

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA GRILLO ROCHA

ESTUDO NÃO CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO
EXTRATO DE *Cyperus rotundus* L. (CYPERACEAE) EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO DE PELE

CURITIBA

2019

FERNANDA GRILLO ROCHA

ESTUDO NÃO CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO
EXTRATO DE *Cyperus rotundus* L. (CYPERACEAE) EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO DE PELE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Daniela de Almeida Cabrini

Coorientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Rocha, Fernanda Grillo

Estudo não clínico da atividade anti-inflamatória tópica do extrato de *Cyperus rotundus* L.(Cyperaceae) em modelos de inflamação de pele. /
Fernanda Grillo Rocha. – Curitiba, 2019.
89 p.: il.

Orientadora: Daniela de Almeida Cabrini
Coorientador: Michel Fleith Otuki

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Cyperus 2. Dermatite 3. Plantas medicinais 4. Inflamação - Modelos animais I. Título II. Cabrini, Daniela de Almeida III. Otuki, Michel Fleith IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.32484



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de FERNANDA GRILLO ROCHA intitulada: ESTUDO NÃO CLÍNICO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO DE *Cyperus rotundus* L.(CYPERACEAE) EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO DE PELE, sob orientação da Profa. Dra. DANIELA DE ALMEIDA CABRINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Setembro de 2019.

DANIELA DE ALMEIDA CABRINI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

EUNICE ANDRÉ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CINTIA DELAI DA SILVA HORINOUCHE

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Dedico esse trabalho a minha mãe Patrícia Grillo, por ser a razão de tudo e a maior incentivadora desse sonho!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por estarem ao meu lado em todos os momentos de minha vida, por nunca desistirem de mim, me dando coragem para encarar todos os desafios propostos.

Aos meus pais, Osmar e Patrícia, pelo amor incondicional, carinho e dedicação, por sempre apoiarem meus sonhos. Meus irmãos, Thiago e Lucas, pelo apoio e incentivo. Sei o quanto vocês estão orgulhosos de mim.

As minhas Sis, Mayara Brito e Loriane Mehl, por sempre incentivarem meus sonhos, em especial o mestrado, por torcerem por mim nas apresentações, nos obstáculos propostos no meio dessa jornada e por entenderem minhas ausências.

Aos meus amigos e colegas do laboratório da UFPR, pelos nossos momentos juntos, de alegria, superação e conquistas: Minha amiga oficial Pitu (Priscila Pawloski), JubyJuby (Juliana Ferreira), Fernandinho (Fernando Zonzini), Bru (Bruna Soley), Aninha (Ana Clara), Thalitinha da Farmácia (Thalita de Paula), Angel (Angélica Hillman), Andy (Andressa Hiekis), Mike (Maycon Matias) e Kelinha (Kelly Alencar). Muito obrigada a todos vocês!

A minha companheira do mestrado, MargarethE, minha Mag, pela cumplicidade, parceria em todo o período do mestrado, por ter me incentivado a superar meus medos, por nossos momentos de alegria e dificuldades. Sem você eu não teria chegado até aqui. Você foi um dos melhores presentes que Deus me deu em 2017, presente esse, que quero levar para a vida inteira. Obrigada de coração.

Aos professores do Departamento de Farmacologia UFPR, os quais tive a honra de ter aula. Vocês são minha inspiração. Em especial Profa. Eunice André, pelo apoio e incentivo principalmente na reta final do mestrado.

Aos meus orientadores Prof^a. Daniela Cabrini e Prof. Michel Otuki, por terem aceitado meu mundo cor de rosa sem ao menos me conhecerem, agradeço imensamente pelos ensinamentos, pela orientação, paciência e confiança.

A Prof^a. Dra. Irinéia Paulina Baretta e sua aluna Simone Costa (UNIPAR) por disponibilizarem a *Cyperus rotundus* para o desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do Biotério da UFPR e aos camundongos que deram a vida por esse trabalho.

Ao CNPq, CAPES e INCT-INOVAMED pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho,
obrigada de coração S2!

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes....”
Fernando Pessoa*

RESUMO

Cyperus rotundus L. (Cyperaceae) é considerada uma das espécies vegetais com ampla distribuição mundial, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. É popularmente conhecida no Brasil como "Tiririca" ou "Capim-dandá". Atualmente é considerada uma erva daninha, destacando-se por ser uma das ervas invasoras na agricultura mundial. É uma planta comumente utilizada na medicina tradicional na Índia, China e Japão, para tratar uma gama de condições clínicas, dentre elas dermatite. Ultimamente tem despertado interesse devido ao seu grande potencial terapêutico e compostos bioativos. No entanto, nenhum estudo foi feito até o momento para elucidar o potencial uso de *C. rotundus* como tratamento tópico para doenças inflamatórias da pele. Assim, este trabalho avaliou a atividade anti-inflamatória tópica do extrato dos rizomas da planta em modelos animais de inflamação da pele aguda e crônica. A análise fitoquímica foi executada pela metodologia de triagem preliminar dos fitoquímicos, onde foram identificados a presença de flavonóides, taninos e saponinas no extrato. Foram utilizados modelos animais de edema de orelha induzida por diferentes agentes flogísticos como O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e ácido araquidônico (AA), para avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato dos rizomas. No último dia dos protocolos experimentais, as biópsias das orelhas foram obtidas para realizar a análise enzimática da mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-b-d-glucosaminidase (NAG), assim como análises histológicas e imuno-histoquímica. O tratamento tópico com o extrato nas doses 0,1, 0,3 e 1,0 mg/orelha promoveu redução significativa do edema de orelha e da migração do infiltrado celular induzido por TPA no modelo agudo de inflamação de pele. O tratamento com a dose 0,3 mg/orelha foi capaz de inibir a formação do edema no modelo do AA. No modelo crônico induzido pelo TPA, o extrato além de promover efeito anti-edematogênico, interferiu com a migração celular no tecido inflamado. Neste mesmo modelo, demonstramos através da análise imuno-histoquímica que o tratamento com o extrato promoveu redução da marcação positiva para proliferação por PCNA e redução de queratinócitos indiferenciados quantificados pela marcação da K14. A aplicação tópica do extrato por 7 dias consecutivos não mostrou efeitos adversos significativos sobre órgãos linfóides ou na pele. Na investigação de um possível mecanismo de ação do extrato evidenciamos nenhuma indicação de atividade via receptores de glicocorticoides. Os resultados mostraram que o uso tópico do extrato dos rizomas da *C. rotundus* possui atividade anti-inflamatória e antiproliferativa em processos inflamatórios da pele relacionados com dermatite irritativa e psoríase. A princípio seu uso por curtos períodos parece ser seguro, porém avaliações adicionais são necessárias para confirmar sua eficácia e segurança podendo ser uma estratégia terapêutica para o tratamento de distúrbios inflamatórios da pele.

Palavras-chave: *Cyperus rotundus*, dermatite, planta medicinal, edema de orelha.

ABSTRACT

Cyperus rotundus L. (Cyperaceae) is considered one of the widely distributed plant species worldwide, especially in tropical and subtropical regions. It is popularly known in Brazil as "Tiririca" or "Capim-dandá." It is currently considered a weed, standing out as one of the invasive herbs in world agriculture. It is a plant commonly used in traditional medicine in India, China and Japan, to treat a range of clinical conditions, including dermatitis. Nowadays, it has been aroused due to its great therapeutic potential and bioactive compounds. Nevertheless, no studies have been done so far to elucidate the potential use of *C. rotundus* as a topical treatment for skin diseases. Thus, in this research, the topical anti-inflammatory activity of the plant rhizome extract was evaluated in animal models of acute and chronic skin inflammation. The phytochemical analysis was performed by the preliminary phytochemical screening methodology, where the presence of flavonoids, tannins and saponins in the extract were identified. Animal models of O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) or arachidonic acid (AA)-induced ear inflammation were used to evaluate the anti-inflammatory activity of the rhizome extract. On the last day of the experimental protocols, ear biopsies were obtained to perform myeloperoxidase (MPO) and n-acetyl-b-d-glucosaminidase (NAG) enzymatic analysis as well as histological and immunohistochemical analyzes. Topical treatment with the extract at doses 0.1, 0.3 and 1.0 mg/ear promoted a significant reduction in TPA-induced ear edema and cell migration in the acute skin inflammation model. The 0.3 mg/ear treatment was able to inhibit edema formation in the AA model. In the TPA-induced chronic model, the extract, besides promoting an anti-edematogenic effect, interfered with the cell migration in the inflamed tissue. In this same model, we evidenced through immunohistochemical analysis that the treatment with the extract promoted reduction of positive PCNA staining cells and reduction of undifferentiated keratinocytes quantified by K14 labelling. Topical application of the extract for 7 days showed no significant adverse effects in lymphoid organs and skin. Also, the extract showed no indication of activity via glucocorticoid receptors. The results showed that topical use of *C. rotundus* rhizome extract has anti-inflammatory and antiproliferative effect on inflammatory skin processes related to irritative dermatitis and psoriasis. At first its use for short periods seems to be safe, but additional evaluations are necessary to confirm its efficacy and safety and may be a therapeutic strategy for the treatment of inflammatory skin disorders.

