário elaborar uma eluição gradiente de polaridade compostas de hexano e acetato de etila, começando com hexano 100 % e indo até acetato de etila 100 %. Assim, obteve-se 7 frações, que foram avaliadas novamente por CCD e CG-EM para observação do perfil cromatográfico e indicio da presença do OBac em uma dessas frações. Dessa maneira, destacou-se a fração 2 (FR2) como a que apresentava mais evidencias de conter maiores quantidades da substância de interesse (OBac). A FR2, quando submetida a CCD, foi caracterizada pelo aparecimento de duas manchas no sistema de eluição hexano acetato de etila 9:1, bem como nas análises feitas por CG-EM, dessa forma, foi preparado um sistema de eluição em coluna clássica para que se pudesse separar essas duas manchas de forma efetiva. Sabendo-se que Sawai e colaboradores (2011) utilizaram acetonitrila 85 % na fase móvel para análises de triterpenos monoxigenados em CLAE (coluna TSK-GEL ODS-80TM - Tosoh, Tokyo, Japão), foi feita então uma coluna cromatográfica clássica isocrática com acetonitrila 100 % para tentativa do isolamento do OBac. Foram recolhidas 15 subfrações (SFR) e, aquelas que foram visualizadas com o mesmo perfil cromatográfico em CCD foram agrupadas, sendo as SFR's de 3 a 13 reunidas e posteriormente submetidas a análises de RMM para identificação.

4.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EHBd POR CG-EM

No cromatograma do EHBd (Figura 18) são assinalados os compostos que foram encontrados nas raízes dessa espécie. A alta complexidade da amostra em estado bruto pode ter atrapalhado ou sobreposto algumas substâncias. A presença das mesmas foi avaliada por meio da comparação do perfil de fragmentação da molécula no espectro de massas, com os das moléculas da biblioteca do aparelho (NIST11s.lib) sendo a similaridade (SI) calculada pelo *software*. Padrões de fragmentação relacionados às funções químicas e os principais fragmentos formados também foram considerados. O cálculo do índice de Kovats e posterior comparação com a literatura foi feito de acordo com a expressão matemática a seguir (Figura 17), onde X se refere aos tempos de retenção, z o número de carbonos do *n*-alcano eluído antes e (z + 1) o número de carbonos do *n*-alcano eluído após o pico de interesse.

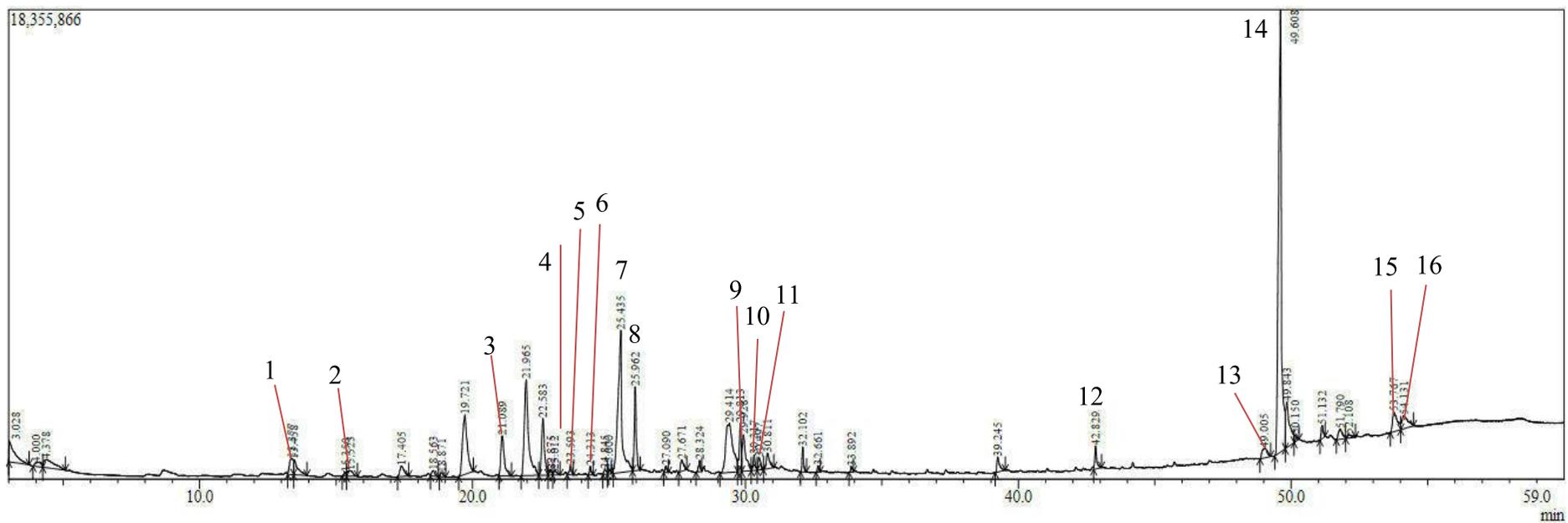
Figura 17: Representação matemática do cálculo do índice de Kovats.

$$I = 100 \left[\frac{\log X_i - \log X_z}{\log X_{(z+1)} - \log X_z} + z \right]$$

Fonte: Adaptado de Zellner et al., 2008.

A tabela 3 está representada com as substâncias encontradas no cromatograma, e a estrutura das moléculas indicadas na tabela está na figura 20.

Figura 18: Cromatograma do EHBd.



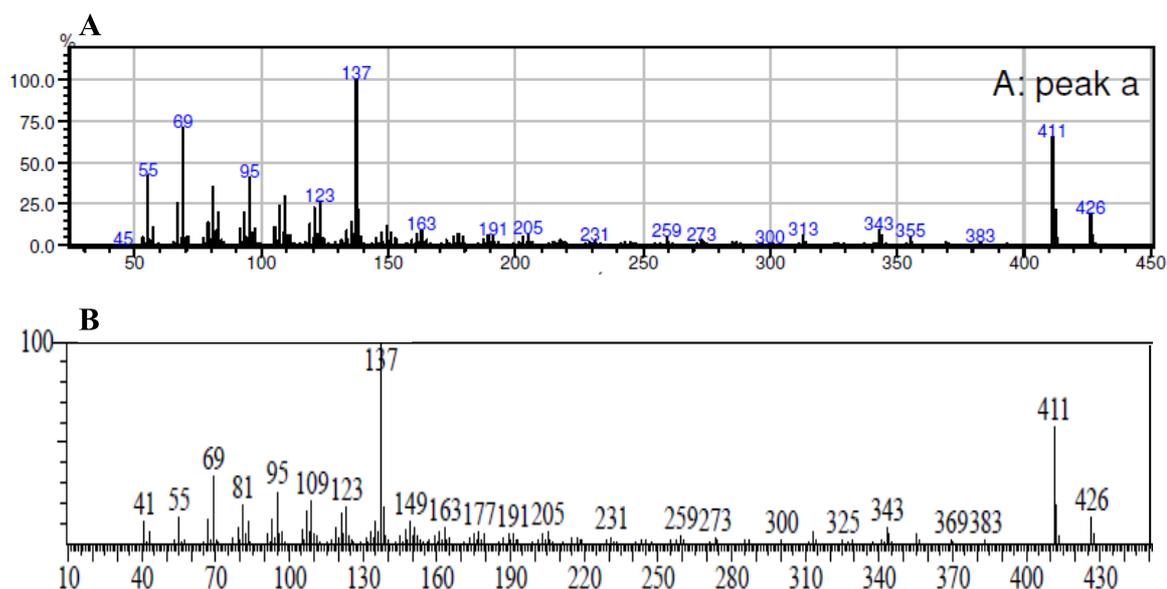
Fonte: Autor, com base nos dados obtidos no *software* GCMS Solution, 2019.

Tabela 3: Constituintes químicos do EHBd identificados pelo CG-EM.

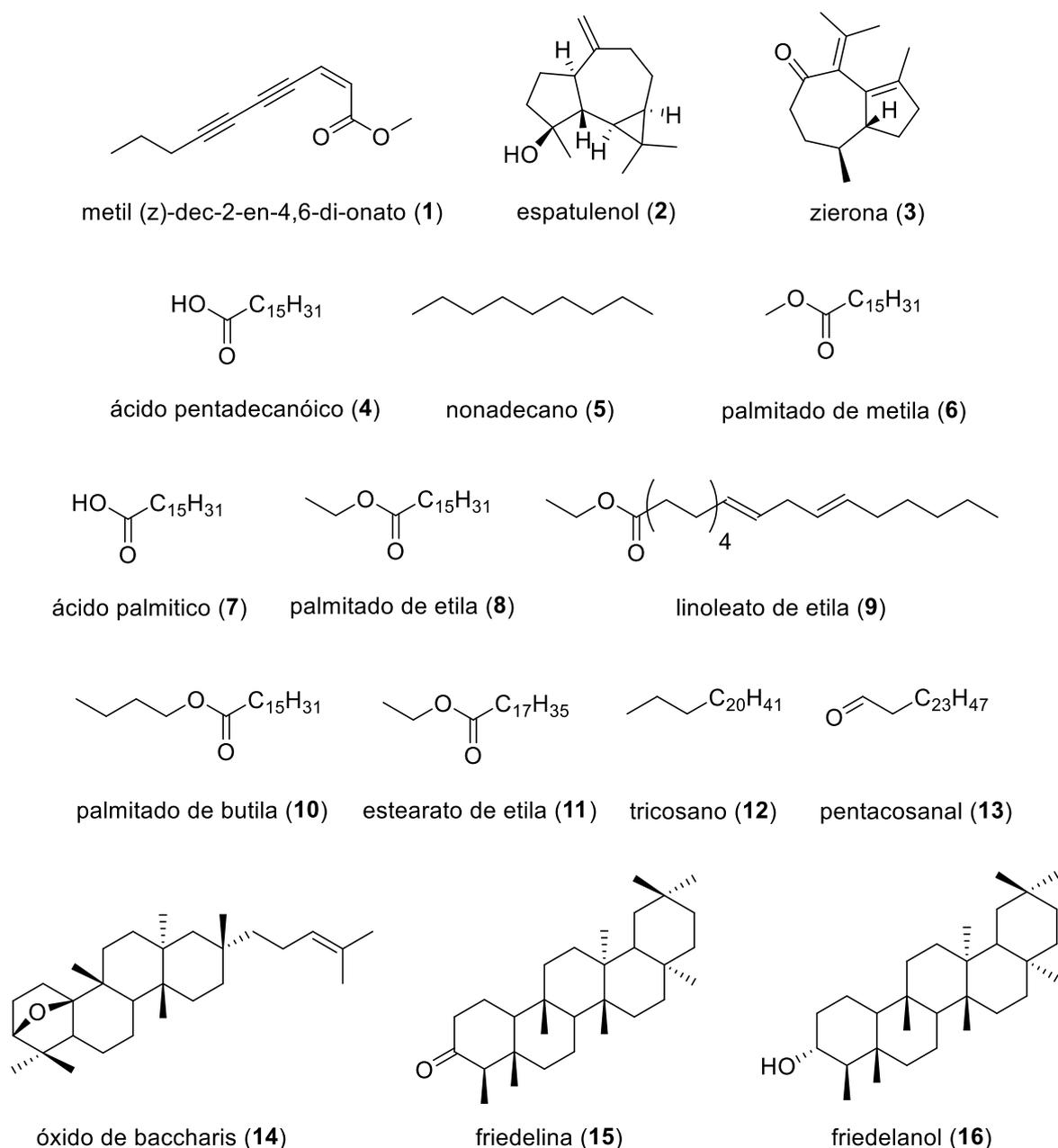
	Substâncias	TR _{extrato}	Área (%)	SI	IR _{exp}	IR _{lit}
1	metil (z)-dec-2-en-4,6-di-onato	13,337	1,24	80	1517	1527
2	espatulenol	15,350	0,19	85	1586	1577
3	zierona	21,092	2,79	82	1693	1694
4	ácido pentadecanoico	22,875	0,33	75	1863	1869
5	nonadecano	23,592	0,41	#	1890	1900
6	palmitato de metila	24,317	0,30	93	1920	1926
7	ácido palmítico	25,433	11,32	94	1966	1968
8	palmitato de etila	25,958	3,30	95	1987	1978
9	linoleato de etila	29,818	1,87	93	2155	2162
10	palmitato de butila	30,317	0,67	95	2178	2188
11	estearato de etila	30,500	0,58	91	2186	2197
12	pentacosanal	42,833	0,89	#	2723	2738
13	tricosano	32,658	0,19	#	2286	2300
14	óxido de baccharis	49,608	26,35	81	**	2737
15	friedelina	53,767	1,85	88	**	2858
16	friedelanol	54,133	1,52	88	**	2875

Legenda: **TR**, Tempo de retenção; **SI**, Similaridade; **IR_{exp}**, Índice de retenção calculado do composto; **IR_{lit}**, Índice de Kovats encontrado; #, compostos não apresentados nos dados do software; ** IR não foi possível calcular. Fonte: Autor, baseado em dados de NIST11.s; Adams, 2009; puchem.com, 2019.

Os fragmentos do composto de interesse (**14**) gerados de acordo com o espectro de massas foram comparados a dados obtidos em análises feitas por Shibuya (2008), indicando a presença da substância no extrato (Figura 19). Não foi possível fazer o cálculo do índice de kovats da molécula referida, pois o padrão *n*-alcanos C₇₋₃₀ utilizado não possibilita o cálculo do índice de compostos com 30 ou mais carbonos em sua composição.

Figura 19: Espectro de massas do OBAc gerado em espectro de massas sob energia de ionização de 70 eV.

Legenda: **A**, Espectro encontrado na literatura. **B**, Espectro obtido nas análises. Fonte: Autor, com base em dados de Shibuya e colaboradores, 2008.

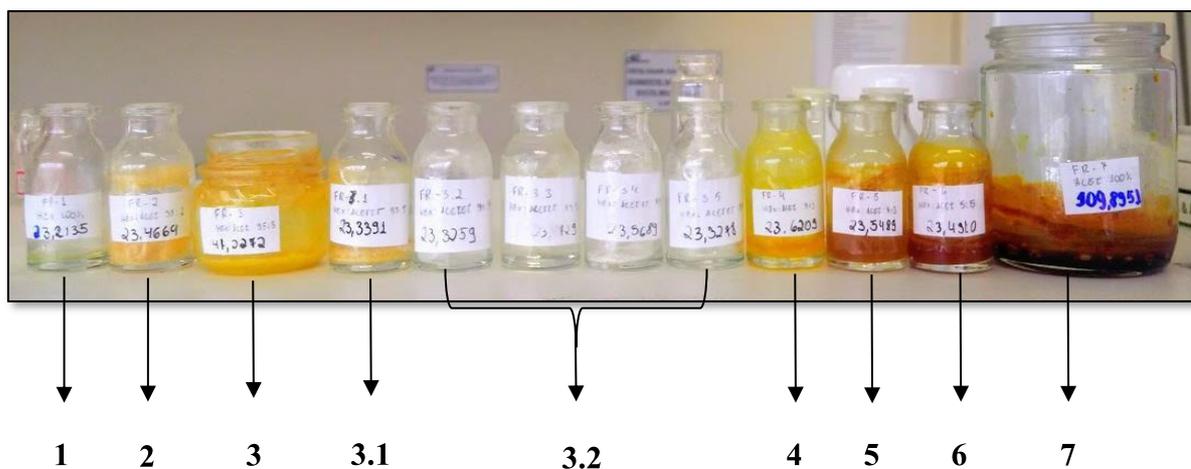
Figura 20: Compostos encontrados no EHBd por meio de CG-EM.

Fonte: Autor, elaborado de acordo com dados fornecidos pelo CG-EM, 2019.

4.3. ISOLAMENTO DO ÓXIDO DE BACCHARIS

Inicialmente, o EHBd (14,7 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico por CLV, sendo recolhidas 7 frações de acordo com cada fase móvel utilizada (Figura 21). Os perfis cromatográficos em CCD das frações obtidas está representado na Figura 22. A presença do óxido de baccharis na fração 2 foi indicada por análises de CCD e CG-EM sendo ela a fração escolhida para prosseguir com isolamento da substância.