Keywords: *Cyperus rotundus*, dermatitis, medicinal plant, ear edema.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 – CAMADAS DA PELE E DA EPIDERME	18
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE <i>C. rotundus</i>	25
FIGURA 3 – <i>Cyperus rotundus</i> L	27
FIGURA 4 – PARTES DA PLANTA DE <i>C. rotundus</i> L.....	27
TABELA 1 – REATIVOS GERAIS DE ALCALOIDES (RGA).....	34
TABELA 2 – MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NO EDEMA DE ORELHA.....	37
TABELA 3 – MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDO POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NO EDEMA DE ORELHA.....	37
FIGURA 5 – DESENHO EXPERIMENTAL DO MODELO DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA.....	39
FIGURA 6 – DESENHO EXPERIMENTAL	43
TABELA 4 – RESULTADO PRELIMINAR DA ANÁLISE DO EXTRATO	45
FIGURA 7 – EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM O EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA	47
FIGURA 8 – EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM O EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> SOBRE O AUMENTO NA ATIVIDADE DA ENZIMA MPO CAUSADA PELO TPA.....	48
FIGURA 9 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÓPICO COM O EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> SOBRE A INFILTRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR TPA.....	49
FIGURA 10 – EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM O EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR AA.....	50
FIGURA 11 – APLICAÇÃO TÓPICA DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> REDUZ O EDEMA DE ORELHA CAUSADO POR MODELO CRÔNICO.....	52
FIGURA 12 – EFEITO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS MPO (A) E NAG (B) NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DA PELE INDUZIDA POR APLICAÇÕES MÚLTIPLAS DE TPA.....	53

FIGURA 13 – FOTOS REPRESENTATIVAS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DAS ORELHAS DE ANIMAIS SUBMETIDOS À MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA E O EFEITO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i>	54
FIGURA 14 – EFEITO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> SOBRE ESPESSURA DA EPIDERME E MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NA DERME INDUZIDA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA	55
FIGURA 15 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM O EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DA PROTEÍNA PCNA EM TECIDOS SUBMETIDOS APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA	57
FIGURA 16 – EFEITO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> SOBRE DIFERENCIAÇÃO DOS QUERATINÓCITOS (K14) APÓS A APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA.....	58
FIGURA 17 – INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÓPICO COM EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NA ATROFIA CUTÂNEA E NOS ÓRGÃOS LINFOIDES	60
FIGURA 18 – INFLUÊNCIA DO ANTAGONISTA DE GLICOCORTICOIDES NO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AA	- Ácido Araquidônico
AP-1	- Proteína ativadora 1
APCs	- Células apresentadoras de antígeno
COX-2	- Cicloxigenase 2
CO ₂	- Dióxido de Carbono
<i>C. rotundus</i>	- <i>Cyperus rotundus</i> L.
DA	- Dermatite Atópica
DAB	- Diamino-benzidina
CDs	- Células Dendriticas
DCA	- Dermatite de contato alérgica
DCI	- Dermatite de contato irritativa
DEXA	- Dexametasona
DHA	- Ácido docosaenoico
EPA	- Ácido eicosapentaenoico
EPM	- Erro Padrão da Média
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
GPCRs	- Receptores acoplados a proteína G
HCl	- Ácido clorídrico
HE	- Hematoxilina-eosina
HTAB	- Hexadeciltrimetilamônio
IgE	- Imunoglobulina E
IL	- Interleucina
IL-17R	- Receptores IL-17
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
K14	- Citoqueratina 14
LOX	- Lipoxigenase
MAPK	- Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

mDO	- mili-Densidade óptica
MEC	- Matriz extracelular
MPO	- Mieloperoxidase
NAG	- n-acetil- β -D glucosaminidase
NK	- Células natural killer
NF-kB	- Fator de Transcrição Nuclear – Kappa B
NO	- Óxido nítrico
PAF	- Fator ativador de plaquetas
PBS	- Tampão Fostato de Sódio
PCNA	- Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PG	- Prostaglandina
PGE ₂	- Prostaglandina E2
PKA	- Proteína Quinase A
PKC	- Proteína Quinase C
PLA ₂	- Fosfolipase A2
PMN	- Polimorfonucleares
PNPO	- Programa Nacional de Produção Orgânica
PUFAs	- Ácidos graxos poliinsaturados
ROS	- Espécies Reativas do Oxigênio
SPMs	- Mediadores lipídicos pró- resolutivos
TGF	- Fator de Crescimento Transformante
TH2	- Células T helper 2
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNBC	- Câncer de mama triplo-negativo
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TPA	- 12-O-tetradecanoilforbol acetato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	PELE	16
1.2	PROCESSO INFLAMATÓRIO NA PELE.....	18
1.3	DOENÇAS DE PELE.....	22
1.4	<i>Cyperus rotundus</i> L	25
2.	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	MATERIAL VEGETAL	32
3.2	OBTENÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> ...	32
3.2.1	Análise de flavonoides	33
3.2.2	Análise de alcaloides	33
3.2.3	Análise de saponinas.....	34
3.2.4	Análise de antraquinonas	34
3.2.5	Análise de triterpenos e esteroides.....	35
3.2.6	Análise de taninos	35
3.3	ANIMAIS	36
3.4	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA.....	36
3.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
3.6	EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE TPA.....	38
3.7	EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	38
3.8	EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA .	39
3.9	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	40
3.10	AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) E CITOQUERATINA 14 (K14) POR IMUNO-HISTOQUÍMICA...	40

3.11	ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO.....	41
3.12	ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG.....	42
3.13	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO REPETIDA DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NA ESPESSURA DA PELE E PESO DE ÓRGÃOS LINFOIDES.....	43
3.14	ENSAIO DE REVERSÃO DO EFEITO DO EXTRATO COM ANTAGONISTA DE CORTICOIDE (RU486- MIFEPRISTONA).....	44
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	ANÁLISE QUALITATIVA DOS RIZOMAS DE <i>C. rotundus</i>	45
4.2	TRATAMENTO TÓPICO COM O EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NA INFLAMAÇÃO DE PELE INDUZIDA PELO TPA.....	46
4.3	MODELO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELO AA.....	50
4.4	TRATAMENTO TOPICO COM EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DA PELE INDUZIDA POR MULTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA.....	51
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO DO EXTRATO DE <i>C. rotundus</i> NA ATROFIA CUTÂNEA E NOS ÓRGÃOS LINFOIDES	59
4.6	ENSAIO DE REVERSÃO POR ANTAGONISTA DE GLICOCORTICÓIDE.....	61
5.	DISCUSSÃO.....	63
6.	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano. Além da importância estética, ela representa um importante órgão imunológico de defesa, contra ameaças físicas e agentes externos, atuando também na manutenção da homeostase do tecido. Desempenha papel vital, evitando a perda de água e eletrólitos, além de ser um órgão sensorial, excretor, auxiliando na regulação da temperatura corporal (HWA *et al.*, 2011, DI MEGLIO *et al.*, 2011).

É composta por três camadas principais que incluem a epiderme (camada mais externa), derme (camada intermediária) e hipoderme (camada mais interna) as quais, variam significativamente em sua anatomia de acordo com a localização no corpo humano. A hipoderme também conhecida como tecido subcutâneo adjacente é a camada mais profunda da pele, contém lóbulos adiposos, juntamente com alguns anexos da pele, como os folículos pilosos, os neurônios sensoriais e os vasos sanguíneos; sua espessura é bastante variável conforme a constituição física de cada indivíduo. Funcionalmente, a hipoderme serve como reserva de energia para o desempenho das funções biológicas, participa na manutenção da temperatura corporal e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos (BARONI *et al.*, 2012).

A camada logo acima da hipoderme, a derme, é composta principalmente por colágeno, mas também por elastina, vasos sanguíneos, nervos e glândulas sudoríparas. Compreende a maior parte da pele e fornece sua flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Além disso, ajuda na regulação térmica e inclui receptores de estímulos sensoriais. A derme é constituída principalmente por fibroblastos (responsáveis pela produção de colágeno e das fibras elásticas) e pela presença de várias células residentes, como células dendríticas dérmicas, macrófagos, mastócitos e células T. No estado fisiológico, um pequeno número de neutrófilos, monócitos e células T, residem e inspecionam a derme contra patógenos, o que se altera em situações de estímulos inflamatórios, os quais são caracterizados pela presença e acúmulo acentuado dessas células nessa camada. Anatomicamente, a derme possui uma abundante matriz extracelular (MEC), constituída principalmente por fibras de colágeno e elastina, que preenchem os espaços extracelulares,

fornecendo suporte para a migração de células do sistema imune (WOLF *et al.*, 2003; DI MEGLIO *et al.*, 2011).

A epiderme é a camada mais externa da pele, composta principalmente por queratinócitos, mas também por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. É constituída de quatro ou cinco camadas distintas (estratos), dependendo da região do corpo. As camadas da epiderme incluem o estrato basal (a porção mais profunda da epiderme), o estrato espinhoso, o estrato granuloso, o estrato lúcido e o estrato córneo (a porção mais superficial da epiderme) (BOUWSTRA, HONEYWELL-NGUYEN *et al.*, 2003).

O estrato basal, também denominado estrato germinativo, é responsável por renovar constantemente as células da epiderme, além disso, é a camada epidérmica mais profunda e anexa a epiderme à lâmina basal, abaixo da qual estão as camadas da derme. É composto por células epidérmicas basais indiferenciadas, chamadas queratinócitos basais as quais se dividem e migram para outros estratos da epiderme. Esta camada também contém melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, um pigmento que protege os núcleos celulares da lesão induzida pela radiação UV. Os queratinócitos basais se diferenciam e se movem superficialmente para a próxima camada (o estrato espinhoso; conhecido como camada de células espinhosas, devido à forma poliédrica das células) é composto por 8 a 10 camadas de queratinócitos, formadas pelo resultado da divisão celular no estrato basal. É nesse estrato que os queratinócitos atuam na produção dos filamentos de queratina (queratinização), assim como inicia-se o processo de maturação. Intercaladas entre os queratinócitos dessa camada estão as células de Langerhans, que são as principais células imunes residentes na pele. Ainda, outras células imunológicas, como as células T podem ser encontradas, tanto no estrato espinhoso, como no estrato basal (KRUEGER e STINGL, 1989; LOSQUADRO, 2017).

A próxima camada é a camada granular, a qual consiste em várias camadas de queratinócitos com grânulos de querato-hialina no citoplasma, local onde inicia-se o processo de cornificação. Já o estrato lúcido e o estrato córneo consistem em várias camadas de queratinócitos anucleados. As células do estrato córneo são conhecidas como cornéocitos, são células derivadas de queratinócitos mortos, que são desprovidos de organelas. Funcionalmente o estrato córneo é responsável pela função de barreira da pele, modulando a entrada de agentes “estranhos” no organismo, além de evitar a sua desidratação. Na epiderme saudável, há um equilíbrio

entre os processos de proliferação e descamação (cornificação) dos queratinócitos, que resulta em uma renovação completa da pele aproximadamente a cada 28 dias. O crescimento e diferenciação dos queratinócitos são processos estreitamente regulados na epiderme, e precisam ser equilibrados. Se houver muitas células em proliferação, podem ocorrer distúrbios de pele como a psoríase, caracterizada pela hiperproliferação dos queratinócitos os quais, migram através da epiderme em 7 a 8 dias, ou seja, com uma aceleração acima do normal (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; BARONI *et al.*, 2012; KIM e KRUEGER, 2015).

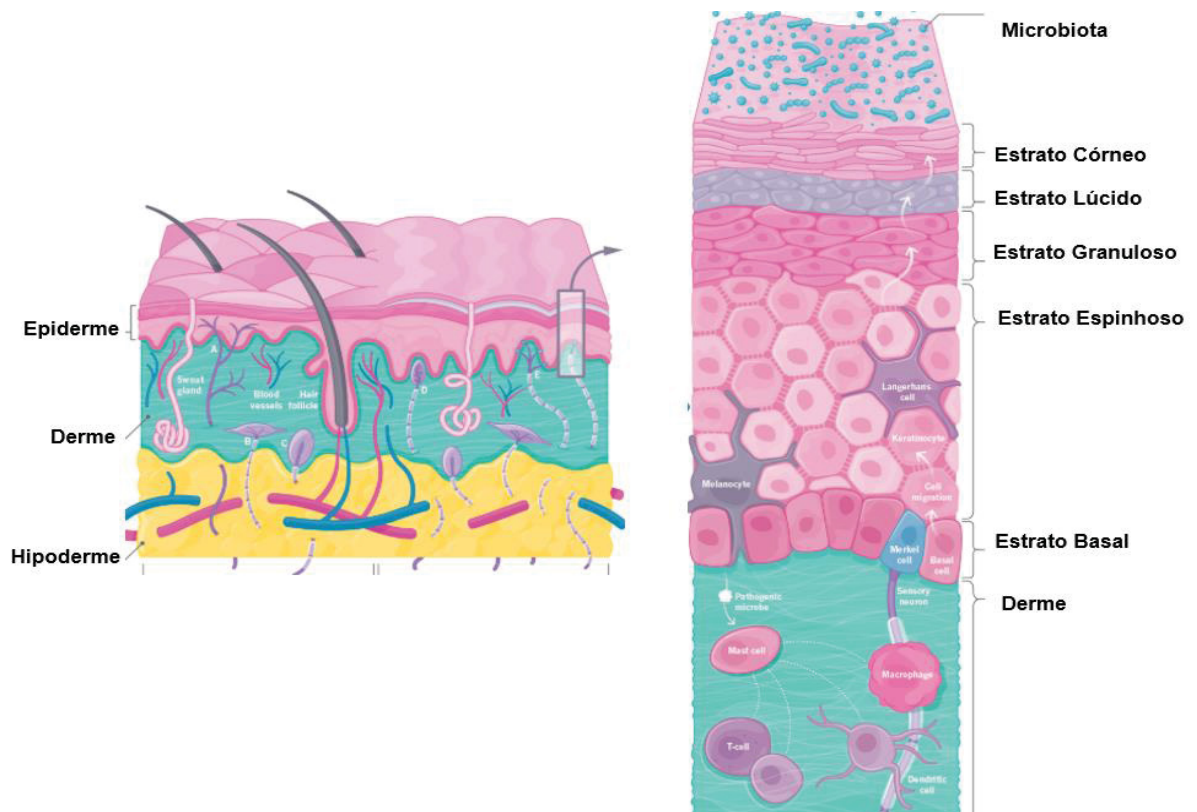


FIGURA 1: Camadas da pele e da epiderme. FONTE: Adaptado de Lucy Reading-Ikkanda- Skin Outline Vol. 563- 22/11/2018- Nature

1.2 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NA PELE

A pele fornece uma primeira linha de defesa do organismo contra patógenos microbianos e perigos físicos e químicos, através da vigilância de células sentinelas imunes e células não imunes, como os queratinócitos, que também desempenham um papel crítico na iniciação, manutenção e regulação das respostas imunes na pele. O *crosstalk* entre essas células regula as respostas imunes na pele para assegurar uma defesa eficaz e para manter ou restaurar a homeostase do tecido (PASPARAKIS,

HAASE, NESTLE, 2014). A inflamação é uma resposta tecidual protetora, podendo ser desencadeada por diversos agentes lesivos, químicos, físicos e biológicos, envolvendo alterações celulares, moleculares e fisiológicas, objetivando a reparação tecidual e reestabelecimento da função protetora da pele. Uma sequência de eventos celulares e bioquímicos, como extravasamento de fluidos, migração celular, liberação de mediadores responsáveis pela lise e reparo tecidual ocorrem como mecanismo de defesa. Essa sequência de eventos contribui para os parâmetros clássicos da inflamação: calor, vermelhidão (eritema), edema, dor e a perda da função do tecido ou órgão em casos de uma resposta inflamatória exacerbada (LAWRENCE *et al.*, 2002; NWAEHUJOR *et al.*, 2014).

A vasodilatação é uma característica clássica da inflamação, objetiva o tráfego de mediadores solúveis e células inflamatórias, mediada principalmente pelo óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras. A vasodilatação é caracterizada clinicamente pelo eritema e calor no local da lesão. O edema é causado pelo fluxo transvascular do fluido vascular do compartimento intravascular para o interstício, como resultado das ações da bradicinina, histamina, componentes do sistema complemento, leucotrienos, e fator ativador de plaquetas (PAF). O aumento na permeabilidade vascular objetiva principalmente a passagem de células do sangue para o tecido (migração celular) e permite o fornecimento de fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda ao local da lesão (DENZLINGER *et al.*, 1985; VALLANCE e CHAN, 2001; LAWRENCE *et al.*, 2002)

A invasão microbiana, a lesão e/ou a perda de função da barreira da pele, promove a liberação de quimioatrativos exógenos (como peptídeos microbianos e endotoxinas) e mediadores químicos endógenos (eicosanoides, interleucinas) que atuam como quimioatraentes promovendo o recrutamento celular para o local lesionado. As células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas e células epiteliais) são estimuladas a produzir vários mediadores pró-inflamatórios como quimiocinas, citocinas (TNF- α , IL-1 β , entre outras), eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos), radicais livres, aminas vasoativas (histamina e serotonina). Estes mediadores, através da ligação com seus receptores produzem segundos mensageiros que ativam diversas proteínas quinases como a proteína quinase C (PKC) e A (PKA) e as proteínas quinases da cascata da MAPK, as quais regulam a atividade de uma variedade de fatores de transcrição e outras proteínas celulares envolvidas na expressão gênica. Estas proteínas podem ativar fatores nucleares,

como o fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), também responsáveis pela transcrição gênica de várias proteínas como: citocinas, enzimas, assim como moléculas de adesão que modulam e promovem a progressão da resposta inflamatória (BHAGWAT *et al.*, 1999; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico recrutadas pela resposta inflamatória. São células fagocíticas as quais são atraídas para o local da inflamação por moléculas quimiotáticas específicas (quimiocinas), responsáveis por fagocitar e eliminar microorganismos estranhos através da maquinaria de seus grânulos, os quais contêm uma variedade de enzimas e também pela liberação de espécies reativas de oxigênio. Os monócitos migram para o local da inflamação através de fatores quimiotáticos e se diferenciam em macrófagos no tecido. Os macrófagos quando ativados, são a principal fonte de fatores de crescimento e citocinas. Os mastócitos também são essenciais no início da resposta inflamatória devido à liberação de mediadores inflamatórios recém-sintetizados e armazenados, como histamina, citocinas, etc. (KANTARI *et al.*, 2008; ALESSANDRI *et al.*, 2013; GILROY e De MAEYER, 2015).

As quimiocinas desempenham um papel importante na resposta inflamatória, através da sua ação mediada pela ligação aos receptores de superfície celular. São produzidas por vários tipos de células em resposta da indução de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α . As citocinas atuam como mensageiros moleculares para coordenar a interação entre os diferentes tipos de células envolvidas na amplificação e regulação da inflamação. São secretadas principalmente pelas células fagocíticas (como neutrófilos, macrófagos) e pelas células NK, mas na resposta imunológica adaptativa, elas são produzidas principalmente por células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos. Muitas citocinas e quimiocinas contribuem na resposta inflamatória através de múltiplos mecanismos, facilitando a quimiotaxia de células leucocitárias para o local da lesão, modulando a função das células imunes e estimulando a proliferação e diferenciação de vários tipos de células envolvidas na resposta imunológica (ROSSI e ZLOTNIK, 2000; KRISHNAMOORTHY e HONN, 2006; TURNER *et al.*, 2014).

Além das quimiocinas e citocinas, mediadores lipídicos como os metabolitos do ácido araquidônico (AA) desempenham papel importante na regulação da cascata inflamatória. Através de estímulos químicos, físicos ou através de outros mediadores, os fosfolipídios das membranas celulares liberam o ácido araquidônico pela ação da

fosfolipase A₂ (PLA₂). A inflamação induz a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) nas células inflamatórias que convertem ácido araquidônico em prostaglandinas, as quais vão mediar eventos iniciais de inflamação como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação; os leucotrienos B₄ gerados pela ação da enzima (5-LOX) induzem a migração e fixação de neutrófilos para o endotélio vascular através da regulação de moléculas de adesão da parede do vaso sanguíneo (LAWRENCE *et al.*, 2002; NATHAN, 2002).

Uma resposta inflamatória aguda bem-sucedida resulta na eliminação do agente, seguida por uma fase de resolução e reparo. Se a resposta inflamatória não for bem-sucedida, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. A persistência do processo inflamatório é caracterizada por alterações estruturais teciduais decorrentes da substituição do infiltrado neutrofílico na área inflamada por macrófagos, os quais tendem a se acumular no local da lesão. Funcionalmente os macrófagos são células apresentadoras de antígenos que ajudam a impulsionar e perpetuar a resposta imune, através da liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias além do recrutamento de outras células. Além disso, as enzimas lisossomais contidas nos macrófagos participam da degradação fagocitária de materiais estranhos (SERHAN E SAVILL, 2005; BANGERT, BRUNNER, STINGL, 2011).

A resolução da inflamação é caracterizada pela diminuição do infiltrado de PMN (polimorfonucleares) no local lesionado, pela apoptose dos PMNs infiltrantes e depuração de detritos celulares e outras células apoptóticas pelos macrófagos. Sabe-se que o processo de resolução da inflamação é um processo ativo, orquestrado por mediadores lipídicos pró-resolutivos (SPMs) conhecidos como: lipoxinas, resolvinas, maresinas e protectinas, os quais podem ser gerados por diferentes vias moleculares através de células imunes, tais como macrófagos e PMNs, a partir de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs): ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), exceto a lipoxina que é biossintetizada pela via do ácido araquidônico. Os SPMs, por ligação aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), induzem ações biológicas especializadas, promovendo a resolução da inflamação (SERHAN e PETASIS, 2011; SERHAN e CHIANG, 2013).