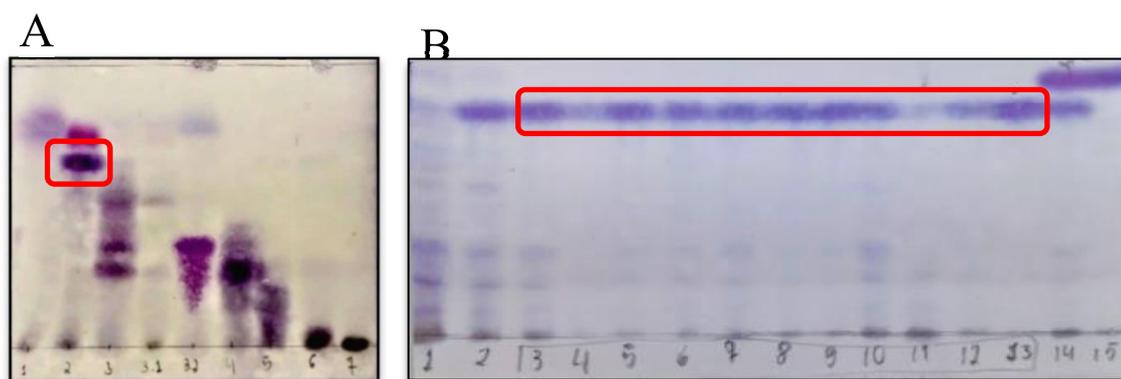
Figura 21: Frações obtidas do EHBd por fracionamento cromatográfico em CLV.



Fonte: Autor, 2019.

Dada a segunda fração como a mais promissora para o isolamento, foi feita com a mesma uma coluna cromatográfica clássica, e por fim, obtiveram-se 15 SFRs representados na CCD da Figura 21B. As subfrações com o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas em um único frasco, e subsequentemente foi feita a análise de RMN de ^{13}C e ^1H e para a identificação da substância. O aspecto cristalino das frações reunidas que sugeriram ser o composto de interesse está representado na figura 23.

Figura 22: CCD das frações (A) e das subfrações obtidas da fração 2 (B).



hexano:acetato de etila 9:1 (revelador anisaldeído sulfúrico)

Legenda: CCD das frações obtidas em CLV (A); CCD das subfrações da fração 2 obtidas em CC (acetonitrila 100%) (B); destacadas em vermelho as manchas correspondentes ao óxido de baccharis. Fonte: autor, 2019.

Figura 23: Aspecto cristalino do composto isolado.



Fonte: Autor, 2019.

4.3. IDENTIFICAÇÃO DO OBac

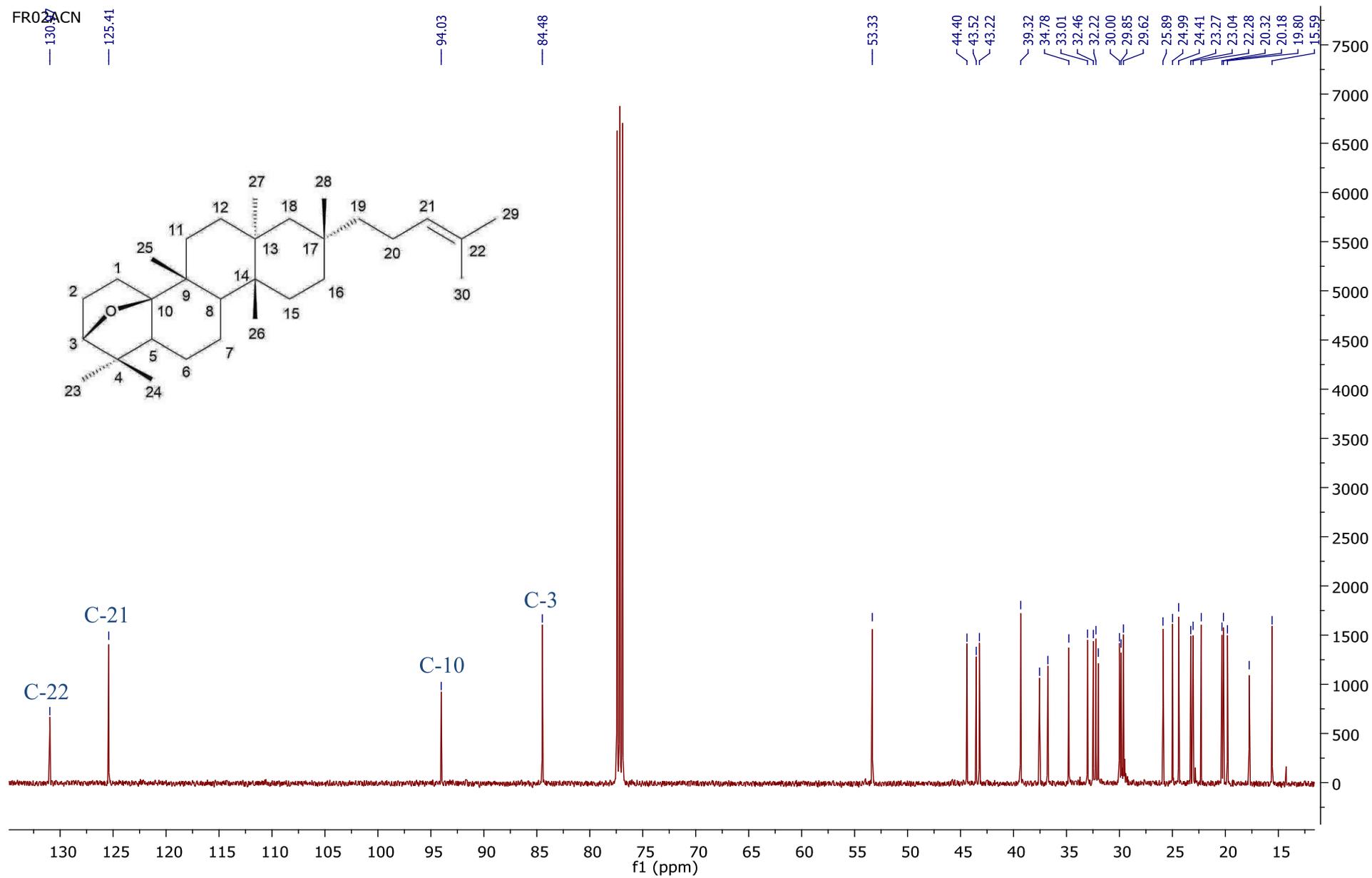
Para a identificação do composto foram feitas análises de RMN de ^{13}C (125 MHz) e ^1H (500 MHz), onde foram identificados os carbonos e hidrogênios característicos da molécula, de acordo com sua estrutura e com embasamento em dados da literatura. Nas análises de RMN de ^{13}C são identificados dois sinais com deslocamentos químicos nas regiões de 120 a 135 ppm, região característica de carbono de olefina (carbonos 21 e 22 na figura 24) mostrando uma ligação dupla entre dois carbonos, também são observados 2 sinais de deslocamento químico entre 80 e 95 ppm, onde são comuns carbonos carbonílicos, os quais representam os carbonos 3 e 10 na figura 24, representando os carbonos pertencentes a ponte oxídica da molécula. Por sua vez, as análises de RMN de ^1H confirmaram mais alguns detalhes da estrutura, onde são observados o H-21, hidrogênio ligado a um carbono fazendo uma dupla ligação com outro carbono, H-3 evidenciando um hidrogênio ligado a um carbono fazendo ligação com um oxigênio, e por fim, 8 simpletos já observados na literatura na região de 0,6 a 1,5 ppm característicos de hidrogênio de metilas (Figura 25), comprovando assim a estrutura do composto isolado como sendo o óxido de baccharis (Shibuya et al., 2008; Nurnberg et al., 1998). Todos os dados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4: Sinais obtidos no RMN de ^{13}C e ^1H de óxido de baccharis isolado de *Baccharis dracunculifolia* e dados da literatura.

	óxido de baccharis (isolado)		óxido de baccharis (literatura)	
	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)
1	32,0	-	32,0	-
2	24,9	-	24,8	-
3*	84,4	3,75 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,6)	84,3	3,75 (<i>d</i> , <i>J</i> = 5,6)
4	43,5	-	43,3	-
5	53,3	-	53,1	-
6	19,8	-	19,6	-
7	20,3	-	20,1	-
8	39,3	-	39,1	-
9	36,7	-	37,3	-
10*	94,0	-	93,8	-
11	29,8	2,23 (<i>td</i> , <i>J</i> = 13,7, 4,8)	29,8	2,23 (<i>td</i> , <i>J</i> = 14,0 e 5,3)
12	32,2	-	32,3	-
13	34,7	-	36,5	-
14	37,5	-	39,1	-
15	29,6	-	29,4	-
16	33,0	-	34,6	-
17	30,0	-	31,8	-
18	44,4	-	44,2	-
19	43,2	-	43,0	-
20	23,2	-	23,0	-
21*	125,4	5,09 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,3)	125,3	5,09 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,3)
22*	130,9	-	130,8	-
23	23,0	0,88 (<i>s</i>)	22,8	0,88 (<i>s</i>)
24	24,4	1,00 (<i>s</i>)	24,2	1,00 (<i>s</i>)
25	22,2	1,23 (<i>s</i>)	22,0	1,23 (<i>s</i>)
26	15,5	1,02 (<i>s</i>)	15,4	1,02 (<i>s</i>)
27	20,1	1,05 (<i>s</i>)	20,0	1,04 (<i>s</i>)
28	32,4	0,89 (<i>s</i>)	32,8	0,89 (<i>s</i>)
29	17,7	1,60 (<i>s</i>)	17,5	1,59 (<i>s</i>)
30	25,8	1,68 (<i>s</i>)	25,7	1,67 (<i>s</i>)

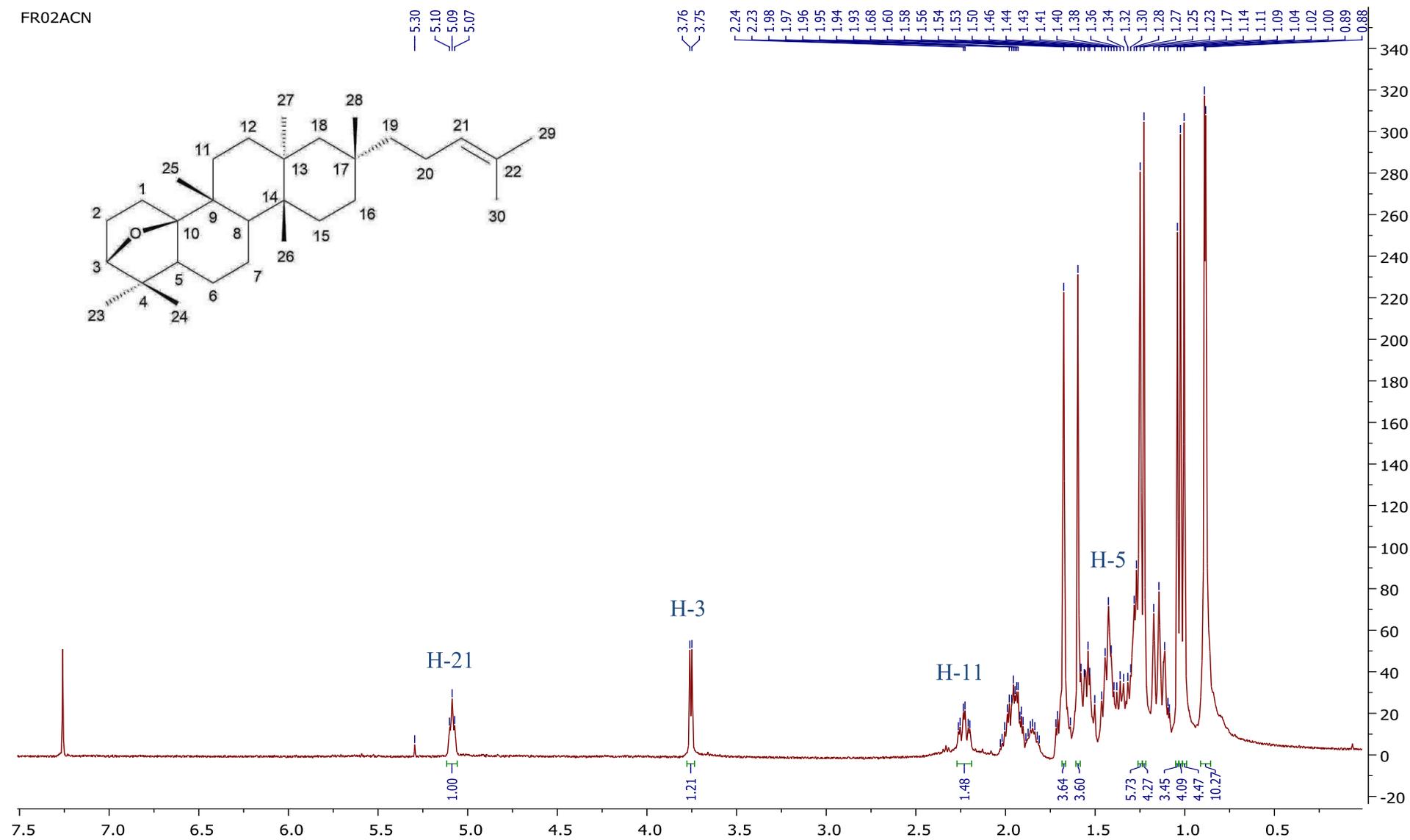
Legenda: ^{13}C (δ), deslocamento químico do carbono em ppm; ^1H (δ), deslocamento químico do hidrogênio em ppm; (*d*), duplete; (*td*), triplo-duplete; (*t*) triplete; (*s*) simpleto; (*ss*), sobreposição de sinal e (*J*), constante de acoplamento. Fonte: Autor, 2019, com base nos dados de Shibuya et al. (2008) e Nurnberg et al. (1998).

Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do OBac.



Fonte: Autor, 2019.

Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do OBac.



Fonte: Autor, 2019.