Sabe-se que independentemente da causa, a inflamação é uma resposta complexa, que engloba diferentes classes de mediadores, vias e mecanismos de ação, envolvidos na indução, regulação e resolução para restaurar a homeostase.

Embora a inflamação seja principalmente um processo fisiológico e benéfico, processos inflamatórios não-resolvidos, ou mesmo deficientes, podem estar envolvidos na patogênese e progressão de muitas doenças inflamatórias da pele (GILROY e De MAEYER, 2015).

1.3 DOENÇAS DE PELE

A ruptura da barreira da pele e os mecanismos do sistema imune podem desempenhar papéis de destaque no início e na sustentação dos distúrbios de pele, tais como na dermatite atópica, dermatite de contato e psoríase, consideradas as desordens de pele mais incidentes na população (KOSTNER *et al.*, 2017; DAINICHI *et al.*, 2018).

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica da pele, caracterizada por lesões avermelhadas, altamente pruriginosas, com bolhas e crostas nos estágios iniciais e posteriormente caracterizada por descamação e fissuração, promovendo intensa coceira e desconforto para o paciente. Apresenta um curso recidivante, não contagiosa e podendo manifestar-se em qualquer momento da vida. Seu início é mais comum antes dos 5 anos de idade em 85% dos casos, e geralmente desaparece na adolescência, podendo em alguns casos persistir até a idade adulta (MAYBA e GOODERHAM, 2016; WEIDINGER *et al.*, 2018).

É considerada uma doença multifatorial, devido a sua patogenia decorrer da interação de vários fatores, genéticos, ambientais e imunológicos, como por exemplo, defeitos na função da barreira da pele, alterações na resposta imune mediada por células, hipersensibilidade mediada por IgE e alterações no microbioma da pele (FENNER e SILVERBERG, 2018; NAKATSUJI e GALLO, 2019).

A resposta imune mediada por linfócitos T helper do tipo 2 (TH₂) é considerada essencial para a patogênese da DA. Devido a resposta ser mediada pelo TH₂, a DA é frequentemente seguida por outras doenças alérgicas mediadas por TH₂ como asma, rinite alérgica e alergias alimentares (LEUNG e BIEBER, 2003; DAINICHI *et al.*, 2018).

Por outro lado, a dermatite de contato (DC) é uma condição inflamatória da pele, desencadeada por agentes externos, decorrente de dois mecanismos etiopatogênicos: irritação primária ou sensibilização. A dermatite de contato irritativa (DCI) ocorre por meio da ativação da resposta imune inata por queratinócitos após a exposição a substâncias irritantes, como produtos de uso pessoal, detergentes,

fragrâncias, níquel entre outros alérgenos. As lesões costumam aparecer no local de contato. Já a dermatite de contato por sensibilização ou alérgica (DCA), surge após repetidas exposições ao produto ou substância, sendo sua resposta inflamatória resultante de uma hipersensibilidade tardia do tipo IV, reação que ocorre em resposta à reexposição a um alérgeno exógeno em um indivíduo previamente sensibilizado (NOVAK-BILIĆ *et al.*, 2018; MILAM *et al.*, 2019).

Tanto a DCI quanto a DCA são caracterizadas tipicamente por eritema cutâneo, escamação e prurido no local de contato. (RUNDLE *et al.*, 2017).

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, considerada uma doença auto-imune mediada por células T, caracterizada por placas eritematosas, avermelhadas, descamativas e delimitadas, causadas por proliferação anormal de queratinócitos e infiltração de células inflamatórias na derme e epiderme. Sua etiologia não é ainda totalmente elucidada, mas acredita-se que a ativação do eixo IL-23-IL-17 exiba um papel central na patogênese da doença e a ativação do eixo seja iniciada pelas células dendríticas (CDs) residentes na pele. A produção de IL-23 impulsiona as células T a produzir citocinas, como IL-17 e IL-22. A IL-17 ativa queratinócitos epidérmicos a produzir citocinas pró-inflamatórias, que irão induzir e propagar a inflamação psoriática, enquanto a IL-23 conduz a produção de IL-22 a qual, também irá participar do ciclo inflamatório. Essas citocinas medeiam os efeitos nos queratinócitos (hiperproliferação) amplificando a inflamação psoriática (DAINICHI *et al.*, 2018).

A psoríase pode ser desencadeada a partir da interação entre fatores genéticos, biológicos (infecções), ambientais e comportamentais (tabagismo, álcool e estresse), frequentemente se desenvolve no início da idade adulta em indivíduos entre 15 e 30 anos de idade, embora indivíduos de todas as idades possam ser afetados. Uma vez que a psoríase é desencadeada, geralmente acompanha o indivíduo ao longo da vida. A melhora espontânea da doença é difícil e normalmente os indivíduos em estágio mais avançado apresentam aumento progressivo da lesão psoriática (LIU, KRUEGER, BOWCOCK, 2006).

Atualmente na terapêutica dermatológica, os medicamentos mais utilizados são os corticosteroides, os quais possuem papel importante no controle das crises dessas patologias de pele devido aos efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e imunossupressores. Especificamente, eles modulam a quantidade e a atividade de muitos tipos de células inflamatórias (incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos,

células de Langerhans) e citocinas (ILs, incluindo IL-1 α , IL-1 β , IL-2), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF). Eles também induzem proteínas anti-inflamatórias, como anexina I (também denominada lipocortina-1), proteína anti-inflamatória, que interage fisicamente inibindo a PLA₂ citosólica, bloqueando a liberação de ácido araquidônico e a sua subsequente conversão em eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos) e a proteína anti-inflamatória MAPK fosfatase 1 que bloqueia a fosforilação das MAPKs, que, uma vez ativada induz a transcrição de genes inflamatórios e imunológicos (SCHÄCKE, DÖCKE, ASADULLAH, 2002; RHEN e CIDLOWSKI 2005; MAYBA e GOODERHAM, 2016).

Diante da natureza complexa das desordens da pele, a maioria dos tratamentos geralmente não apresentam resultados satisfatórios devido a carência de opções de tratamento eficaz, custo elevado e o perfil de segurança da maioria dos agentes terapêuticos que limita seu uso a longo prazo. Quesitos como tolerância aos fármacos, efeitos colaterais, toxicidade, adesão do paciente ao tratamento e esquema posológico tornam a terapia disponível insatisfatória (STERN *et al.*, 2004; LINDEN e WEINSTEIN, 1999).

Frente a essas dificuldades de tratamento, o desenvolvimento de agentes inovadores tópicos e sistêmicos de ampla atuação podem revolucionar o paradigma do tratamento das doenças de pele. Diante dessas vertentes, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas envolvendo plantas para fins medicinais torna-se foco de pesquisa para tratamento dessas desordens (RENERT-YUVAL e GUTTMAN-YASSKY, 2019).

As plantas medicinais constituem a base para o tratamento de diversas patologias, incluindo as de pele, devido ao conhecimento tradicional aprimorado a cada geração ou pela utilização de plantas como fonte de novos medicamentos. Recentemente tem sido dada ênfase a pesquisa de plantas medicinais para comprovar cientificamente sua eficácia, efeitos tóxicos e farmacológicos dos mesmos e devido à enorme reserva de agentes fitoquímicos existentes que ainda não foram identificados, que possuem uma atividade anti-inflamatória, atuando nas diversas vias moleculares envolvidas nas doenças de pele (DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012).

1.4 *Cyperus rotundus* L.

Cyperus rotundus L. é considerada uma das espécies vegetais com disseminação mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. É conhecida como uma planta originária da Índia e uma das melhores ervas terapêuticas Ayurvédicas (medicina indiana), utilizada no tratamento de vários distúrbios como, intestinais, estomacais, irregularidades menstruais e etc. (QASIM *et al.*, 2014). É encontrada na América (Sul e Central), nos Estados Unidos, sul da Europa, Ásia e Oceania. No Brasil, encontra-se praticamente em toda extensão territorial. Relatos históricos constam que a introdução no território nacional tenha se dado através dos navios mercantes portugueses no período em que o Brasil era colônia. O estabelecimento inicial dessa planta teria sido em zonas portuárias como Salvador, Recife, Rio de Janeiro, Santos e São Vicente, com posterior alastramento para o interior do país (SANTOS, 2014; PASTRE, 2006).

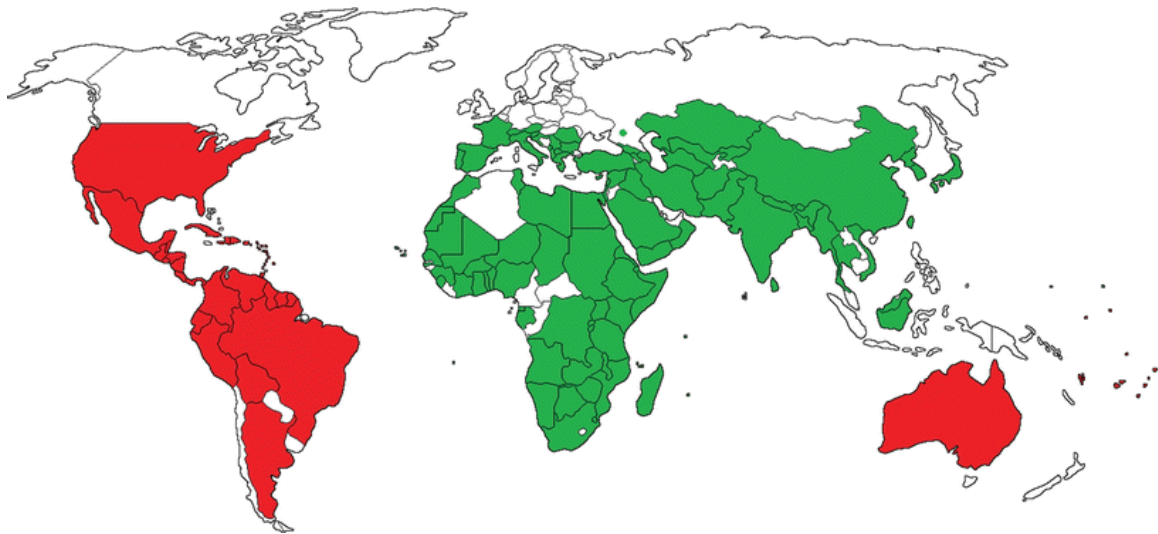


FIGURA 2: Distribuição mundial de *C. rotundus*. Em verde são países onde a planta é considerada nativa e países em vermelho onde ela foi introduzida. FONTE: PEEZARDA *et al.*, 2017.

A *C. rotundus* L. é popularmente conhecida por diversos nomes de acordo com o idioma e seu país de origem. No Brasil é conhecida como tiririca, tiririca vermelha, junça, capim-dandá; na Argentina, como “cebolita”; na Colômbia, como “coquito”; na Itália, como “cipero”; no México, como “cebollín”; nos Estados Unidos, como “nutgrass”, “purple nutsedge e java-grass”; na Índia, nagarmotha e mustha (sânscrito); na China, Xiang Fu Zi; na Espanha, chufa, coco, coquillo (PEERZADA *et al.*, 2015).

É uma planta herbácea comum, perene, ereta, que pode crescer de 5 a 70 cm de altura (KHALIDA e SIDDIQUI, 2014). Contém um sistema radicular fibroso bastante ramificado, formado por raízes, bulbo basal e tubérculos interligados por rizomas rastejantes escamosos e por uma parte aérea de pequeno porte, com folhas formando rosetas. Suas folhas são verde-escuras, brilhantes e estreitas, variando de 5 a 12 cm e seu caule mede de 10 a 30 cm de comprimento (BLANCO, 2006). Suas inflorescências geralmente têm duas a quatro brácteas compostas de pequenas flores de cor púrpura a castanha avermelhada (BRYSON e De FELICE, 2009). Os tubérculos são ovais, com aproximadamente de 1 a 3 cm de comprimento. Quando maduros são fibrosos de cor negra a castanha e quando jovens, são brancos e suculentos como representado na imagem abaixo (LORENZI, 2008).

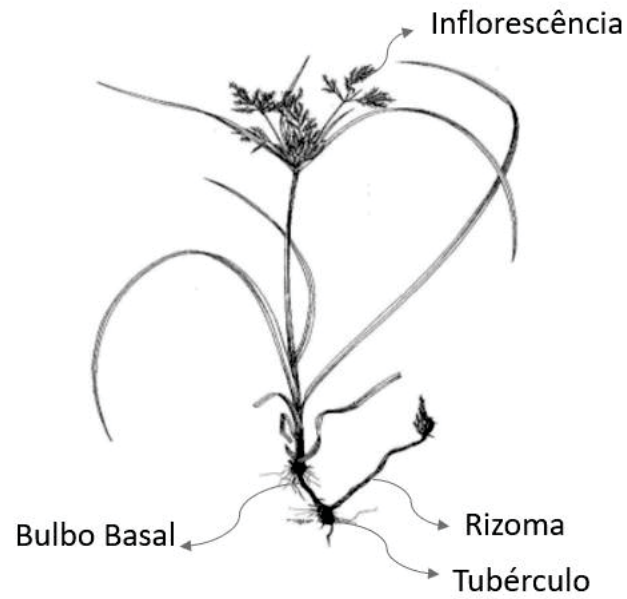


FIGURA 3 : *Cyperus rotundus* L. FONTE: Adaptado de PEEZARDA et.al., 2015.

A)



C)



B)



FIGURA 4: Partes da planta de *C. rotundus* L. Tubérculo maduro (A), inflorescência (B) e planta inteira (C). FONTE: (A) <https://gespianos.wordpress.com/2017/07/11/o-controle-da-tiririca/> (Acessado em: Julho de 2019); (B e C) http://uforest.org/Species/C/Cyperus_rotundus.php (Acessado em :Julho de 2019).

A origem do nome *rotundus* vem do latim que significa redondo, devido aos seus tubérculos arredondados que se formam no solo (PASTRE, 2006; IMAM *et al.*, 2014). Sua reprodução se dá tanto pela forma sexuada, através das sementes, como pela forma vegetativa por meio dos tubérculos e rizomas. Sua propagação por sementes é de pouca importância, devido a apenas 5 % de suas sementes serem viáveis (BLANCO, 2006). Assim, sua principal propagação ocorre por rizomas e tubérculos, que são os principais órgãos de reserva e propagação dessa espécie (RICCI *et al.*, 2000).

A família Cyperaceae é composta por aproximadamente 70 gêneros e mais de 3.500 espécies, sendo um deles o *Cyperus* (JOLY, 1975). Os representantes herbáceos dessa família são reconhecidos devido sua ampla distribuição pelo mundo, crescendo facilmente em terrenos alagadiços, pantanosos e pastos. São ricos em metabólitos secundários incluindo taninos, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas e sesquiterpenóides (PEEZARDA, 2017). A polpa do caule das Cyperaceae na antiguidade servia como material para a produção dos papiros usados pelos antigos egípcios (JOLY, 1975). No Brasil, existem aproximadamente 27 espécies, sendo 14 do gênero *Cyperus* (LORENZI, 2008).

C. rotundus é considerada uma das espécies botânicas de maior amplitude geográfica devido sua capacidade de competição, agressividade com outras plantas ao redor e por apresentar uma estratégia de reprodução bastante eficiente atingindo, em condições ambientais propícias, uma multiplicação rápida e intensa. A área infestada por ela aumenta substancialmente em curto período de tempo (DURIGAN *et al.*, 2005). Os principais fatores ambientais que afetam sua reprodução são: fotoperíodo, temperatura, concentração de CO₂ na atmosfera do solo e intensidade luminosa (PASTRE, 2006).

O processo de fotossíntese das espécies de Cyperaceae ocorre pelo ciclo C4, o que favorece seu estabelecimento em regiões quentes, com temperaturas elevadas e intensa luminosidade. Em temperaturas baixas, seu desenvolvimento e multiplicação se dão com lentidão. A parte aérea é sensível a baixa intensidade de luz, podendo-se até eliminar a planta quando submetida a um sombreamento prolongado. Sua capacidade de sobrevivência em condições adversas é enorme, pois consegue suportar períodos prolongados de seca ou inundação do terreno. Em época de seca, os tubérculos perdem sua viabilidade se dessecados e o revolvimento do

solo ajuda a diminuir o número de tubérculos viáveis na área. (MELLO, TEIXEIRA, NETO, 2003; BRYSON e CARTER, 2008).

A *C. rotundus* se destaca entre as diversas espécies daninhas infectantes em lavouras. Muitas plantações de importância econômica são afetadas pela sua presença como o milho, o feijão, o algodão e a cana-de-açúcar. Além de *C. rotundus* competir pelos recursos do meio, como água e nutrientes, libera no solo substâncias aleloquímicas que afetam o desenvolvimento de diversas plantações levando a perda de produtividade das mesmas (MARTINI e DURIGAN, 2004). Em um levantamento científico realizado por KISSMANN (1997) foram constatados que, em época de alta infestação da planta, há uma queda de até 75% na colheita e uma redução de 65% na produção de açúcar, devido à competição permanente entre a lavoura de cana-de-açúcar e essa erva daninha. Suas sementes e a dormência dos tubérculos também contribuem para a sua persistência. NESSER *et al.* (1997) constatou que a meia vida dos tubérculos de *C. rotundus* foi de aproximadamente 16 meses, com estimativa de viabilidade de até 42 meses no solo. O controle dessa erva daninha no campo é problemático, difícil, uma vez que não há no mercado produtos seletivos de alta eficácia para eliminação das mesmas, resultando em alto custo para sua erradicação (CATUNDA *et al.*, 2000).

Apesar do problema econômico causado pela espécie, em alguns países, *Cyperus* é utilizada na indústria têxtil e alimentícia. Além disso, o amido proveniente de seus tubérculos é comumente utilizado na cozinha tradicional chinesa e suas folhas, usadas para dar sabor aos alimentos no Oriente Médio e no Sudeste Asiático (UMERIE & EZEUZO, 2000; NIMA *et al.*, 2008). Nos países asiáticos, praticantes da medicina indiana, desde os tempos antigos, os rizomas e tubérculos vem sendo utilizados como tratamento herbal de distúrbios intestinais, estomacais, inflamatórios e irregularidades menstruais (KAMALA *et al.*, 2018). De acordo com a literatura disponível sobre seus usos tradicionais e contemporâneos, várias pesquisas averiguaram as propriedades fitoquímicas e ações farmacológicas de *C. rotundus* (PEEZARDA *et al.*, 2015).

Pesquisas sustentam o uso do extrato de rizomas e tubérculos como antimicrobianos (SHARMA e SINGH, 2011), cicatrizante de feridas (PURATCHIKODY *et al.*, 2006), atividade hepatoprotetora (KUMAR e MISHRA, 2005); distúrbios estomacais e como anti-inflamatório (THOMAS *et al.*, 2015; SEO *et al.*, 2001; KUMAR, TIWARI, ALAM, 2012). Além disso, alguns estudos suportam o uso do óleo essencial

de diversas partes da planta de *C. rotundus* como analgésico, anti-helmíntico e anti-fúngica (BIRADAR *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2005; KASALA *et al.*, 2016).

Com relação a sua atividade anti-inflamatória, estudos preliminares investigaram diferentes extratos de rizomas da planta. O estudo de SEO *et al.* (2001) mostrou que o extrato metanólico de rizomas de *C. rotundus* inibiu a produção de óxido nítrico em macrófagos (Raw264.7) e esse efeito foi decorrente da redução na expressão da enzima iNOS. Segundo os autores estes resultados sugerem que a *C. rotundus* possui ação anti-inflamatória e pode ser utilizada como tal no tratamento de diversas doenças (SEO *et al.*, 2001). Outro estudo, agora *in vivo*, avaliou a atividade do extrato do rizoma de *C. rotundus* no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Neste estudo, foi verificado que o extrato metanólico aplicado por via oral 1 h antes da injeção de carragenina inibiu o edema de modo semelhante à indometacina (KUMAR, TIWARI, ALAM, 2012).