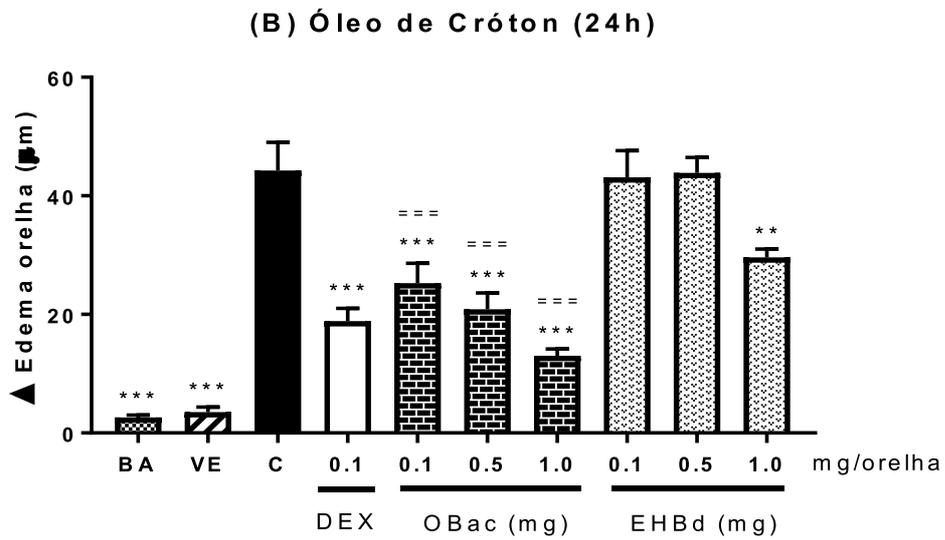
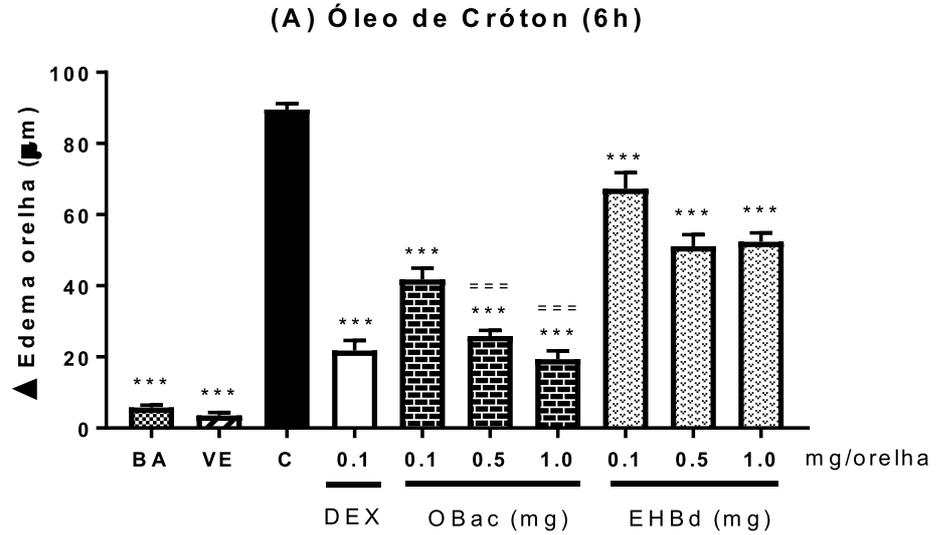
4.4. ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIAS TÓPICAS DO EHBd E OBac

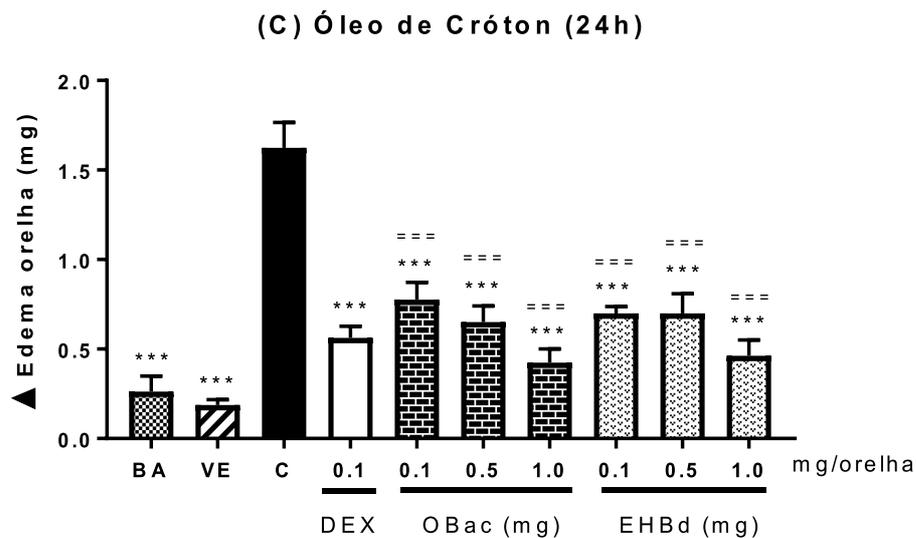
4.4.1. Efeitos do EHBd e OBac no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton

Como o esperado, a aplicação tópica do óleo de cróton 2,5 % na orelha dos camundongos promoveu aumento da espessura das orelhas (Figura 26A), enquanto o glicocorticoide dexametasona (0,1 mg/mL), utilizado como controle positivo, reduziu a espessura das orelhas inflamadas em $76,84 \% \pm 3$ após 6 h de realização do ensaio, quando comparada ao controle negativo. Já EHBd, nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, foi capaz de reduzir em $22,03 \% \pm 5$; $43,50 \% \pm 4$ e $43,50 \% \pm 3$, respectivamente ($P < 0,001$), a espessura das orelhas inflamadas, enquanto o triterpeno OBac promoveu a redução foi de $54,80 \% \pm 4$; $68,36 \% \pm 2$ e $79,10 \% \pm 3$ nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, a espessura após 6h de realização do ensaio.

Após 24 h, a dexametasona (0,1 mg/mL) reduziu a espessura em $55,13 \% \pm 5 \%$, enquanto EHBd foi observada redução significativa apenas na dose de 1,0 mg/orelha ($23,08 \% \pm 3$). Por outro lado, após 24h, o triterpeno OBac foi capaz de reduzir em $26,92 \% \pm 8$; $56,41 \% \pm 6$ e $64,10 \% \pm 3$ ($P < 0,001$) a espessura quando administrado nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente (Figura 26B). Com relação ao peso da orelha após 24 h, a dexametasona foi capaz de reduzir em $63,64 \% \pm 4$, enquanto o EHBd e o triterpeno OBac provocaram reduções próximas a 50 % na dose 0,1 mg/orelha, 60 % e 70 % nas doses de 0,5 e 1,0 mg/orelha. Vale ressaltar ainda que, de acordo com os dados obtidos, OBac não demonstrou diferença significativa nos resultados comparados a dexametasona (0,1 mg/mL) nas avaliações de espessura de 6 h nas doses de 0,5 e 1,0 mg/orelha, de 24 h nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha e no peso após 24 h nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, nesta última EHBd também demonstrou não ter diferença estatística significativa de resultados comparados a dexametasona 0,1 mg/orelha (Figura 26C). Além disso, o veículo utilizado (acetona 100 %) não foi capaz de promover a formação de edema.

Figura 26: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por óleo de cróton.





Legenda: ▲ **Edema de orelha**: média da diferença entre as medidas de peso e espessura das orelhas direita e esquerda dos camundongos; **BA**: Basal; **VE**: Veículo; **C**: Controle negativo; **DEX**: Dexametasona; **OBac**: Óxido de Baccharis **EHBd**: Extrato Hexânico das Raízes de *B. dracunculifolia*; **A**: Medidas das espessuras após 6 h da indução; **B**: Medidas das espessuras após 24 h; **C**: Medidas dos pesos dos fragmentos das orelhas após 24 h; *** $p < 0,001$; representa o nível de significância em relação ao controle negativo; ### $p < 0,001$ com relação a DEX e === representa que não houve diferença significativa com relação a DEX, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média \pm erro padrão ($n=8$). Fonte: Autor, 2019.

Um dos modelos de inflamação tópica mais utilizados é feito pela indução com óleo de cróton, o qual possui em sua composição vários ésteres derivados do forbol (Diamond et al., 1980), sendo o 12-*O*-tetracanoilforbol-13-acetato (TPA) o principal constituinte. Estes ésteres de forbol são compostos irritantes da pele que promovem sinais inflamatórios cutâneos semelhantes à doença de pele psoríase quando administrados de forma múltipla (indução por aplicação múltipla) (Stanley et al., 1991). Em indução simples a aplicação tópica de óleo de cróton induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema já nas primeiras duas horas, seguido do aumento da espessura da orelha atingindo um o pico máximo 6 h após indução e depois tende a diminuir. Apesar da aderência dos leucócitos polimorfonucleares na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos ser observada entre a 4^a e 6^a h, a infiltração máxima de dessas células no tecido é atingida somente 24 h após a aplicação tópica do óleo de cróton (Young et al., 1983).

O mecanismo pelo qual o óleo de cróton promove a inflamação, está ligado ao seu principal componente, o TPA, que promove a ativação da PKC, e consequentemente a via da MAP quinase (MAPK), FLA₂, indução da expressão da COX-2 e ativação da LOX, que por sua vez libera diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema,

migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular quando aplicado múltiplas vezes (Murakawa et al., 2006; De Bernardis et al., 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC, promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B e a AP-1, os quais desenvolvem um papel central na regulação e produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, como citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (Pascual e Glass, 2006; Glass e Ogawa, 2006; Sanchez & Moreno, 1999). A fosforilação da FLA₂ pela PKC resulta na liberação do AA seguida da produção de prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT) via COX e LOX, respectivamente (Wang et al., 2000; Young et al., 1984). O aumento dos níveis teciduais dos metabólitos do AA, principalmente a PGE₂ e o LTB₄ parece ser o ponto chave para que o processo inflamatório se inicie após aplicação do óleo de cróton (Murakawa et al., 2006).

Nakamura et al. (2003) sugerem que os metabólitos do AA, produzidos via 5-LOX, são moléculas fundamentais para a formação do edema e infiltração leucocitária nesse modelo, considerando que a PGE₂ contribui no aumento do fluxo sanguíneo por meio de sua ação vasodilatadora, enquanto os produtos via LOX (LT) são necessários para o extravasamento plasmático e consequente formação do edema e infiltração leucocitária (Young et al., 1984). Assim sendo, é certo que os metabólitos do ácido araquidônico (AA) são os principais mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo óleo de cróton e, por isso, compostos capazes de inibir a cascata do AA se mostram ativos no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, como efetivamente demonstrado pelos corticóides, inibidores da FLA₂ e inibidores da COX e/ou LOX (Gábor, 2000). Da mesma forma que esses agentes anti-inflamatórios, a aplicação tópica do EHBd, bem como do composto isolado (OBac) proveniente desse extrato também preveniram de forma significativa a formação do edema após a indução do processo inflamatório com óleo de cróton. Além disso, a ação antiedematogênica do OBac apresentou eficácia comparável ao corticóide dexametasona na dose de 1,0 mg/orelha neste modelo.

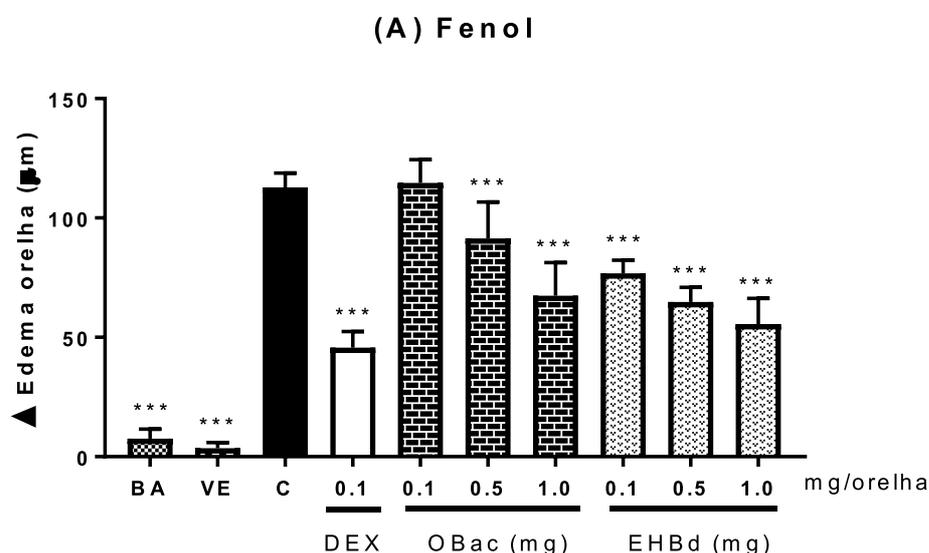
4.4.2. Efeitos do EHBd e OBac no modelo de edema induzido por fenol

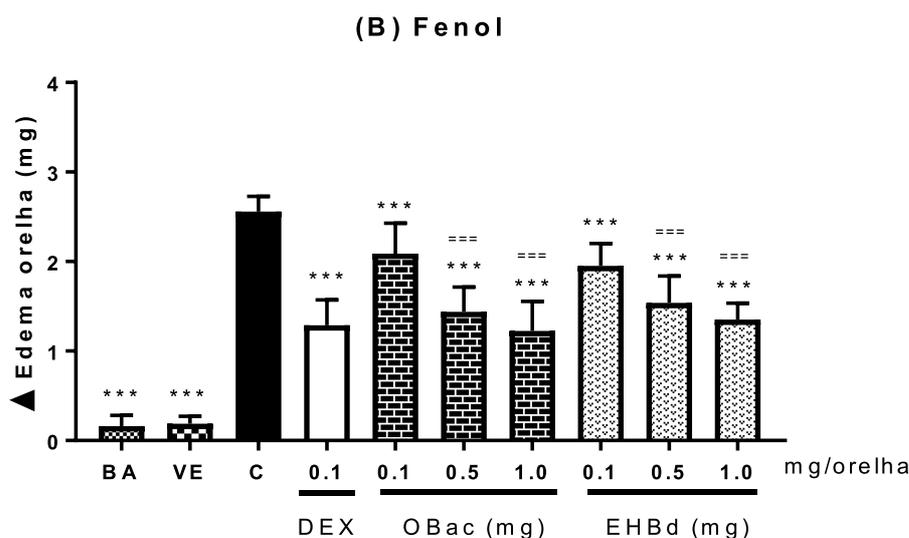
Considerando a possibilidade de ação das amostras via mediadores mais específicos, outros experimentos foram realizados utilizando modelos similares com diferentes agentes flogísticos, sendo um desses agentes o fenol, o qual é muito utilizado em experimentos que

mimetizam a dermatite de contato, produzindo irritação imediata e gerando edema maciço em cerca de 2 h (Lim et al 2004).

Nesse sentido, avaliou-se a formação de edema nas orelhas dos camundongos após 2 h da indução. O controle positivo (dexametasona 0,1 mg/orelha) apresentou regressão da inflamação em $61,23 \% \pm 2$, sendo capaz de inibir o aumento do edema. EHBd nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, apresentou reduções de espessura de $34,80 \% \pm 2$, $41,41 \% \pm 2$ e $55,07 \% \pm 4$, e o triterpeno isolado (OBac) $20,26 \pm 5$ e $42,73 \pm 4$ nas doses de 0,5 e 1,0 mg / orelha (Figura 27A). Já em relação as medidas de peso neste ensaio, a dexametasona foi capaz de reduzir a formação do edema em $44,00 \% \pm 4$, enquanto o EHBd apresentou redução de $24,00 \% \pm 4$, $42,00 \% \pm 4$ e $48,00 \% \pm 3$, e o triterpeno OBac $12,00 \% \pm 5$, $46,00 \% \pm 4$ e $56,00 \% \pm 5$ nas três doses testadas respectivamente (Figura 27B). Deve-se destacar nesse ensaio que o EHBd e OBac nas doses de 0,5 e 1,0 mg/orelha, apresentaram resultados estatisticamente semelhantes à dexametasona 0,1 mg/orelha utilizada como controle positivo em relação ao peso das orelhas.

Figura 27: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por fenol.





Legenda: Δ **Edema de orelha**: média da diferença entre as medidas de peso e espessura das orelhas direita e esquerda dos camundongos; **BA**: Basal; **VE**: Veículo; **C**: Controle negativo; **DEX**: Dexametasona; **O Bac**: Óxido de Baccharis **EHBd**: Extrato Hexânico das Raízes de *B. dracunculifolia*; **A**: Medidas das espessuras após 2 h; **B**: Medidas dos pesos dos fragmentos das orelhas após 2 h; *** $p < 0,001$; representa o nível de significância em relação ao controle negativo e === representa que não houve diferença significativa com relação a DEX, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média \pm erro padrão (n=8). Fonte: Autor, 2019.

Os compostos fenólicos estão ligados a efeitos tóxicos cutâneos de dermatites desencadeadas pelo contato da pele com materiais como tintas, resinas, cosméticos e medicamentos (Murray et al., 2007). Os mecanismos pelos quais isso ocorre não estão totalmente elucidados. No entanto, o principal mediador da manutenção da resposta inflamatória nesse caso parece ser o estresse oxidativo estabelecido pela oxidação dos compostos fenólicos, por meio da ação de diversas enzimas teciduais (peroxidases, tirosinases e prostaglandina H sintases), as quais atuam sobre a molécula irritativa (fenol), promovendo sua oxidação em um radical fenoxil, que apesar de ser menos reativo que outros radicais, é instável, o que faz com que reaja com componentes do tecido cutâneo à toxicidade. Esse efeito é agravado pela ação dos tióis (componentes do mecanismo de defesa antioxidante) presentes na pele, que reduzem os radicais fenoxil recuperando os compostos fenólicos, os quais ficam expostos à ação das enzimas teciduais novamente, formando um ciclo que sustenta a contínua formação de radicais livres (Murray et al., 2007; Wilmer et al., 1994).