Assim, para contribuir na busca por novos extratos vegetais com potencial anti-inflamatório e devido a nenhum estudo até o momento ter demonstrado a eficácia de *C. rotundus* como agente anti-inflamatório no tratamento de doenças inflamatórias da pele, este estudo foi realizado para investigar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato dos rizomas de *C. rotundus* em modelos de inflamação de pele aguda e crônica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia tópica do extrato dos rizomas de *C. rotundus* aplicado por via tópica no tratamento de doenças da pele em modelos animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito anti-inflamatório tópico do extrato de *C. rotundus* em modelos de dermatite irritativa causada por AA;
- Verificar o efeito anti-inflamatório tópico do extrato de *C. rotundus* no modelo de inflamação de pele induzida por TPA;
- Analisar o potencial anti-inflamatório do tratamento tópico do extrato de *C. rotundus* em modelo de inflamação crônica de pele;
- Avaliar potencial toxicidade local e em órgãos linfóides pela administração tópica repetida do extrato de *C. rotundus* em camundongos;
- Verificar possível relação do efeito anti-inflamatório do extrato de *C. rotundus* relacionado ao receptor de glicocorticoide.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Os rizomas de *C. rotundus* (pó) da Índia foi adquirido comercialmente da empresa Khandige Organic Health Product na cidade de Bangalore, região sul do estado de Karnataka/Índia pela professora Dra. Irinéia Paulina Baretta (Professora do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na atenção básica da Universidade Paranaense- UNIPAR). A empresa possui certificação de produtos orgânicos emitida pela LACON Qualitat GmbH da Alemanha, N° IN-45820 e produzida de acordo com os padrões do Programa Nacional de Produção Orgânica (PNPO), pelo Programa Orgânico Nacional do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e Regulamento do Conselho da União Europeia (UE) 834/2007 e 889/2008 (UE). Quatro (4) embalagens de 100g do lote MSP037003 e licença de fabricação (Mfg) No. AUS-896 foram compradas.

3.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA DO EXTRATO DE *C. rotundus*

A obtenção e a análise do extrato dos rizomas de *C. rotundus* foi realizado pela Simone Costa do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na atenção básica da UNIPAR. Para o preparo do extrato foi utilizado a determinação das substâncias extraíveis pelo método de extração por Soxhlet, da Farmacopeia Brasileira (2010), por 3 h. Para a extração foram pesados 2 g do material pulverizado dos rizomas de *C. rotundus* e transferido para o cartucho de papel de filtro do extrator de Soxhlet, previamente tarado e seco. No balão do extrator, foram introduzidos 0,2 g de hidróxido de sódio e 160 ml do solvente etanol absoluto. Os cartuchos com os resíduos foram retirados e secos em estufa a 105°C e pesados em intervalos de 30 min. O processo de secagem foi realizado até obter peso constante (diferença inferior a 5 mg). Foi pesado o resíduo seco e calculado o teor de substâncias extraíveis por diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco, sendo expressos na forma de percentagem. As análises foram realizadas em triplicata. Logo após a extração por Soxhlet foi realizado o procedimento de concentração do extrato onde foi colocado em um balão de vidro conectado ao rotaevaporador da marca Fisatom. O balão foi aquecido em banho-maria (Fisatom) a

uma temperatura de 45°C. O procedimento foi realizado até total eliminação do solvente. Com o extrato pronto, a amostra foi utilizada para realizar um *screening* farmacognóstico preliminar para análise de flavonoides, alcaloides, saponinas, antraquinonas, taninos, triterpenos e esteroides.

3.2.1 Análise de flavonoides

Para a análise de flavonoides, aqueceu-se em banho-maria (FISATOM, modelo 550), 1 g de *C. rotundus* em pó com 10 ml de solução de etanol a 70%, por 2 min e em seguida realizou-se a filtração por algodão. Em um tubo de ensaio, contendo 2 ml do extrato alcoólico, adicionou-se seis fragmentos de magnésio metálico com 1 ml de ácido clorídrico concentrado. Na presença destes compostos foi observado o aparecimento da coloração rósea a vermelha (SIMÕES *et al.*, 2007).

3.2.2 Análise de alcalóides

A detecção de alcaloides se deu por meio dos reativos gerais de alcaloides (RGA), no qual a formação e cor do precipitado indicaram a presença destes compostos (Tabela 1). Foram utilizados 2 g do pó de *C. rotundus* diluídos em 20 ml de ácido clorídrico (HCl) a 1%, em seguida foi realizado o aquecimento da mistura por 2 min, seguida da filtração por algodão. O filtrado foi distribuído em 4 tubos de ensaio (3 ml por tubo), então foram adicionadas 2 gotas de cada RGA, observando a ocorrência de precipitado (SIMÕES *et al.*, 2007).

TABELA 1: REATIVOS GERAIS DE ALCALOIDES (RGA)

Nome do reagente	Composição	Resultado (Cor do Precipitado)
Bertrand	Ácido sílico-túngstico	Branco
Bouchardat	Iodo-iodeto de potássio	Marrom
Dragendorff	Iodo bismutato de potássio	Alaranjado
Mayer	Iodo mercurato de potássio	Branco

FONTE: O Autor (2019)

3.2.3 Análise de saponinas

Para a detecção de saponinas, ferveu-se 2 g de *C. rotundus* em pó com 20 ml de água destilada por 2 minutos. Após resfriada, a mistura foi filtrada e transferiu-se 15 ml do filtrado para um tubo de ensaio. Do primeiro tubo retirou-se 5 ml do extrato, sendo transferido para um segundo tubo, acrescentando 5 ml de água destilada. Do segundo tubo, foram retirados 5 ml e colocados em um terceiro tubo, acrescentando 5 ml de água destilada. Em seguida, agitou-se rapidamente os três tubos por 15 segundos. A formação e manutenção da espuma por mais de 15 minutos confirma a presença de saponinas (SIMÕES *et al.*, 2007).

3.2.4 Análise de antraquinonas

Para a análise de antraquinonas, 0,2 g de *C. rotundus* em pó foi adicionado em 10 ml de ácido sulfúrico 2 Normal (N), e ferveu-se a mistura durante 2 minutos. Após resfriado, o extrato foi filtrado por um funil de separação. Em seguida foram adicionados 10 ml de éter etílico, fez-se a agitação e separação da camada etérea para um tubo de ensaio. A coloração amarela sugeriu a presença de antraquinonas. Em seguida, foram adicionados 2 ml de solução aquosa de hidróxido de sódio 2N e agitado. Após a separação das fases, observa-se a presença de uma camada rósea

ou vermelha, e a etérea incolor, confirmando a presença de antraquinonas (SIMÕES *et al.*, 2007).

3.2.5 Análise de triterpenos e esteroides

Para a análise de triterpenos e esteroides, foi utilizado 2 g de *C. rotundus* em pó diluído em 20 ml de etanol 70%, em seguida foi realizado, fervura durante 2 minutos, filtração por algodão e transferência de 5 ml do extrato para um cadinho. Em seguida, evaporou-se o extrato em banho-maria (FISATOM, modelo 550), até obtenção de resíduo seco, onde foi adicionado 0,5 ml de anidrido acético, agitando-se com um bastão, seguido da adição de 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente foi observado a coloração, sendo azul ou verde para esteroides e lilás, púrpura ou castanha avermelhada para triterpenos (SIMÕES *et al.*, 2007).

3.2.6 Análise de taninos

Para análise de taninos, ferveu-se 5 g de *C. rotundus* em pó diluído em 50ml de água destilada, por 15 minutos. Logo após, este filtrado foi dividido em quatro tubos de ensaio, sendo um deles a amostra controle (Tubo 4). No tubo 1, contendo 2 ml do filtrado, adicionou-se 2 gotas de HCl diluído e solução de gelatina a 2,5%, gota a gota. Após, observou-se a formação de precipitado como indicativo da presença de taninos. No tubo 2, contendo 2 ml do filtrado, acrescentou-se 10 ml de água destilada e de duas a quatro gotas de solução de FeCl₃ a 2% em metanol. A cor azul indicou a presença de taninos hidrolisáveis e a cor verde, taninos condensados. No tubo 3, contendo 5 ml do filtrado, foram adicionados 10 ml de solução de ácido acético a 10% e 5 ml de solução de acetato de chumbo a 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indicou a presença de taninos hidrolisáveis. No tubo 4, colocou-se apenas 5 ml do extrato puro, filtrado, para comparação (SIMÕES *et al.*, 2007).

3.3 ANIMAIS

Camundongos Swiss fêmeas (25-30 g) foram alocados aleatoriamente em diferentes grupos em caixas de polipropileno (tamanho: 18 cm X 24cm X 41 cm) em maravalha autoclavada. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h em 12 h em temperatura ambiente controlada (22 ± 2 °C) com alimentos e água fornecidos *ad libitum*. Os animais permaneceram em adaptação ao laboratório durante pelo menos um dia antes dos testes e foram utilizados apenas uma vez. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comissão de Ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná com número 1248.

3.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA

Para estudar o processo inflamatório cutâneo, um dos modelos *in vivo* mais utilizados é o de indução de edema de orelha em camundongos (GABOR, 2000). Este modelo consiste num método rápido e simples, requer pouca quantidade de substâncias e permite resultados reprodutíveis. Este modelo pode ser induzido por diferentes agentes (ex.: TPA, fenol, ácido araquidônico) e permite uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação tanto tópica quanto sistêmica de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como substâncias isoladas de plantas (GABOR, 2000; WINYARD e WILLOUGHBY, 2003).

Este modelo foi empregado com o objetivo de verificar inicialmente a formação de edema e posteriormente a análise de outros parâmetros do processo inflamatório com coleta de amostras (círculos de 6 mm de diâmetro da orelha de camundongo) após a eutanásia dos animais. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos em μm .

A espessura foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando-se um micrômetro digital (Great MT-04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e registrada através do (Δ) diferença entre a primeira medida (espessura basal) e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório. Para minimizar variações de medida na técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais utilizados nos modelos de edema de orelha induzidos por TPA, AA e aplicação múltipla de TPA foram divididos aleatoriamente em grupos distintos e receberam o tratamento de acordo com a tabela 2 e 3. Para ser administrado por via tópica, o extrato de *C. rotundus* foi solubilizado em 70% de acetona e 30% de etanol (proporção 7:3). Os agentes flogísticos TPA e AA assim como a dexametasona e a indometacina foram diretamente solubilizados em acetona grau P.A.

TABELA 2: MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE *C. ROTUNDUS* NO EDEMA DE ORELHA

MODELO (AGUDO)	GRUPOS	
	TRATAMENTOS	DOSES
TPA	CONTROLE (TPA)	2,5 µg /orelha
	DEXAMETASONA (TPA+ DEXA)	0.1 mg/orelha
	<i>C. ROTUNDUS</i> (TPA + <i>C. ROTUNDUS</i>)	0,1 mg/orelha
		0,3 mg/orelha
		1,0 mg/orelha
	VEÍCULO	
	NAIVE	
AA	CONTROLE (AA)	2,0 mg/orelha
	INDOMETACINA (AA+INDO)	2.0 mg/orelha
	<i>C. ROTUNDUS</i> (AA+ <i>C. ROTUNDUS</i>)	0,1 mg/orelha
		0,3 mg/orelha
		1,0 mg/orelha
	VEÍCULO	
	NAIVE	

TABELA 3: MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDO POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA UTILIZADO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE *C. ROTUNDUS* NO EDEMA DE ORELHA

MODELO CRÔNICO	GRUPOS	
	TRATAMENTOS	DOSES
MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA	CONTROLE TPA	2,5 µg /orelha
	DEXAMETASONA (TPA+ DEXA)	0.1 mg/orelha
	<i>C. ROTUNDUS</i> (TPA + <i>C. ROTUNDUS</i>)	0,3 mg/orelha
	NAIVE	

FONTE: O Autor (2019).

3.6 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE TPA

A aplicação tópica de ésteres de forbol, como o TPA, induz inflamação na pele e respostas hiperproliferativas (quando aplicado de forma crônica) nos animais, assemelhando-se sob muitos aspectos aos sinais de algumas doenças de pele como a psoríase (GABOR, 2000). Sendo assim, o processo inflamatório foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha direita de camundongos sobre um volume de 20 µl. O extrato da *C. rotundus* nas doses de 0,1 mg/orelha, 0,3 mg/orelha e 1,0 mg/orelha e a dexametasona (controle positivo, 0,1 mg/orelha) foram aplicados logo após a aplicação do TPA. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 h após a aplicação do TPA (DE YOUNG *et al.*, 1989). Foram então coletadas amostras das orelhas dos camundongos (6 mm) para posteriores análises, 24 h após a administração de TPA.

3.7 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE AA

Nesse modelo é possível identificar compostos que inibem o metabolismo do ácido araquidônico, que ao ser metabolizado dá origem a vários mediadores como prostaglandinas e leucotrienos, os quais, promovem a formação do edema (HUMES *et al.*, 1986). O AA (2 mg/orelha) foi administrado topicamente na orelha direita dos camundongos. Em seguida, o extrato de *C. rotundus* nas doses 0,1, 0,3 e 1,0 mg/orelha assim como o controle positivo indometacina (2 mg/orelha) foram aplicados topicamente. O edema foi avaliado 1 h após a aplicação com o AA (YOUNG *et al.*, 1984; CRUMMEY *et al.*, 1987).

3.8 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

O edema de orelha induzido pela múltipla administração tópica de TPA é um modelo de inflamação que mimetiza um processo inflamatório crônico e foi utilizado para investigação de uma possível ação anti-inflamatória de *C. rotundus* frente a um processo inflamatório já estabelecido. O modelo foi realizado pela aplicação de TPA (2,5 µg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Os tratamentos com o extrato de *C. rotundus* (dose 0,3 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha) começaram a ser administrados a partir do quinto dia de experimento, sendo aplicados por via tópica durante 4 dias consecutivos (2 vezes ao dia, 12 em 12 h) e o edema avaliado diariamente conforme o desenho experimental na FIGURA 5 (STANLEY *et al.*, 1991). No 9º dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e amostras de 6 mm de diâmetro de tecido das orelhas foram coletados e armazenados no freezer -80 °C para serem submetidas a avaliações subsequentes.

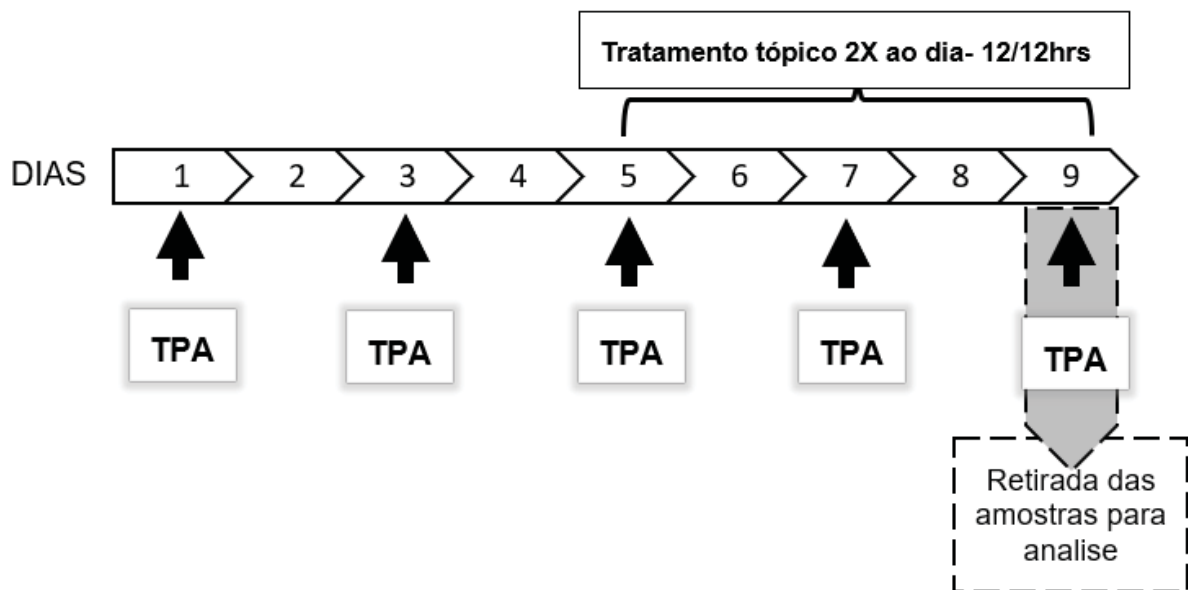


FIGURA 5: Desenho experimental do modelo de inflamação cutânea induzido pela múltipla aplicação de TPA. O TPA (2,5 µg/orelha) foi aplicado por via tópica uma vez ao dia, em dias alternados, durante 9 dias. Os tratamentos com extrato de *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) ou dexametasona (fármaco de referência, 0,1 mg/orelha) foram administrados por via tópica a partir do quinto dia a cada 12 horas. FONTE: O Autor (2019)

3.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As amostras de tecido (6 mm) coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA agudo e crônico foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70%, até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (H.E). As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), e o infiltrado celular, edema e espessura da epiderme foram avaliados em áreas representativas com aumento de 200x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 200x sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos de três animais por grupo. A quantificação desses parâmetros foi realizada com o auxílio do software ImageJ® versão 1.48 (National Institute of Health, EUA).

3.10 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA) E CITOQUERATINA 14 (K14) POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Objetivando verificar a proliferação e diferenciação celular da epiderme, foram utilizados dois marcadores celulares: o PCNA, para avaliar a proliferação e a K14 para analisar a diferenciação celular. Amostras de tecido das orelhas foram coletadas dos animais submetidos ao modelo de múltiplas administrações de TPA, emblocadas em parafina (como descrito no item 3.9) e seccionadas em cortes de 5 µm. Estes cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas. Posteriormente, as lâminas foram então submetidas a banhos de xilol para desparafinização e em seguida hidratadas com banhos sucessivos, em concentrações decrescentes de álcool. Logo após, as lâminas foram submetidas a um banho de glicina 0,1 M para o bloqueio dos radicais aldeídos, enquanto a peroxidase endógena e os sítios inespecíficos foram bloqueados com banhos de H₂O₂ 3% em metanol e PBS/BSA 1%, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal anti-PCNA (1:100, sc-9857- Santa Cruz Biotech, Inc., EUA) ou anti- K14 (1:100, sc-17104 -Santa Cruz Biotech, Inc., EUA), *overnight* a temperatura ambiente em câmara úmida. Após

banho com PBS, as lâminas foram novamente incubadas, desta vez com seu respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:100), durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB (Diaminobenzidina 3,3'; BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina por um período de 5 minutos e os cortes submetidos à desidratação com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes. Em seguida, as lâminas foram montadas com meio resinoso Entellan e lamínula. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão). A presença de células imunomarcadas positivamente para PCNA e K14 foram quantificadas a partir de áreas representativas, utilizando as imagens capturadas em microscopia óptica, com aumento de 100x e 400x. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células positivas para PCNA e K14 (células em marrom na epiderme) por campo (aumento de 400x), sendo analisados 4 cortes histológicos distintos por lâmina, havendo 3 animais por grupo. A quantificação foi realizada com o auxílio do software ImageJ® versão 1.48 (National Institute of Health, EUA).

3.11 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO

A atividade da enzima MPO é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado. Para a avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). As amostras de tecido (6 mm) da orelha dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por aplicação aguda e múltipla de TPA, foram adicionadas a 0,75 ml de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizadas por 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 ml de tampão fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram centrifugadas a 11.200 x g a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 µl de uma mistura contendo 100 µl de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µl de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µl de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µl de tetrametilbenzidina.HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de

dimetilformamida a 8%, promove o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 3 min, adicionando 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Multi-Mode Microplate reader Synergy HT) cuja leitura da absorbância foi realizada a 630 nm. Os resultados foram expressos em mili densidade óptica (mDO)/biópsia.

3.12 ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG

A atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido inflamado. A atividade da NAG foi avaliada utilizando a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras de tecido (6 mm) da orelha dos camundongos submetidos ao modelo de edema induzido por aplicação pela múltipla de TPA foram submetidas a protocolo semelhante ao descrito no item 3.11, contudo triplicatas de 25 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 100 µl de tampão citrato 50 mM (pH 4,5), e a reação foi iniciada pela adição de 25 µl de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água mili Q. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 µl de tampão glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática da NAG foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Multi-Mode Microplate reader Synergy HT), cuja leitura da absorbância foi realizada a 405 nm. Os resultados foram expressos em mili densidade óptica (mDO) / biópsia.

3.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO REPETIDA DO EXTRATO DE *C. rotundus* NA ESPESSURA DA PELE E PESO DE ÓRGÃOS LINFOIDES

Com o intuito de avaliar uma possível toxicidade da aplicação múltipla do extrato, os animais foram tratados com *C. rotundus* ou dexametasona por 7 dias a cada 12 h (duas vezes por dia). Os animais foram separados em 3 grupos: *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e naive (sem tratamento) e o peso dos animais foi avaliado diariamente. A espessura da orelha foi medida antes do início do tratamento (basal) e no último dia de tratamento. No oitavo dia, os animais foram eutanasiados e o peso do baço, glândulas adrenais, linfonodo auricular e timo foram aferidos, assim como a espessura da orelha.