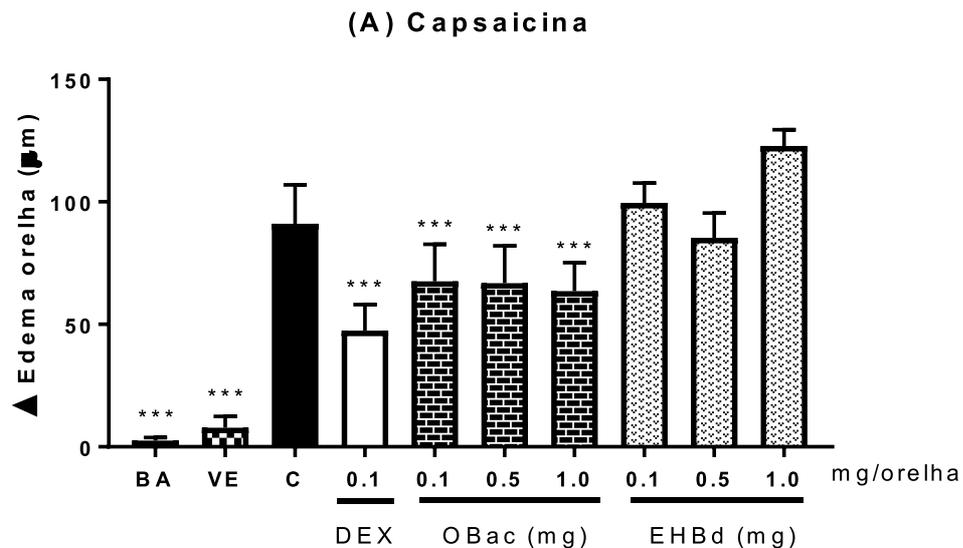
Esse modelo é de grande importância, uma vez que o fenol mimetiza processos inflamatórios cutâneos que ocorrem com a exposição a agentes irritantes no dia a dia. Desta maneira, os mecanismos pelos quais o EHBd e OBac exercem suas atividades anti-inflamatórias

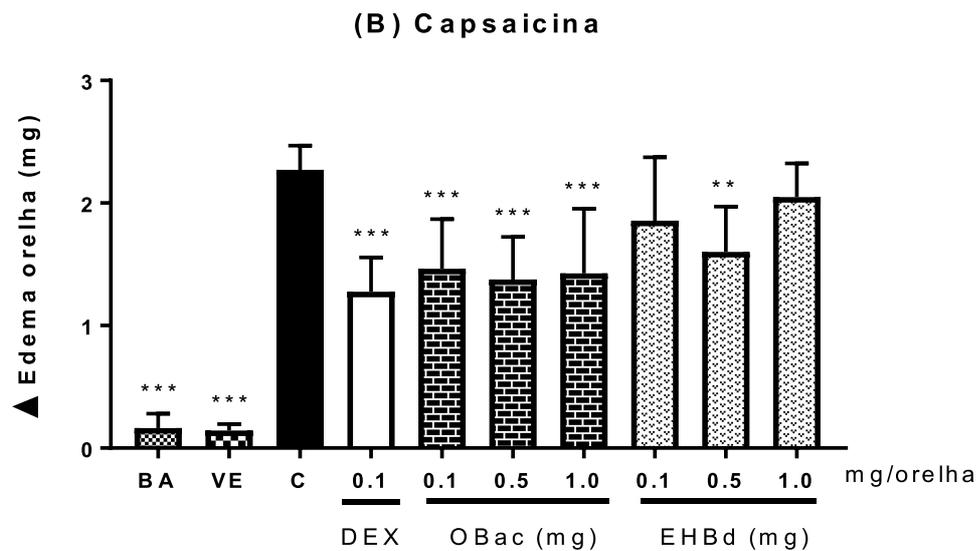
parecem ser amplos, uma vez que a aplicação tópica das duas amostras foi bastante eficaz em reduzir a resposta inflamatória desencadeada por ambos agentes flogísticos principalmente nas doses de 1,0 mg/orelha.

4.4.3. Efeito do EHBd e OBac no modelo de edema induzido por capsaicina

Além dos modelos citados anteriormente, foi realizado um experimento utilizando o agente flogístico capsaicina (8-metil-*N*-vanilil-6-nonenamida) como indutor de edema. A análise dos dados obtidos sobre o composto isolado (OBac) evidencia redução da espessura de $29,10 \pm 6$, $24,87 \pm 6$ e $29,10 \pm 5$ nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg / orelha respectivamente, O EHBd não apresentou atividade significativa em relação ao controle negativo (Figura 28A). Já na avaliação do peso das orelhas EHBd apresentou redução da massa em relação ao controle negativo em $17,39 \pm 8$, $23,91 \pm 6$ e $8,70 \pm 4$ nas três doses testadas, e o OBac demonstrou uma redução de $39,13 \pm 6$, $39,13 \pm 5$ e $34,78 \pm 5$ respectivamente (Figura 28B). A dexametasona (0,1 mg/orelha) apresentou redução na espessura de $54,50 \pm 4$ e peso de $45,65 \pm 4$ com relação ao controle negativo.

Figura 28: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por capsaicina.





Legenda: ▲ **Edema de orelha**: média da diferença entre as medidas de peso e espessura das orelhas direita e esquerda dos camundongos; **BA**: Basal; **VE**: Veículo; **C**: Controle negativo; **DEX**: Dexametasona; **OBac**: Óxido de Baccharis **EHBd**: Extrato Hexânico das Raízes de *B. dracunculifolia*; **A**: Medidas das espessuras após 1 h; **B**: Medidas dos pesos dos fragmentos das orelhas após 1 h; *** $p < 0,001$ representa o nível de significância em relação ao controle negativo, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média \pm erro padrão ($n=8$). Fonte: Autor, 2019.

Desde a década de 40, a capsaicina tem sido descrita por muitos pesquisadores, como um agente capaz de induzir resposta inflamatória em modelos animais (Gábor, 2000). Quando aplicada topicamente, observa-se uma resposta inflamatória neurogênica imediata que se caracteriza por extravasamento plasmático e consequente formação de edema. A capsaicina exerce seus efeitos sobre um alvo específico, os receptores TRPV1, localizados em fibras aferentes primárias do tipo C e parte das fibras do tipo A δ (nociceptores) entre outros locais, produzindo uma resposta inflamatória rápida por meio da liberação de neuropeptídeos (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP, substância P - SP, taucinininas e as monoaminas) ocasionando a dor neurogênica (Bouclier et al., 1990; Gábor e Razga, 1992). De acordo com a literatura (Erjavec et al., 1981 e Fewtrell, 1982), a SP induz a resposta inflamatória pelo aumento da permeabilidade vascular diretamente pela liberação de aminas vasoativas de mastócitos, bem como pela ativação de receptores NK1. Já a serotonina produz o extravasamento plasmático pela ação direta na microvasculatura, induzindo a vasodilatação via receptor 5-HT1 sobre os vasos sanguíneos (Jazayeri et al., 1989). Em nosso estudo, o EHBd demonstrou ser efetivo nesse modelo de inflamação, enquanto o OBac não foi capaz de inibir o edema induzido pela capsaicina, sugerindo que o extrato possa ter uma possível ação de

analgesia em caso de inflamações neurogênicas. Por outro lado, o composto isolado OBac parece não ter ação sobre receptores específicos da via inflamatória desencadeada pela administração tópica de capsaicina.

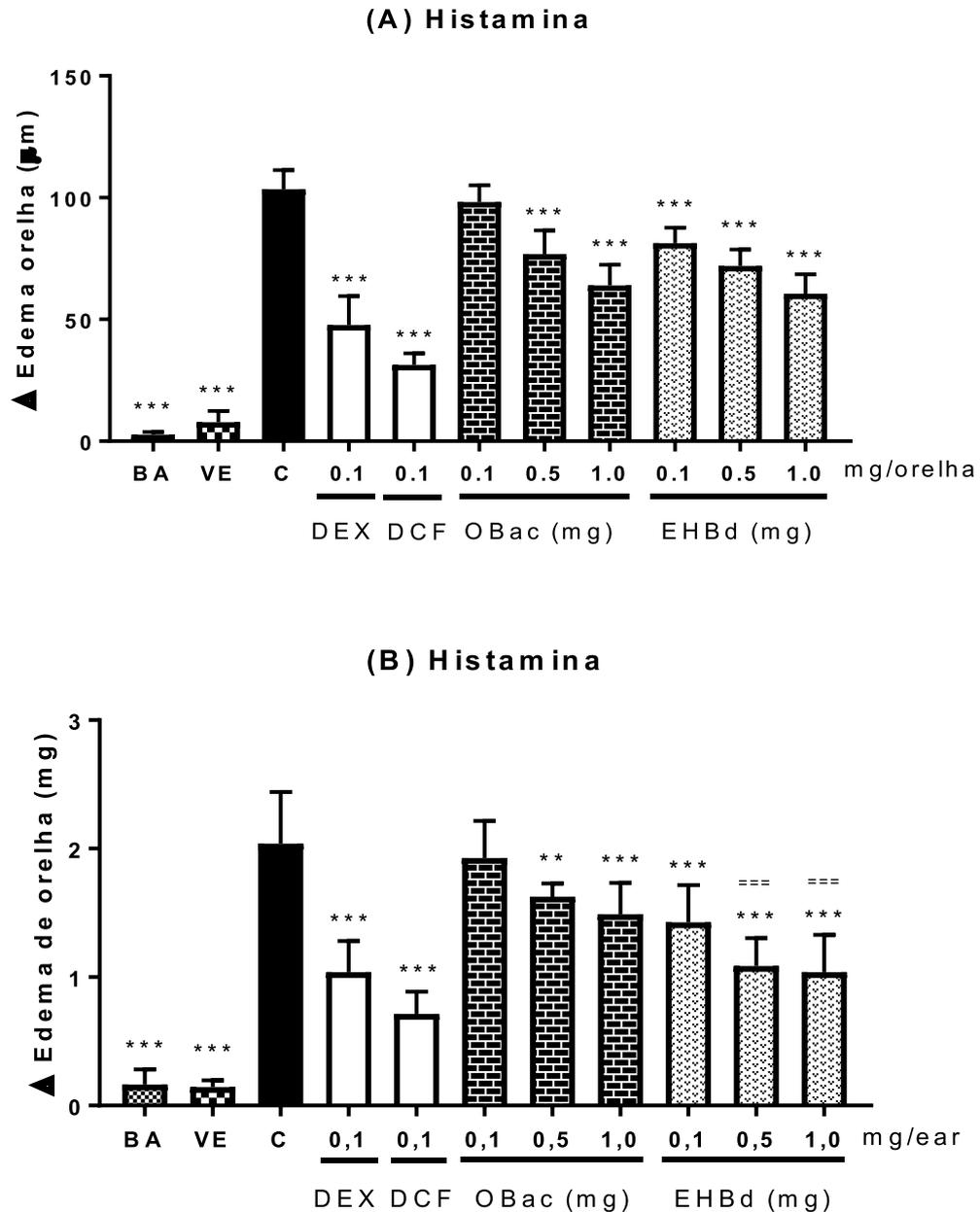
4.4.4. Efeito do EHBd e OBac no modelo de edema induzido por histamina

Com intuito de avaliar outras possibilidades de mecanismo de ação anti-inflamatória, tanto o extrato bruto (EHBd) quanto o OBac foram testados no modelo de indução por histamina, sendo as medidas realizadas após 1 h e 30 min da indução, utilizando neste modelo como controles positivos dois agentes anti-inflamatórios, o glicocorticoide dexametasona (0,1 mg/orelha) e o anti-histamínico de referência dexclorfeniramina (DCF) (0,1 mg/orelha).

A análise dos dados obtidos mostra que, por meio da avaliação da espessura das orelhas, a dexametasona foi capaz de reduzir em $55,50 \% \pm 4$ a formação do edema, enquanto a DCF reduziu em $69,38 \% \pm 2$ (Figura 29A). Por outro lado, o tratamento tópico com o extrato EHBd, nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, promoveu a redução significativa da formação do edema induzido por histamina em $20,57 \% \pm 2$, $29,19 \% \pm 2$ e $36,36 \% \pm 3$, respectivamente. Já o triterpeno Obac foi capaz de reduzir significativamente a espessura das orelhas em $7,66 \% \pm 2$, $21,53 \% \pm 3$ e $45,45 \% \pm 3$ nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente.

Com relação às medidas de peso para avaliação da redução do edema, a dexametasona e a DCF apresentaram redução de $47,50 \% \pm 4$ e $62,50 \% \pm 3$, respectivamente, enquanto o extrato EHBd apresentou redução de $32,50 \% \pm 5$, $45,00 \% \pm 4$ e $47,50 \% \pm 5$ nas três doses administradas e o triterpeno OBac redução de $20,00 \% \pm 2$ e $27,50 \% \pm 4$ somente nas duas maiores doses avaliadas (Figura 29B).

Figura 29: Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do EHBd e OBac frente a indução por histamina.



Legenda: **Δ Edema de orelha:** média da diferença entre as medidas de peso e espessura das orelhas direita e esquerda dos camundongos; **BA:** Basal; **VE:** Veículo; **C:** Controle negativo; **DEX:** Dexametasona; **OBac:** Óxido de Baccharis **EHBd:** Extrato Hexânico das Raízes de *B. dracunculifolia*; **A:** Medidas das espessuras após 1 h e 30 min; **B:** Medidas dos pesos dos fragmentos das orelhas após 1 h e 30 min; *** $p < 0,001$; representa o nível de significância em relação ao controle negativo e \equiv representa que não houve diferença significativa com relação a DEX, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média \pm erro padrão (n=8). Fonte: Autor, 2019.

Reações imediatas do tipo alérgica em resposta a diversos alérgenos são desencadeadas por mastócitos, os quais, por meio da interação dos seus receptores de superfície com a IgE, conduzem a degranulação e liberação de diversos mediadores vasoativos pró-inflamatórios e nociceptivos, como a histamina, citocinas (IL-6, IL-8, IL-13), prostaglandinas (PGD₂), leucotrienos (LTC₂), TNF- α e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Theoharis et al., 2007). A histamina estimula fibras nervosas sensitivas por meio de mecanismos H₁-dependentes que resulta em prurido. Uma das principais funções fisiopatológicas da histamina é a sua ação como mediador das reações de hipersensibilidade como a urticária. A liberação desse mediador causa vasodilatação e um aumento na permeabilidade vascular, promovendo, assim, uma resposta edematogênica (Rang et al., 2007; Brand et al., 2002). Comparativamente, o EHBd apresenta um efeito antiedematogênico melhor em relação ao OBac na resposta inflamatória cutânea induzida da histamina. Dessa maneira, este extrato poderia ser útil no alívio de alguns sintomas da hipersensibilidade imediata, como o prurido presente em algumas situações como picadas de insetos e contato com alérgenos oriundos de plantas por exemplo. No entanto, para tal indicação ainda é necessário a realização de experimentos adicionais que confirmem sua atividade antipruriginosa. Os resultados sugerem ainda que tanto o EHBd quanto o OBac possuem relação de dose-dependência quando observado as medidas de espessura, sugerindo que podem interferir no processo inflamatório por essa via.

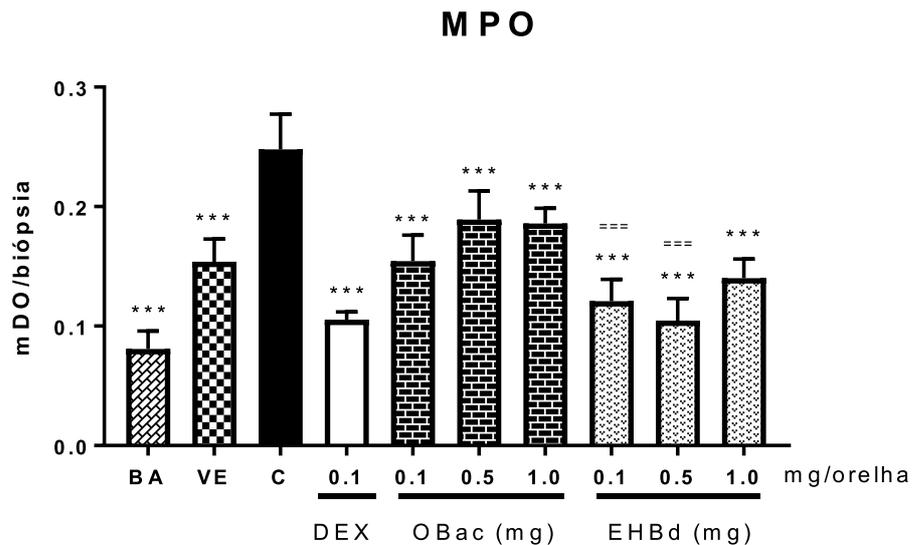
4.4.5. Influência do EHBd e OBac na atividade de MPO

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos intracelulares de neutrófilos e sua atividade é considerada um marcador enzimático da infiltração de células polimorfonucleadas (especialmente neutrófilos) no tecido submetido a inflamação (Lloret e Moreno, 1995). Uma vez no local inflamado, os neutrófilos liberam uma variedade de substâncias, tais como EROs, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, como a MPO, contribuindo de forma significativa na manutenção do processo inflamatório (Bradley et al., 1982).

Considerando a importância desta atividade na avaliação da inibição de processos inflamatórios, as medidas da atividade de MPO foram realizadas a partir do material obtido nas biópsias de orelhas dos animais submetidos a inflamação induzida por óleo de cróton. Como mostrado na figura 30, o tratamento tópico com dexametasona (0,1 mg/orelha) foi capaz de diminuir a atividade da MPO em 57,64 % \pm 1. Já o triterpeno OBac foi capaz de diminuir a

atividade da MPO em $34,30 \% \pm 4$; $23,55 \% \pm 5$ e $22,31 \% \pm 3$ nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, enquanto o EHBd reduziu em $51,24 \% \pm 4$ (0,1 mg/orelha); $56 \% \pm 4$ (0,5 mg/orelha) e $43,60 \% \pm 3$ (1 mg/orelha) a atividade da MPO.

Figura 30: Avaliação de atividade enzimática de MPO no tratamento tópico com EHBd e OBac nas orelhas inflamada dos camundongos induzidas por óleo de cróton.



Legenda: **BA:** Basal; **VE:** veiculo; **C:** controle negativo; **DEX:** dexametasona; **OBac:** óxido de baccharis e **EHBd:** extrato hexânico de *B. dracunculifolia*; *** $p < 0,001$; representa o nível de significância em relação ao controle negativo e === representa que não houve diferença significativa com relação a DEX, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média ± erro padrão (n=8). Fonte: Autor, 2019.

Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a migrar para a região exposta ao estímulo nocivo. Esse processo envolve uma interação complexa dos leucócitos com o endotélio através da expressão de moléculas de adesão de superfície (selectinas, ICAM e integrinas), sendo também facilitado pela ação de agentes quimiotáticos, como a IL-8, C5a e LTB4 (Rang et al., 2007; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Arnhold, 2003). Esse tipo celular é importante no controle da invasão de patógenos, no entanto, sua ativação inadequada pode causar lesões teciduais e contribuir para o processo inflamatório exagerado (Hurtado-Nedelec et al., 2014). A MPO, encontrada principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, é uma enzima de grande importância na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. Esta enzima transforma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é formado durante o metabolismo oxidativo, em ácido hipocloroso (HOCl), quando em contato com íons Cloro (Cl^-). O HOCl é um oxidante

altamente tóxico, que uma vez produzido no interior dos fagossomos, tornam-se uma arma potente contra patógenos (Aratani et al., 1999; Guilpain et al., 2008). A aplicação do óleo de cróton aumenta de forma gradual os níveis da enzima MPO e a inibição de sua atividade, promovida pela administração de um determinado composto, pode ser decorrente da redução do recrutamento de neutrófilos no tecido inflamado, da inibição direta desta enzima ou ainda da redução da disponibilidade de seu substrato (H_2O_2) (Arnhold, 2003). A MPO também catalisa a formação de hipotiocianato e promove a oxidação de grupamentos fenol e anilina. As células endoteliais também sofrem efeito da MPO, pois se a enzima internalizar na célula, produzirá oxidantes intracelulares, podendo contribuir para o aumento do dano tecidual nos processos inflamatórios. Esses são alguns dos motivos pelos quais vem sendo associada à MPO a diversas situações patológicas, principalmente nas que existe um processo inflamatório mediado por neutrófilos (Aratani et al., 1999; Guilpain et al., 2008).

Assim, se a migração dos neutrófilos para a área inflamada for diminuída ou a enzima for inibida haverá diminuição dos danos causados nos tecidos por enzimas hidrolíticas e por espécies reativas (Garrido et al., 2004). O OBac e principalmente o EHBd apresentaram atividade de inibição do aumento da atividade da enzima MPO no modelo de inflamação cutânea aguda induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton, inferindo que ambos são capazes de diminuir sua atividade no pico máximo de infiltrados de leucócitos (24 h), sugerindo, assim, que possa ter ocorrido um mecanismo inibitório que chegam próximos dos níveis basais (EHBd 0,1 e 0,5 mg/orelha).

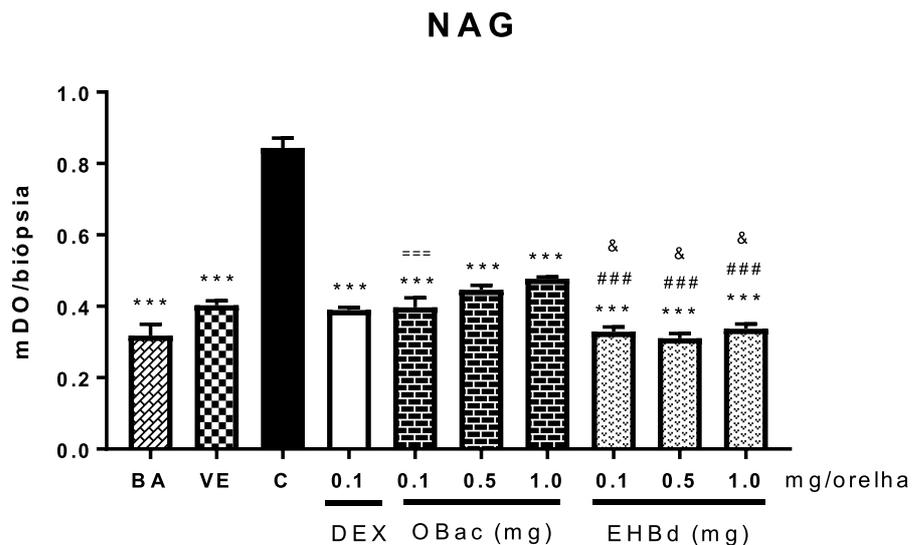
4.4.6. Influência dos EHBd e OBac na atividade de NAG

A infiltração de leucócitos mononucleares é geralmente avaliada em modelos de indução feitos por aplicações múltiplas de um determinado agente flogístico, principalmente do óleo de cróton. A NAG é uma enzima lisossomal produzida por macrófagos ativados, cuja medida de atividade é considerada um indicador indireto da presença de células mononucleares no local afetado pela inflamação (Barcelos et al., 2004, Bailey, 1988). Apesar dessas células poderem ser encontradas na inflamação aguda, a elevação da NAG é uma característica da inflamação crônica (Iqbal et al., 2008).

Neste sentido, para fins de avaliação sobre a infiltração desse tipo celular, a atividade NAG também foi avaliada (24 h após a indução e tratamento). Como podemos observar na figura 31, a dexametasona (0,1 mg/orelha) apresentou 53,84 % de inibição da atividade de

NAG, enquanto o extrato EHBd apresentou um percentual de inibição da atividade de NAG ao redor de 60 (60,76) % para todas as doses administradas. Já o triterpeno OBac mostrou inibição de 52,90 % \pm 2, 46,57 % \pm 1 e 43,62 % da atividade de NAG nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente (Figura 31).

Figura 31: Avaliação de atividade enzimática de NAG no tratamento tópico com EHBd e OBac nas orelhas inflamadas dos camundongos induzidas por óleo de cróton.



Legenda: **B:** Basal; **VE:** veiculo; **C:** controle negative; **DEX:** dexametasona; **OBac:** óxido de baccharis e **EHBd:** extrato hexânico de *B. dracunculifolia*; ; *** $p < 0,001$; representa o nível de significância em relação ao controle negativo; ### $p < 0,001$ com relação a DEX; === representa que não houve diferença significativa com relação a DEX e & representa que não houve diferença significativa com relação ao basal, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média \pm erro padrão ($n=8$). Fonte: Autor, 2019.

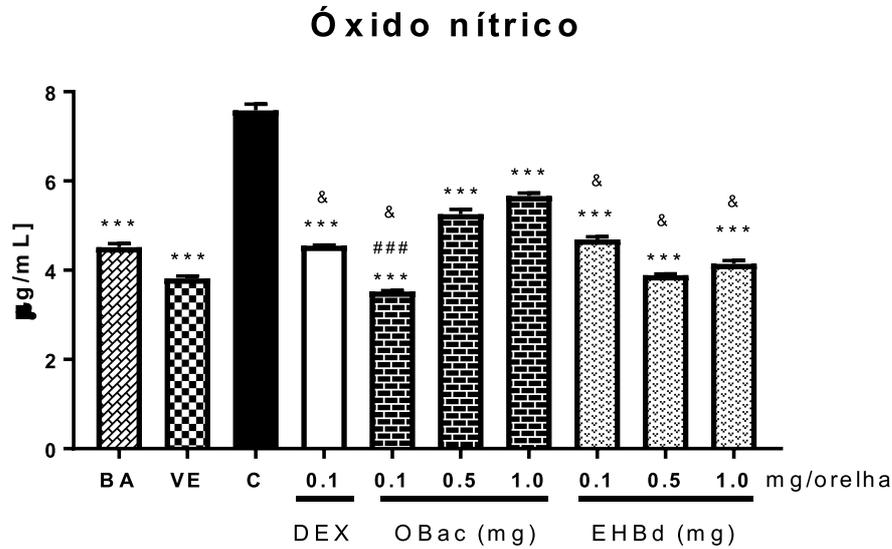
Além do acúmulo de neutrófilos, o acúmulo de leucócitos mononucleares é também uma característica comum do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, sendo ambos consequência do aumento dos níveis de eicosanoides e da expressão da COX-2 (Sánchez e Moreno, 1999; Gàbor, 2000). A NAG é uma enzima lisossomal produzida por monócitos ativados, principalmente macrófagos. Em um processo crônico o principal tipo celular observado são as células mononucleares (Bailey, 1988) que, uma vez ativados, sofrem degranulação, promovendo a liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina, serotonina), citocinas e quimiocinas, assim como mediadores lipídicos. Esses mediadores promoverão o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, o que leva a sustentação do processo (Lawrence e Gilroy, 2007). A inibição de

forma significativa a atividade da NAG, parece ser mais uma ação anti-inflamatória importante do extrato EHBd e do composto isolado OBac. O extrato (EHBd) demonstrou ainda uma diminuição da atividade de NAG menor que a do controle positivo nas 3 doses, e OBac na dose de 0,1 mg/orelha demonstrou um resultado estatisticamente igual à dexametasona 0,1 mg/orelha, sugerindo que, tanto o EHBd quanto o triterpeno OBac possuem uma ótima atividade frente a esta enzima no ensaio avaliado após 24 horas de indução por óleo de cróton, evidenciando a possibilidade destas duas amostras terem potencial para tratar inflamações crônicas, que envolvem alta atividade de macrófagos, principais possuidores dessa enzima.

4.4.7. Influência dos EHBd e OBac no doseamento de NO

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir de vários tipos celulares envolvidos na resposta imune e inflamatória, sendo uma isoforma da enzima óxido nítrico sintetase (NOX-2 ou *i*NOS) a principal envolvida nessa produção. O NO é uma substância humoral lábil, responsável pela atividade do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) e causa vasodilatação relaxando o músculo liso vascular via estimulação da guanilato ciclase solúvel. Pode ser formado em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) ou citocinas e, além disso, agentes flogísticos (óleo de cróton, carragenina) e mediadores inflamatórios (leucotrieno B4) induzem ou aumentam a formação e liberação de NO a partir de células PMNs. Dessa forma, no local de uma reação inflamatória aguda, todas as condições são atendidas para a geração de NO e para um papel desse composto como mediador inflamatório (Ialenti, 1992). Em inflamações crônicas (como artrite, gastrite ou doença inflamatória intestinal, por exemplo) a inibição da produção de NO resulta em benefícios (Weinberg, 2000). Como observado na figura 32, a dexametasona (0,1 mg/orelha) apresentou redução de 39,73 % na produção de NO, enquanto o extrato EHBd inibiu em 38,21%, 48,71 % e 44,66 ± 1 % nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente. Já o triterpeno isolado Obac apresentou redução de 53,27 %, 30,42 % ± 1 e 38,21 % nas doses de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente.

Figura 32: Doseamento de NO no tratamento tópico com EHBd e OBac nas orelhas inflamada dos camundongos induzidas por óleo de cróton.



Legenda: **BA:** Basal; **VE:** veiculo; **C:** controle negativo; **DEX:** dexametasona; **OBac:** óxido de baccharis e **EHBd:** extrato hexânico de *B. dracunculifolia*; *** $p < 0,001$; representa o nível de significância em relação ao controle negativo; ### $p < 0,001$ com relação a DEX; = representa que não houve diferença significativa com relação a DEX e & representa que não houve diferença significativa com relação ao basal, segundo análises estatísticas ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls feitas no programa GraphPad Prism 7. Cada barra representa a média \pm erro padrão (n=8). Fonte: Autor, 2019.

O NO é uma pequena molécula sintetizada por diferentes tipos de células em vários tecidos. Exerce múltiplas funções fisiológicas dentre as quais está a participação na resposta contra patógenos, controle da pressão arterial, da circulação sanguínea, da função das plaquetas e ainda, da neurotransmissão no SNC e nervos periféricos (Bogdan et al., 2000).

MacMiking e colaboradores (1997), descreveram a participação do NO na função dos macrófagos, em especial, como um produto citostático ou citotóxico contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células tumorais. Isso ocorre porque o NO e suas formas (NO⁺ e NO⁻) são facilmente penetráveis na membrana plasmática e causam a peroxidação lipídica. Para Cuzzocrea (2004), os radicais livres, sobretudo espécies reativas do oxigênio (EROs) e NO, podem funcionar como mediadores da inflamação e/ou destruição de tecidos em doenças inflamatórias. Tais reagentes são capazes de induzir a morte celular por necrose e, por isso, em alguns casos, a diminuição nos níveis de NO pode ser desejável, por minimizar o dano tecidual.

Este mediador ainda é capaz de inibir a expressão de diferentes genes relacionados a doenças inflamatórias, como os relacionados às quimiocinas, citocinas, ciclo-oxigenase-2

(COX-2) e moléculas de adesão (Colasanti e Persichini, 2000). Além disso, sabe-se que em ambos os processos inflamatórios, agudo ou crônico, o NO exerce grande influência fisiopatológica, alterando a expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular (ICAM) (cuja expressão, em parte, é relacionada à ativação da via NF- κ B) e P-selectinas. Com isso, a interação entre leucócitos e endotélio e a infiltração de leucócitos no tecido inflamado pode ser potencializada na presença de NO (Laroux et al., 2001). Deste modo, o NO está envolvido com vários processos ligados a doenças inflamatórias como psoríase, lúpus sistêmico e choque séptico (El Hilaly et al., 2018).

Embora o NO seja importante na defesa contra organismos infecciosos e regulador de outras atividades funcionais, o mesmo é capaz de causar a morte de muitos tipos de células imunes e inflamatórias. Sua ação também é útil para aumentar a resposta inflamatória em várias doenças, incluindo patologias autoimunes (Coleman, 2001). Assim, a redução da concentração de NO tem uma implicação direta na redução da inflamação e de seu dano. Considerando que o tecido inflamado induzido por óleo de cróton também estimula a produção de NO, podemos observar que, tanto o EHBd quanto o OBac mostraram uma diminuição dos níveis de NO após 24 h da indução na comparação com controle negativo, sendo atingidos os níveis basais nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg / orelha para o EHBd. Já nas doses 0,1 mg/orelha para o OBac e dexametasona (estatisticamente iguais) foram atingidos valores menores que os basais. Assim, pode-se sugerir que estas amostras tem potencial no combate de processos inflamatórios que envolvem esse marcador.

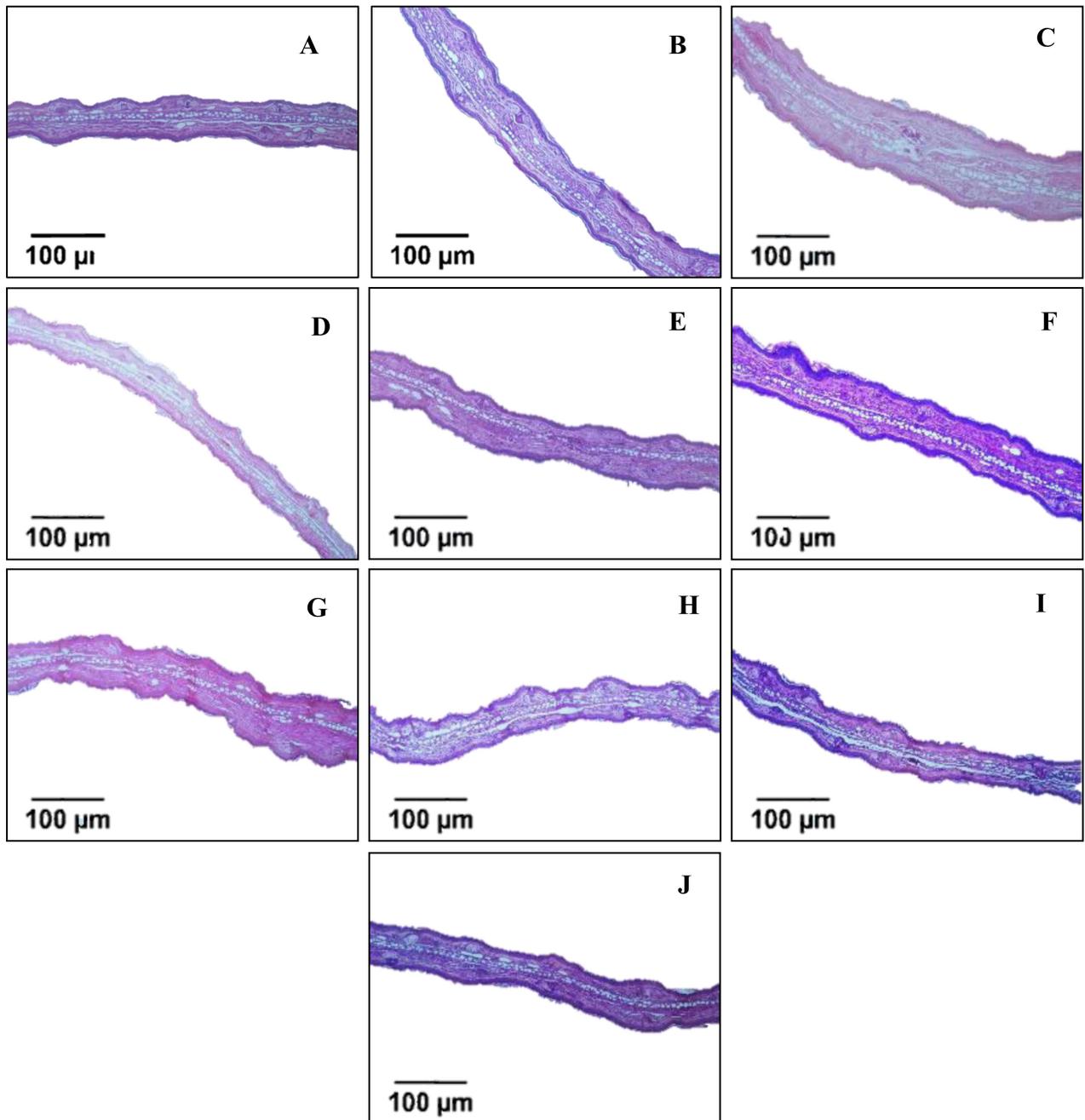
4.4.8. Análise histopatológica dos efeitos do EHBd e OBac

Para a confirmação do efeito anti-inflamatório do extrato bruto e composto isolado, foi feita a análise histológica subjetiva em dois aumentos ópticos (Figura 33 e 34). Considerando os parâmetros do processo inflamatório de uma forma geral, a análise histopatológica e a comparação do tecido auricular obtido das biopsias no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton após 24 horas, o controle negativo apresentou aumento da espessura bem evidenciado, como pode ser visto na figura 32, demonstrando ainda aumento da vasodilatação e infiltrados de células inflamatórias. Por outro lado, o controle positivo (dexametasona 0,1 mg/orelha) demonstra uma diminuição expressiva do edema, da vasodilatação e de infiltrados leucocitários (Figura 34D). No grupo que não houve aplicação do óleo de cróton, os parâmetros inflamatórios não foram alterados (Figura 34A e B).

Já a análise histológica das orelhas tratadas com o EHBd permite evidenciar uma diminuição nos parâmetros, edema e da vasodilatação. Contudo, uma diminuição de menor intensidade em relação ao controle positivo nas três doses testadas, sobretudo na vasodilatação (Figura 34E, F e G).

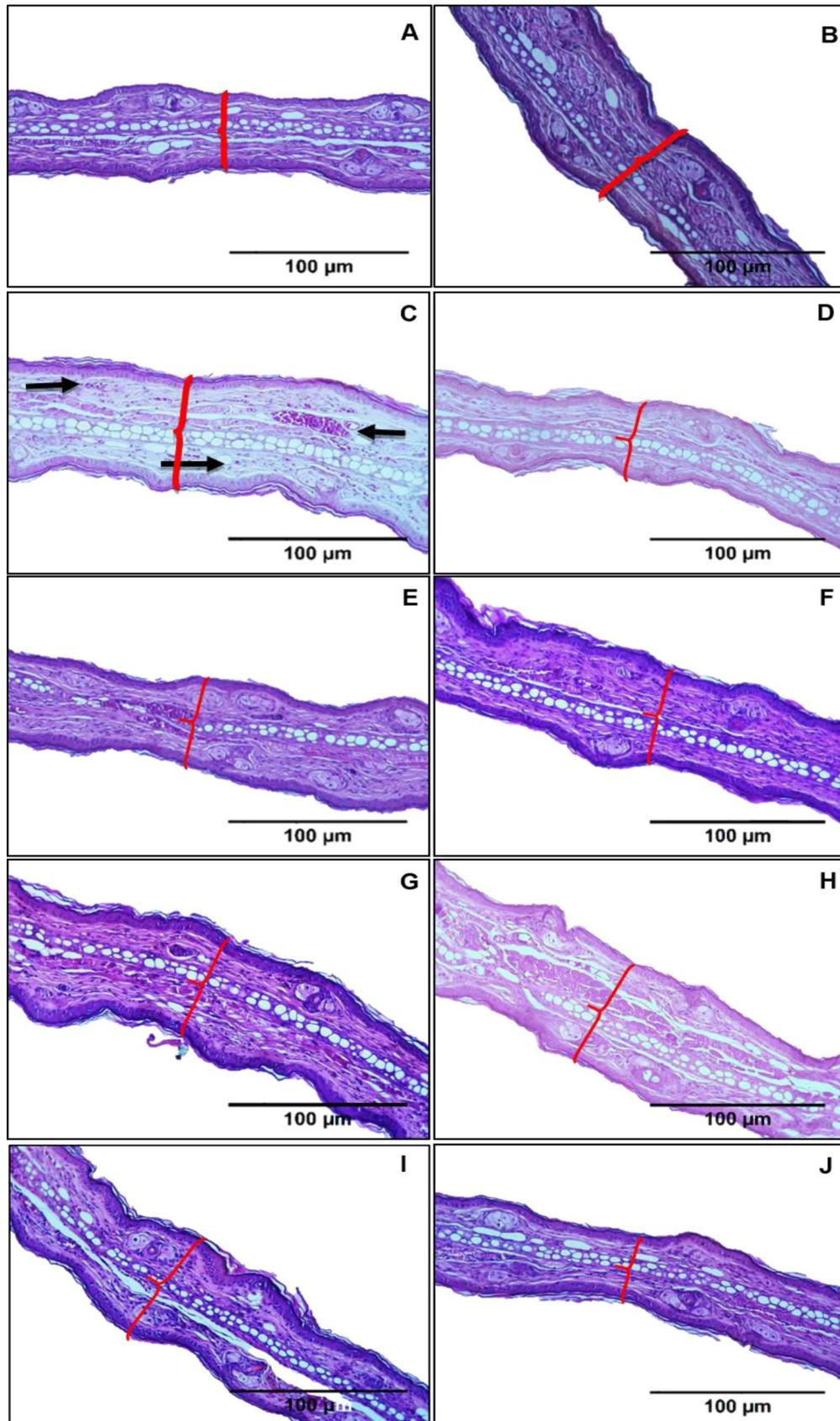
Da mesma maneira, na análise histológica subjetiva das orelhas foi observado que o OBac reduziu a vasodilatação e teve um desempenho melhor sob o parâmetro de espessura e infiltrados de leucócitos se comparado ao desempenho do EHBd, mas não melhor que a dexametasona nas três doses testadas (figura 34H, I e J).

Figura 33: Fotomicrografia de cortes transversais das orelhas inflamadas (modelo de indução com óleo de cróton) após 24 h do tratamento (coloração hematoxilina e eosina a 100x).



Legenda: **A:** Basal; **B:** Veículo (Acetona); **C:** Controle negativo (Solução fisiológica); **D:** Dexametasona 0,1 mg/orelha; **E:** EHBd 0,1 mg/orelha; **F:** EHBd 0,5 mg/orelha; **G:** EHBd 1,0 mg/orelha; **H:** OBac 0,1 mg/orelha; **I:** OBac 0,5 mg/orelha; **J:** 1,0 mg/orelha. Fonte: Autor, 2019.

Figura 34: Fotomicrografia de campos de cortes transversais das orelhas inflamadas (modelo de indução com óleo de cróton) após 24 h do tratamento (coloração hematoxilina e eosina a 200x).

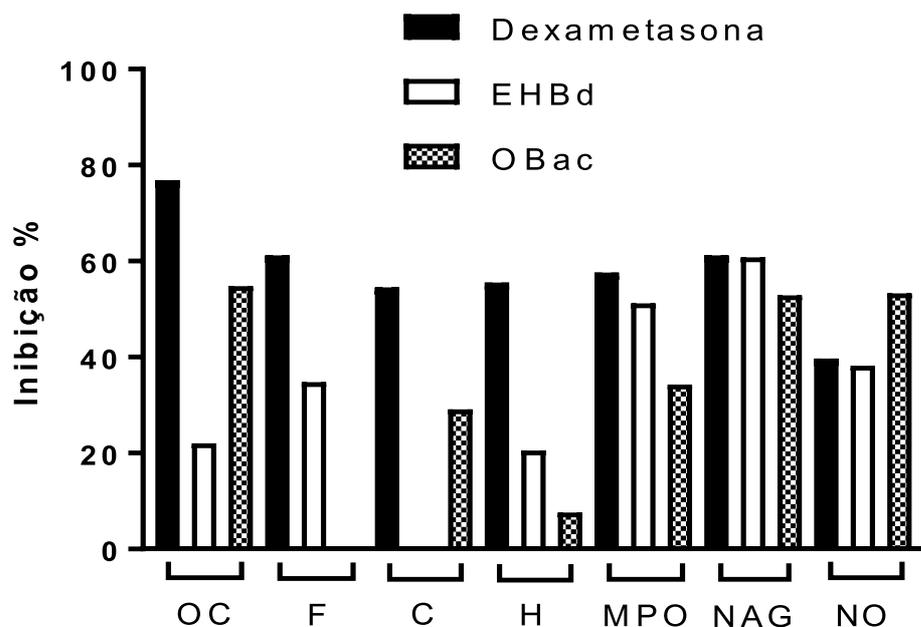


Legenda: **A:** Basal; **B:** Veículo (Acetona); **C:** Controle negativo (Solução fisiológica); **D:** Dexametasona 0,1 mg/orelha; **E:** EHBd 0,1 mg/orelha; **F:** EHBd 0,5 mg/orelha; **G:** EHBd 1,0 mg/orelha; **H:** OBac 0,1 mg/orelha; **I:** OBac 0,5 mg/orelha; **J:** OBac 1,0 mg/orelha. As chaves indicam edema, as setas apontadas para a direita indicam leucócitos na derme e as setas apontadas para a esquerda indicam vasos sanguíneos dilatados. Fonte: Autor, 2019.

Além disso, análises histopatológicas dos cortes transversais do tecido de orelha, obtidos de modelo induzido por óleo de cróton, parecem demonstrar diminuição do edema por EHBd e OBac, pois percebe-se uma pequena redução de espessura da orelha (edema) e diminuição da vasodilatação. Nas amostras oriundas do tratamento com o OBac, através da visualização das lâminas, pode-se perceber também uma ligeira diminuição da presença de infiltrados leucocitários. Contudo, nos ensaios de atividade enzimática frente à MPO e NAG, o extrato EHBd mostrou melhor resultado em relação ao OBac. Uma possível explicação para tal fato poderia ser que, o mecanismo do EHBd possivelmente estaria envolvido na inibição destas enzimas e não no recrutamento das células inflamatórias (que possuem estas enzimas) para o local inflamado.

Considerando todos os ensaios realizados e a melhor visualização da síntese dos seus resultados, bem como o desempenho do EHBd e OBac nos mesmos, a partir das médias de valores que evidenciaram a atividade inibitória das duas amostras, em suas menores doses (0,1 mg/orelha), a figura 35 foi elaborada. Foram considerados dados no pico máximo de inflamação de cada modelo.

Figura 35: Inibição na formação de edema feita pela Dexametasona, EHBd e OBac avaliadas através das medidas de espessura, e inibição das atividades enzimáticas (MPO e NAG) e dosagem de NO na dose 0,1 mg/orelha.



Legenda: OC: edema induzido por óleo de cróton; F: edema induzido por fenol; C: edema induzido por capsaicina; H: edema induzido por histamina; MPO: atividade de mieloperoxidase; NAG: atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase e NO: dosagem de óxido nítrico. Fonte: Autor, 2019.

Com relação aos quatro modelos de inflamação *in vivo* avaliados, na via relacionada ao óleo de cróton, a atividade do OBac (0,1 mg/orelha) na redução do edema foi mais que o dobro em relação ao EHBd nessa dose, sugerindo que este triterpeno possa ser um potencial inibidor da via inflamatória desencadeada pela ação da FLA₂. Apesar do bom resultado obtido, estudos complementares como o modelo de indução inflamatória por aplicação múltipla de óleo de cróton podem dar uma noção maior sobre o verdadeiro potencial das amostras para tratamento de doenças como a psoríase.

Sobre a avaliação feita no modelo induzido por fenol a hipótese de o extrato EHBd conter outras substâncias anti-inflamatórias de diferentes mecanismos de ação é reforçada pelo fato do EHBd ter apresentado resultados bem positivos no ensaio, sugerindo que o extrato EHBd possa agir frente a peroxidases, tirosinases e prostaglandina H sintases, as quais atuam sobre a molécula do fenol. Contudo, mesmo com uma atividade não pronunciada na dose de 0,1 mg/orelha no modelo induzido pelo fenol, de todo modo, o OBac também obteve um resultado considerável nas outras doses, sugerindo que tanto o extrato quanto esta substância possam ter um potencial a ser explorado em inflamações causadas por agentes irritativos que envolvem a peroxidação lipídica (dermatite de contato).

Em contrapartida no ensaio feito por indução com capsaicina, diferentemente do EHBd, o OBac demonstrou uma inibição significativa na formação do edema e inflamação induzidos por capsaicina, a qual é uma via inflamatória que envolve a liberação de neuropeptídeos em fibras aferentes (como o CGRP, substância P, taquicininas e as monoaminas, como a histamina e a serotonina) (Bouclier et al., 1990; Gábor & Razga, 1992), EHBd não apresentou resultados significativos em nenhuma dose neste ensaio. Estes resultados sugerem que o OBac tem potencial para atuar nesta via inflamatória que envolve a liberação de neuropeptídeos e causa dor.

Com relação ao ensaio anti-inflamatório realizado por indução de histamina, o EHBd teve um resultado melhor que OBac nessa dose (0,1 mg/orelha), porém nas outras doses apresentaram resultados semelhantes. Os resultados sugerem que EHBd e o OBac possam atuar em funções fisiopatológicas envolvendo a histamina, a qual executa o papel principal em reações de hipersensibilidade do tipo I, como a urticária (Rang et al., 2007; Brand et al., 2002).

Considerando o modelo de indução feito com óleo de cróton, a atividade de MPO e o processo inflamatório na pele, em doenças inflamatórias cutâneas a presença de um intenso infiltrado leucocitário é bastante marcante como a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos (Nemeth e Mocsai, 2012). Os PMNs, também conhecidos como neutrófilos tem ação primordial na resposta inflamatória aguda, possuindo, para tanto, uma maquinaria especializada

capaz de degradar proteínas reconhecidas como estranhas (Nemeth e Mocsai, 2012). A MPO, encontrada principalmente nos neutrófilos, é responsável por produzir espécies oxidantes altamente tóxicas, que se tornam uma potente arma contra patógenos (Aratani et al., 1999; Guilpain et al., 2008). Dessa maneira, se a enzima internalizar na célula epitelial ela produzirá oxidantes intracelulares no meio intracelular, podendo contribuir para o aumento do dano tecidual nos processos inflamatórios. Assim, de acordo os resultados obtidos no modelo de MPO, o EHBd foi capaz de diminuir a atividade de MPO de maneira mais efetiva que o OBac. Neste sentido e, considerando que nas análises histológicas o extrato EHBd não foi efetivo em reduzir a infiltração de células inflamatórias, sugere-se que o EHBd possa atuar inibindo a enzima MPO ao invés de atuar no recrutamento de células. Por outro lado, apesar do OBac não ter sido tão eficaz em inibir a atividade da MPO quanto a EHBd, as análises subjetivas das lâminas histológicas sugerem que o OBac é mais efetivo em reduzir o infiltrado inflamatório, sugerindo que este triterpeno possa atuar melhor em mecanismos de sinalização do que de inibição enzimática da inflamação.

O acúmulo de neutrófilos, bem como o de leucócitos mononucleares, são características comuns do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, devido ao aumento dos níveis de eicosanoides e da expressão da COX-2 (Sánchez e Moreno, 1999; Gábor, 2000). A NAG é produzida principalmente por macrófagos, que quando ativados, sofrem degranulação promovendo a liberação de inúmeros mediadores inflamatórios. Esses mediadores são responsáveis pelo recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, o que leva a sustentação e cronicidade do processo (Lawrence e Gilroy, 2007). Sendo assim, a medida da atividade da NAG é considerada um indicador indireto da presença de células mononucleares no foco inflamatório (Bailey, 1988). Deste modo, mais uma ação anti-inflamatória importante do EHBd e do composto OBac pode ser relatada, uma vez que os resultados obtidos sugerem que a houve inibição da atividade da NAG, principalmente pelo OBac, porém testes precisam ser feitos para demonstrar mais detalhadamente seu papel em inflamações crônicas e persistentes.

Com relação ao NO, que atua como um produto citostático ou citotóxico contra infecções e células tumorais, que pode também funcionar como mediador da inflamação e/ou destruição de tecidos em doenças inflamatórias, sendo capazes de induzir a morte celular por necrose (MacMiking et al., 1997). Além disso, o NO pode exercer grande influência fisiopatológica, alterando a expressão de moléculas de adesão nos processos inflamatórios agudos ou crônicos, tendo grande importância no processo inflamatório. Este conjunto de ações faz com que seja necessário o controle de sua ação para minimizar o dano tecidual e/ou diminuir a taxa de células

inflamatórias que migram para o tecido através da diapedese consequente a adesão das mesmas nas paredes dos vasos sanguíneos adjacentes ao local lesado (MacMiking et al., 1997). Neste sentido, mais uma vez, tanto o EHBd quanto o OBac demonstraram ser efetivos em reduzir a produção do NO nos tecidos das orelhas inflamadas, sugerindo que ambas as amostras possam ter atividade também na via do óxido nítrico, principalmente o triterpeno OBac.

Portanto, tomados em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o EHBd e o Obac são capazes de reduzir o edema em diversos modelos, comprovando a hipótese de que tanto o extrato hexânico das raízes de *B. dracunculifolia* e o composto OBac isolado possuem propriedades anti-inflamatórias tópicas.

5. CONCLUSÃO

A caracterização química do extrato hexânico de *B. dracunculifolia* (EHBd) por CG-EM evidencia como principal constituinte o óxido de baccharis (OBac), o qual neste trabalho, foi isolado e purificado de forma distinta das previamente reportadas na literatura sendo, posteriormente identificado por técnicas espectroscópicas.

Este é o primeiro relato da atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato hexânico EHBd e do OBac em diversos modelos de inflamação cutânea, sendo o efeito anti-inflamatório relacionado, sobretudo, à inibição da formação de edema e migração leucocitária. Em alguns modelos, este efeito anti-inflamatório alcança níveis próximos aos basais e, estatisticamente, similares ao controle positivo utilizado.

Considerando as possibilidades de mecanismos de ação, o OBac apresenta maior possibilidade de ação nas vias envolvidas com a ativação da PKC e FLA₂, e também age de forma considerável na via da inflamação neurogênica. O OBac e o EHBd também apresentam atividade inibitória frente à ativação de queratinócitos e espécies reativas de oxigênio sem ativação da PKC (modelo de indução por fenol). E além disso, ambas as amostras demonstraram ser ativas na via inflamatória da histamina.

Os resultados obtidos evidenciam que as raízes de *B. dracunculifolia* apresentam potencial para serem exploradas futuramente como matéria-prima para a produção de produtos intermediários e fitoterápico para o tratamento de doenças inflamatórias de pele, considerando também, que podem ser utilizadas para a obtenção de triterpeno com grande potencial anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, n. 1, p. 76-96, 2007.
- ADAMS, R. P. **Identificación of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2012.
- ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. Vatairea macrocarpa (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naun. Schm. Arch Pharmacol.** v. 374, n. 4, p. 275-282, 2007.
- ANTHONSEN, T.; BRUUN, T.; HEMMER, E.; HOLME, D.; LAMVIK, A.; SUNDE, E.; SORENSEN, A. Baccharis oxide, a new triterpenoid from *Baccharis halimifolia* L. **Acta chemica scandinavica**, v. 24, p. 2479-2488. 1970.
- ARATANI, Y., KOYAMA, H., NYUI, S. I., SUZUKI, K., KURA, F., & MAEDA, N. Defense against *Candida albicans* in Mice Deficient in Myeloperoxidase. **Infection and immunity**, v. 67, n. 4, p. 1828-1836, 1999.
- ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69 (1), p. 4-9, 2003.
- ASHLEY, NOAH T.; WEIL, ZACHARY M.; NELSON, RANDY J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012
- ASSIS LAGE, T. C. MARQUES, R.; SERGIO M.; FERNANDES, A.; MÁRCIODE, C. MONTEIRO, O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTAC, V.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 148, p. 24-29, 2015.
- ATTUR M. G.; PATEL R.; THAKKER G.; VYAS P.; LEVARTOVSKY D.; PATEL P.; NAQVI S.; RAZA R.; PATEL K.; ABRAMSON D.; BRUNO G.; ABRAMSON S. B.; AMIN A. R. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. **Inflammation Research**, v. 49, n. 1, p. 20-26, 2000.
- BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methodology in immunology**. V. 162, p. 327-334, 1988.
- BARCELOS, L. S., TALVANI, A., TEIXEIRA, A. S., CASSALI, G. D., ANDRADE, S. P., & TEIXEIRA, M. M. Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. **Inflammation Research**, v. 53, n. 10, p. 576-584, 2004.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245-254, 2006.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 4, p. 556-63, 2010.

BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; LEWIS, A. Gene regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discov Today**, v. 4(10), p. 472-479, 1999.

BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Reunião com Expertos em Hepatotoxicidade da Sociedade Brasileira de Hepatologia: Analgésicos, Antitérmicos, Insumos Vegetais, Fitoterápicos, Homeopáticos e AINEs**, v. 30, n. Supl 1, p. 06-47, 2011.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 1, p. 64-76, 2000.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M.; DHAR, A. K.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Five Diterpenes and Other Constituents from nine *Baccharis* Species. **Phytochemistry**, v.20, p.1907-13, 1981.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: 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, p. 283-289, 2002.

BRENNER, M.; HEARING V. J. The protective role of melanina against UV damage in human skin. **Photochem. Photobiol.**, 84(3): 539–549, 2008.

BRINCAT, M. P.; BARON, Y. M.; GALEA, R. Estrogens and the skin. **Climateric**, 8:110 - 123, 2005;

BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., SERHAN, C. N., STOCKINGER, B., & TAK, P. P. The resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 59, 2013.

BÚFALO, M. C. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. **Natural product research**, v. 24, n. 18, p. 1710-1718, 2010.

BÚFALO, M. C., FIGUEIREDO, A. S., DE SOUSA, J. P. B., CANDEIAS, J. M. G., BASTOS, J. K., & SFORCIN, J. M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1669-1680, 2009.

BURBACH, G. J., ANSEL, J. C., & ARMSTRONG, C. A. A. Cytokines in the skin. **The biology of the skin**, v. 1, p. 299-3319, 2000.

- CESTARI, S. H.; BASTOS, J. K.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- CHAABAN, A.; MARTINS, C. E. N.; BRETANHA, L. C.; MICKE, G. A.; CARRER, A. R.; ROSA, N. F.; FERREIRA, L. & MOLENTO, M. B. Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Natural product research**, p. 1-5, 2017. ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, n. 1, p. 76-96, 2007.
- CHAN, L. S. **Animal model of human inflammatory skin diseases**. CRC Press, 2003.
- COLASANTI, M.; PERSICHINI, T. Nitric oxide: an inhibitor of NF-kappaB/Rel system in glial cells. **Brain Research Bulletin**, v. 52, p. 155-61, 2000.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, 2001.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H.; Acute phase response in animals: a review. **Comparative medicine**, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.
- CRIADO, P. R.; CRIADO, R. F. J.; MARUTA, C. W.; MACHADO FILHO, C. D. A. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.
- CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, E. C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Bras J Rheumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.
- CUZZOCREA, S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 27, p. 3551-7, 2004.
- DA SILVA FILHO, A. A., BUENO, P. C. P., GREGÓRIO L. E., SILVA M. L. A., ALBUQUERQUE, S., BASTOS J. K. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1195-1199, 2004.
- DA SILVA FILHO, A. A., RESENDE, D. O., FUKUI, M. J., SANTOS, F. F., PAULETTI, P. M., CUNHA, W. R., SILVA, M. L. A., GREGÓRIO, L. E., BASTOS, J. K. B & NANAYAKKARA, N. P. D. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478-482, 2009.
- DA SILVA, B. A. F.; DA 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. 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.
- DA SILVA, E. M.; RAILDA ROEL, A.; PORTO, K. R.; ESCOBAR FALCO, M.; MATIAS, R. Insecticidal effect of the ethanol extract of *Baccharis dracunculifolia* (Asterales: Asteraceae). *Revista de Biología Tropical*, 65(2), pp.517-523, 2017.

DARLENSKI, R.; KAZANDJIEVA, J.; TSANKOV, N. Skin barrier function: morphological basis and regulatory mechanisms. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 1, p. 36-45, 2011.

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas. In PENILDON, S. Editor. Farmalcológia, Guanabara Koogan, p. 134-45, 2002.

DE ASSIS LAGE, T. C.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; DAEMON E. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 148, p. 24-29, 2015.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V. M.; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n. 1-2, p. 29-33, 1994.

DEL CARMEN RECIO, M., GINER, R. M., MÁÑEZ, S., & RÍOS, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta medica**, v. 61, n. 02, p. 182-185, 1995.

DIAMOND, L.; O'BRIEN, T. G.; BAIRD, W. M. Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. In: **Advances in cancer research**. Academic Press, p. 1-74, 1980.

DOMÍNGUEZ, X. A., SANCHEZ, H., MERIJANIAN, B. A., & ROJAS-M, P. Stigmasterol, friedooleanan-3beta-ol and Baccharis oxide from *Baccharis salicifolia*. **Phytochemistry**, 1972.

DOS SANTOS, D. A.; FUKUI, M. D. J.; NANAYAKKARA, N. D.; KHAN, S. I.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE S. F.; DA SILVA FILHO A. A.; QUINTÃO, N. L. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543-550, 2010.

EL HILALY, J., ENNASSIR, J., BENLYAS, M., ALEM, C., AMAROUCH, M. Y., & FILALI-ZEGZOUTI, Y. Anti-inflammatory properties and phenolic profile of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. **Journal of King Saud University-Science**, v. 30, n. 4, p. 519-526, 2018.

ELIAS P. M. Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacente cell layers. **Exp Dermatol**, 5:191–201, 1996.

ERJAVEC, F., LEMBECK, F., FLORJANC-IRMAN, T., SKOFITSCH, G., DONNERER, J., SARIA, A., & HOLZER, P. Release of histamine by substance P. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 317, n. 1, p. 67-70, 1981.

FABRI, R. L., DUTRA, L. B., SCIO, E., NOGUEIRA, M. S., & BOUZADA, M. L. M. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 2011.

FAITH, M., SUKUMARAN, A., PULIMOOD, A. B. & JACOB, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity?. **Clinica Chimica Acta**, v. 396, n. 1-2, p. 23-25, 2008.

FARAGE, M. A., MILLER, K. W., ELSNER, P., & MAIBACH, H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 2, p. 87-95, 2008

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FEWTRELL, C. M. S., FOREMAN, J. C., JORDAN, C. C., OEHME, P., RENNER, H., & STEWART, J. M. The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. **The Journal of physiology**, v. 330, n. 1, p. 393-411, 1982.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. et al. *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1829-1845, 2017.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S., DE MELO, L. L., BORTOT, L. O., SANTOS, E. O., ANDRADE, M. F., AZZOLINI, A. E. C., KABEYA L. M., BASTOS, J. K. & LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655-664, 2013.

FREINKEIL, R. K., WOODLEY, D.T. Introduction. FREINKEIL, R. K., WOODLEY, D.T. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York :The Parthenon Publishing Group, p.15-17, 2000.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. *Periodontology* 2000, v. 63, n. 1, p. 149-164, 2013.

FRODE, M. O. Crystal structure of the triterpenoid Baccharis oxide: with a note on the use of various approaches in the tangent-refinement procedure. **Acta Crystallographica Section B**, v. 29, n. 9, p. 1796-1807, 1973.

FÜRSTENBERGER, G., BERRY, D. L., SORG, B., & MARKS, F. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 78(12), 7722-7726, 1981.

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M., RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear o edema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, v. 36, n. 1-2, p. 83-86, 1992.

GARRIDO, G., GONZÁLEZ, D., LEMUS, Y., GARCIA, D., LODEIRO, L., QUINTERO, G., DELPORT, C., NÚÑES-SELLÉS, A. & DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). **Pharmacological Research**, v. 50, p. 143-149, 2004.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal research reviews**, v. 29, n. 5, p. 767-820, 2009.

GELINSKI, J. M. L. N.; ROSA, J. C. D.; DUQUESNE, E. F. A. P.; BARATTO, C. M. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação com EDTA ou lisozima. **Evidência – Ciência e Biotecnologia- Interdisciplinar**, v. 7, n. 2, p. 131-144, 2007.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, n. 1, p. 44-55, 2006.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and I5N in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126: 131-136, 1982.

GUILPAIN, P., SERVETTAZ, A., BATTEUX, F., GUILLEVIN, L., & MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity reviews**, v. 7, n. 6, p. 421-425, 2008.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 3, p. 243-265, 2014

GUIMARÃES, N. S., MELLO, J. C., PAIVA, J. S., BUENO, P. C., BERRETTA, A. A., TORQUATO, R. J., NANTES, I. L. & RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 1091-1097, 2012.

GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias**. 3. ed., São Paulo: Manole, 2002.

HAAKE, A.; SCOTT, G. A.; HOLBROOK, K. A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D.T In: **The Biology of the Skin**. p.15-17, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.

HAN, N.; BAKOVIC, M. Biologically active triterpenoids and their cardioprotective and anti-inflammatory effects. *J Bioanal Biomed S*, v. 12, n. 005, p. 1948-5, 2015.

HARRISON, D. M. The biosynthesis of triterpenoids, steroids, and carotenoids. **Natural product reports**, v. 7, n. 6, p. 459-484, 1990.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HERRERA-MARTÍNEZ, M., RAMÍREZ-MARES, M.V., BURGUEÑO-TAPIA, E., CEPILLO-PORTUGAL, E., MIRÓN-ENRÍQUEZ, C. AND HERNÁNDEZ-CARLOS, B., Screening of antitopoisomerase, antioxidant, and antimicrobial activities of selected triterpenes and saponins. **Revista latinoamericana de química**, 40(3), pp.165-177, 2012.

HOCAYEN, P. D. A., GRASSIOLLI, S., LEITE, N. C., POCHAPSKI, M. T., PEREIRA, R. A., DA SILVA, L. A., MALFATTI, C. R. *Baccharis dracunculifolia* methanol extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of monosodium glutamate induced-obesity model rats. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 7, p. 1263-1271, 2016.

- HSU, C. L., FANG, S. C., HUANG, H. W., & YEN, G. C. Anti-inflammatory effects of triterpenes and steroid compounds isolated from the stem bark of *Hiptage benghalensis*. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 420-427, 2015.
- HURTADO-NEDELEC, M., DANG, P. M. C., MONTEIRO, R. C., EL BENNA, J., & GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2014, n. 462, p. 25-38, 2014.
- IALENTI, A; IANARO, A; MONCADA, S; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European journal of pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 177-182, 1992.
- IBÁÑEZ, F.; ZOPPOLO, R. Assessment of allelopathic properties of *Baccharis dracunculifolia* DC in laboratory and field conditions. **Allelopathy Journal**, v. 28, n. 1, 2011.
- IQBAL, P., SHARIF, H. M., MEHBOOBALI, N., YOUSUF, F. A., KHAN, A. H., & SELLKE, F. W. N-acetyl-BD-glucosaminidase and inflammatory response after cardiopulmonary bypass. **Journal of The College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 18, n. 2, p. 74, 2008.
- JACKSON S. M., WILLIAMS M. L, FEINGOLD K. R., ELIAS P. M. Pathobiology of the stratum corneum. **West J Med**; 158:279–285, 1993.
- JAMES, W. D; ELSTON, D; BERGER, T. Andrew's Diseases of the Skin E-Book: Clinical Dermatology-Expert Consult-Online and Print. **Elsevier Health Sciences**, 2011.
- JANG, M.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 25, n. 2-3, p. 65-77, 1999
- JEONG, D. YI, Y. S., SUNG, G. H., YANG, W. S., PARK, J. G., YOON, K., KIM, T. W. Anti-inflammatory activities and mechanisms of *Artemisia asiatica* ethanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 3, p. 487-496, 2014.
- JEONG, G. S., BAE, J. S. Anti-inflammatory effects of triterpenoids; naturally occurring and synthetic agents. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 316-329, 2014.
- JOHANN, S.; OLIVEIRA, F. B.; SIQUEIRA, E. P.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; COTA, B. B. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Pacacocidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 8, p. 843-851, 2012.
- JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, 29 (2): 326-337, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, C. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 223-37, 2004.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European journal of dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-401, 2002.
- KLOPELL, F. C., LEMOS, M., SOUSA, J. P. B., COMUNELLO, E., MAISTRO, E. L., BASTOS, J. K., & DE ANDRADE, S. F. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential

oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 7-8, p. 537-542, 2007.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871-1882, 2014.

KOLARSICK, P. A. J; KOLARSICK, M. A; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 11, p.625-629, 2004.

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

LAROUX, F. S.; PAVLICK, K. P.; HINES, I. N.; KAWACHI, S.; HARADA, H.; BHARWANI, S.; HOFFMAN, J. M. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta Physiologic Scandinave**, v. 173, p. 113-8, 2001.

LAWRENCE, T., & GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International journal of experimental pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LEMOS, Marivane et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 603-608, 2007.

LEUNG, Y. Y.; HUI, L. L. Y.; KRAUS, V. B. Colchicine—Update on mechanisms of action and therapeutic uses. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, p. 341-350, 2015.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of pharmacal research**, v. 27, n. 4, p. 442, 2004.

LIMA, A. S.; DE OLIVEIRA ALVIM, H. G. Revisão sobre Antiinflamatórios Não-Esteroidais: Ácido Acetilsalicílico. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 1, n. Esp, p. 169-174, 2018

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes antiasmáticos modernos: antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 825-834, 2002

LLORET, S., MORENO, J.J., Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochem. Pharmacol.** 50, 347–353, 1995.

LUENGO, M. B. Uma revisão histórica dos principais acontecimentos da imunologia e da farmacologia na busca do entendimento e tratamento das doenças inflamatórias. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 64-72, 2005

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1190-1198, 2005.

MACMICKING, J., XIE, Q., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 323-350, 1997.

MASSIGNANI, J. J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; SCHAPHAUSER, H. P.; JORGE, R. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic Activity of the Essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355-1360, 2009.

MCCALLION R., LI WAN PO A. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. **J Clin Pharm Ther.** 18:15–32, 1993.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MISSIMA, F.; ADEMAR FILHO, A.; NUNES, G. A.; BUENO, P. C. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 463-468, 2007.

MOHAMMAD. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer letters**, v. 285, n. 2, p. 109-115, 2009.

MONTEIRO-RIVIERE NA. Introduction to histological aspects of dermatotoxicology. **Microsc Res Tech**; 37:171, 1997.

MUNARI, C. C., FURTADO, R. A., SANTIAGO, M. L., MANHAS, S. S., BASTOS, J. K., & TAVARES, D. C. Inhibitory effects of *Baccharis dracunculifolia* on 1, 2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity and preneoplastic lesions in rat colon. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 4, p. 240-245, 2014.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, 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.

NEMETH, T.; MOCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9-19, Mar 30 2012.

NORRIS, D. A. Structure and function of the skin. In: Goldman's Cecil Medicine. **WB Saunders**, 2012. p. 2498-2503.

NURNBERG, V.; FUJIWARA, F. Y.; MARSAIOLI, A. J. Total NMR chemical shift assignments of Baccharis oxide via 2D-INADEQUATE. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 36, n. 10, p. 766-768, 1998.

ONG, W. Y.; FAROOQUI, T.; KOKOTOS, G.; FAROOQUI, A. A. Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. **ACS chemical neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 814-831, 2015

- PAINULI, S.; RAI, N.; KUMAR, N. GC-MS analysis of methanolic extract of leaves of *Rhododendron campanulatum*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 12, p. 299-303, 2015.
- PAN, S. Y.; LITSCHER, G.; GAO, S. H.; ZHOU, S. F.; YU, Z. L.; CHEN, H. Q.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K.; SUN, J. N.; KO, K. M. 2014. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1-20, 2014.
- PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of the southeastern Brazilian própolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 1100–1103, 2004.
- PARKINSON, A., OGILVIE, B. W., BUCKLEY, D. B., KAZMI, F., CZERWINSKI, M., & PARKINSON, O. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 529–546, 1996.
- PARREIRA, N. A., MAGALHÃES, L. G., MORAIS, D. R., CAIXETA, S. C., DE SOUSA, J. P., BASTOS, J. K., CUNHA W. R, SILVA, M. L. A., NANAYAKKARA N. P. D., RODRIGUEZ, V. & DA SILVA FILHO, A. A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.
- PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 8, p. 321-328, 2006.
- PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 14, n. 5, p. 289-301, 2014.
- PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Significación; **Journal of Applied Biomedicine**, 1: 7-12, 2003.
- PEREIRA, A. C.; DA COSTA, A. C. B. P.; MACHADO, A. K. S.; BELTRAME JÚNIOR, M.; ZÖLLNER, M. S. A.C.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil by Candida Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. **Mycopatolgy**, v. 171, p. 103-109, 2011.
- PEREIRA, C. A., COSTA, A. C. B. P., LIPORONI, P. C. S., REGO, M. A., & JORGE, A. O. C. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 3, p. 324-330, 2016.
- PETRILLO, M. G.; BORTNER, C. D.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids: Inflammation and Immunity. In: **The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease**. Springer, Cham, p. 43-63, 2017.
- PHILLIPS, D. R.; RASBERY, J. M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 3, p. 305-314, 2006.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JANSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the essential oil of Vassoura. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.1, n.3, p. 105-109, 1990.

RAMOS CAMPOS, F., BRESSAN, J., GODOY JASINSKI, V.C., ZUCCOLOTTO, T., DA SILVA, L.E. AND BONANCIO CERQUEIRA, L. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chemistry & biodiversity**, 13(1), pp.1-17, 2016.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro:Elsevier, 6 ed., 2007.

RAZ, A.; WYCHE, A.; SIEGEL, N.; NEEDLEMAN, P. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 6, p. 3022-3028, 1988.

REES J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. **Am J Hum Genet**; 75:739–751, 2004.

REHDER, V. L. G.; FILHO, H. F. L.; MARSAIOLI, A. J. Isolation and ¹³C nmr of Polyacetylenes from *Baccharis eleagnoides*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 692-695, 1990.

REZENDE, T., CORRÊA, J., AARESTRUP, B., AARESTRUP, F., DE SOUSA, O., & DA SILVA FILHO, A. Protective effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves extract against carbon tetrachloride-and acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental animals. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9257-9272, 2014.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Anti-inflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C.; MAÁÑEZ, S.; GINER, R. M. L. Natural triterpenoids as anti-inflammatory agents. In: Studies in natural products chemistry. **Elsevier**, p. 93-143, 2000.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. Histologia: atlas e texto. **São Paulo, Ed. Panamericana**, v. 232, p. 233-283, 1993.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **Journal Micron**, v. 35, n. 3, p. 161-171, 2004.

SAFAYHI, H. e SAILER, E.-R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta medica**, v. 63, n. 06, p. 487-493, 1997.

SALAZARA, G. J. T.; SOUSA, J. P.; LIMA C. N. F.; LEMOS, I. C. S.; SILVA, A. R. P.; FREITAS, T. S.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA L. E.; AMARAL, W.; DESCHAMPS, C. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 591-595, 2018.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2. ed., São Paulo: Artmed, 2001.

SANCHEZ, T. e 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, p. 877-879, 1999.

SAWAYA, A. C.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst**, v. 129, n. 8, p. 739-744, 2004.

SCHAERLI, P.; BRITSCHGI, M. KELLER, M.; STEINER, U.C.; STEINMANN, L.S.; MOSER, B. PICHLER, W.J. Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. **Journal of Immunology**. v. 173, p. 2151-2158, 2004.

SCHIANTARELLI, P., CADEL, S., ACERBI, D., PAVESI, L. Anti-inflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**. 32 (3), 230–235, 1982.

SERHAN, C. N.; BRAIN S. D.; BUCKLEY C. D.; GILROY D. W.; HASLETT C.; O'NEILL L. A. J.; PERRETTI M.; ROSSI A. G.; WALLACE J. L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The FASEB journal**, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N., VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349, 2008.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1199-1205, 2005.

SFORCIN, J. M.; DE SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. *Baccharis dracunculifolia*: Uma das principais fontes vegetais da propolis brasileira. 2012.

SHERWOOD, E. D.; TOLIVER – KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 395 – 405. 2004.

SHIBUYA, M.; SAGARA, A.; SAITOH, A.; KUSHIRO, T.; EBIZUKA, Y. Biosynthesis of Baccharis oxide, a triterpene with a 3, 10-oxide bridge in the A-ring. **Organic letters**, v. 10, n. 21, p. 5071-5074, 2008.

SILVERTHORN, D.U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 2. ed. São Paulo: Manole. Cap.19, p.581-583, 2003.

SINGH, R. Medicinal plants: A review. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1-1, p. 50-55, 2015.

SMITH, J. B.; WILLIS, A. L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. **Nature New Biology**, v. 231, n. 25, p. 235, 1971.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. 2000.

STANLEY, P. L., STEINER, S., HAVENS, M., & TRAMPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology and Physiology**, 4(4), 262-271, 1991.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacology Reports**. May-Jun, n.59, v.3, p.247- 258, 2007

SULZBERGER, M. B.; WITTEN, V. H.; SMITH, C. C. Hydrocortisone (compound F) acetate ointment in dermatological therapy. **Journal of the American Medical Association**, v. 151, n. 6, p. 468, 1953.

SUN, Y., GAO, L. L., TANG, M. Y., FENG, B. M., PEI, Y. H., & YASUKAWA, K. (Triterpenoids from *Euphorbia maculata* and Their Anti-Inflammatory Effects. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2112, 2018

TASAKA, A.C. Anti-inflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. p.256-285, 2006.

TEIXEIRA, É. W., NEGRI, G., MEIRA, R. M., & SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

THEOHARIDES, T.C.; KEMPURAJ, D.; TAGEN, M.; CONTI, PIO; KALOGEROMITROS, D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. **Immunological Reviews**, v.217, p. 65-78, 2007.

VANDEWALLE, J.; LUYPAERT, A.; DE BOSSCHER, K.; LIBERT, C. L. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, 2017.

VANE, John Robert. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature new biology**, v. 231, n. 25, p. 232, 1971.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, 28 (3): 519-52, 2005.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S., SHIVJI, G.M.; MAK, T. W.; SAUDER, D.N. CD4 + Th1 and CD8 + type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WEINBERG, J. B. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation. **Immunologic research**, v. 22, n. 2-3, p. 319-341, 2000.

WICKETT, R. R; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American journal of infection control**, v. 34, n. 10, p. S98-S110, 2006.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

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.

YOUNG, J.M., SPIRES, D.A., BEDORD, C.J., WAGNER, B., BALLRON, S.J., DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367- 371, 1984.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.

ZELLNER, B. D. A; BICCHI, C; DUGO, P; RUBIOLO, P; DUGO, G; MONDELLO, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 23, n. 5, p. 297-314, 2008.

ZHANG, C.; WANG, C.; LI, W.; WU, R.; GUO, Y.; CHENG, D.; YANG, Y; ANDROULAKIS, I. P.; KONG, A. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the triterpenoid ursolic acid in regulating the antioxidant, anti-inflammatory, and epigenetic gene responses in rat leukocytes. **Molecular pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 3709-3717, 2017.

ANEXO A

Protocolo CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 21/08/2018, analisou o protocolo nº. 022/2018 intitulado “Potencial Farmacológico de Produtos Naturais Extraídos das Espécies *Centaurea benedicta* L., *Baccharis dracunculifolia* DC e *Solidago chilensis* Meyen Usando Modelos *in vivo* de Inflamação”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Orlando Vieira de Souza e colaboração de Guilherme Cabral Gonçalves e Ademar Alves da Silva Filho, a ser realizado no período de 01/11/2018 a 31/10/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 720 machos de Camundongo heterogênico Swiss 30 a 40 dias de idade, projeto a ser realizado no Biotério do Laboratório de Farmácia no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n. 022/2018- CEUA about “Potencial Farmacológico de Produtos Naturais Extraídos das Espécies *Centaurea benedicta* L., *Baccharis dracunculifolia* DC e *Solidago chilensis* Meyen Usando Modelos *in vivo* de Inflamação”, under responsibility of Orlando Vieira de Souza and collaboration of Guilherme Cabral Gonçalves and Ademar Alves da Silva Filho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 21/08/2018. For the development of this research 720 males of lineage heterogenic Swiss mice, will be delivered as requested in the period of 01/11/2018 to 31/10/2021. The Project will be performed at Pharmacy Department located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of vality.

Juiz de Fora, 18 de outubro de 2018.

Coordenadora
CEUA



Vice- Coordenadora
CEUA