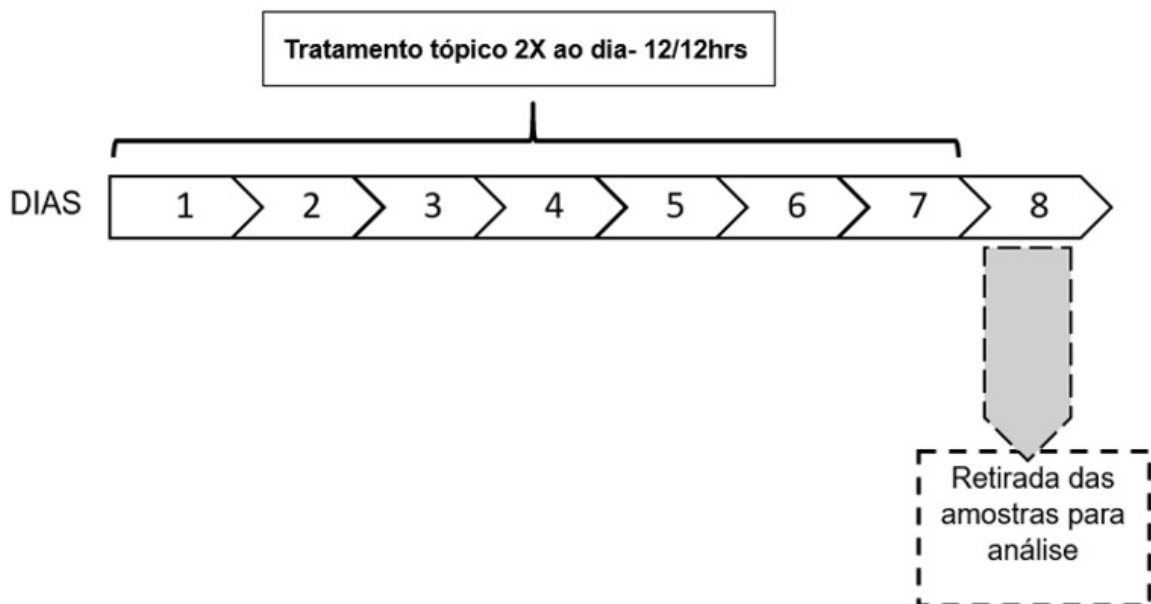


FIGURA 6: Desenho experimental. Nesse modelo objetivou-se a avaliação do efeito da aplicação repetida do extrato de *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) ou dexametasona (fármaco de referência, 0,1mg/orelha) nos animais por via tópica durante sete dias, a cada 12 horas. FONTE: O autor (2019).

3.14 ENSAIO DE REVERSÃO DO EFEITO DO EXTRATO COM ANTAGONISTA DE CORTICOIDE (RU486- MIFEPRISTONA)

Objetivando verificar o possível envolvimento de receptores de corticosteroides na atividade anti-inflamatória tópica do extrato de *C. rotundus*, os animais foram pré-tratados com o antagonista farmacológico RU486 (mifepristona) (50 mg/kg, s.c.) ou com o seu veículo Polietilenoglicol 400 (PEG400) e, após 30 min, o edema de orelha foi induzido pela aplicação de TPA e os tratamentos realizados topicamente com *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha). A espessura da orelha foi avaliada 6 h após a aplicação do TPA, e utilizada como indicador do processo inflamatório (CARRENHO *et al.*, 2015).

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias (modelo crônico e mifepristona), seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 7.00, San Diego Califórnia, EUA.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE QUALITATIVA DO EXTRATO DOS RIZOMAS DE *C. rotundus*

A triagem fitoquímica preliminar é considerada um estudo relevante de baixo custo, que objetiva conhecer o perfil fitoquímico de extratos, sem isolar compostos químicos (BESSA *et al.*, 2013). Os resultados dos testes qualitativos realizados foram positivos apenas para flavonoides, saponinas e taninos, conforme descrito na TABELA 4.

TABELA 4: RESULTADO PRELIMINAR DA ANÁLISE DO EXTRATO

Análise do extrato de <i>C. rotundus</i> Metabólitos secundários pesquisados	Resultados
Flavonoides	++
Alcaloides	-
Saponinas	++
Antraquinonas	-
Taninos	++
Triterpenos/Esteroides	--

Legenda: ++ reação moderada, + reação fraca, - sem reação

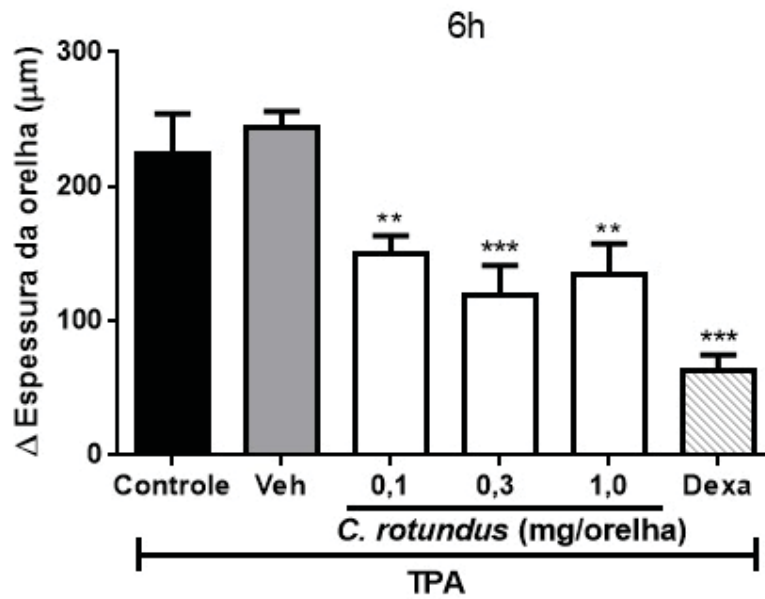
FONTE: O autor (2019).

4.2 TRATAMENTO TÓPICO COM EXTRATO DE *C. rotundus* NA INFLAMAÇÃO DE PELE INDUZIDA PELO TPA

A aplicação tópica do TPA promoveu a formação de edema, demonstrado pelo aumento da espessura da orelha 6 e 24 h após a sua aplicação, como observado na FIGURA 7a e b. O veículo usado para diluir o extrato, quando sozinho não interfere no edema causado pelo TPA. A aplicação tópica do extrato de *C. rotundus* foi capaz de inibir a formação do edema em todas as doses testadas, apresentando inibição de $38,60 \pm 5,51$ % com 0,1 mg/orelha, $51,05 \pm 8,96$ % na dose de 0,3 mg/orelha e $44,67 \pm 9,14$ % na dose de 1,0 mg/orelha. O controle positivo dexametasona (0,1 mg/orelha) também causou a inibição significativa do edema de $73,94 \pm 4,61$ %, comparado ao grupo veículo do experimento. Após 24 h da aplicação de TPA (FIGURA 7b), a redução do edema se manteve quando comparado com o grupo veículo em todas as doses do extrato: 0,1 mg/orelha ($56,91 \pm 9,58$ %); 0,3 mg/orelha ($76,61 \pm 9,35$ %); 1,0 mg/orelha ($71,85 \pm 2,33$), assim como o controle positivo dexametasona ($83,45 \pm 8,85$ %).

A administração de TPA nas orelhas induziu aumento significativo na atividade da enzima MPO, quando comparado ao grupo naive. Esse aumento causado pelo TPA não sofre interferência do veículo, e foi inibido pelo tratamento tópico com as diferentes doses do extrato, sendo observado inibição $42,46 \pm 5,81$ % (0,1 mg/orelha), $89,82 \pm 2,16$ % (0,3 mg/orelha), $82,54 \pm 1,17$ (1,0 mg/orelha) (FIGURA 8). O glicocorticoide dexametasona também foi capaz de reverter o aumento da atividade da MPO em $93,88 \pm 1,90$ % como observado na FIGURA 8.

a)



b)

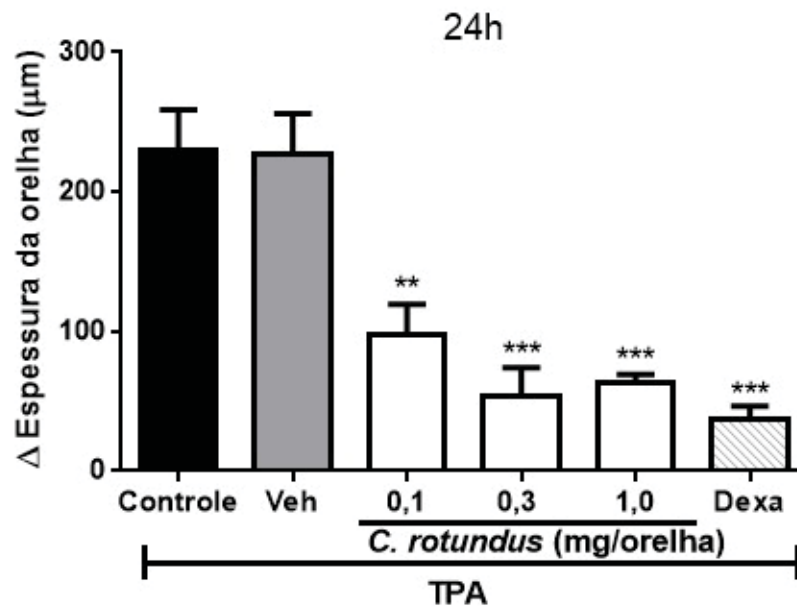


FIGURA 7. Efeito do tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* no modelo de edema de orelha induzido por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA (2,5 μg/orelha). Em seguida, foi realizado o tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* diluído em 3:7 etanol/acetona, nas doses de 0,1; 0,3; 1,0 mg/orelha, ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 (a) e 24 h (b) da aplicação do TPA, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média ± SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Controle (somente TPA); Veículo (Veh, 3:7 etanol e acetona); *C. rotundus* (doses do extrato), dexametasona (Dexa, controle positivo). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo veículo (Veh) ** p <0,01 *** p <0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc).

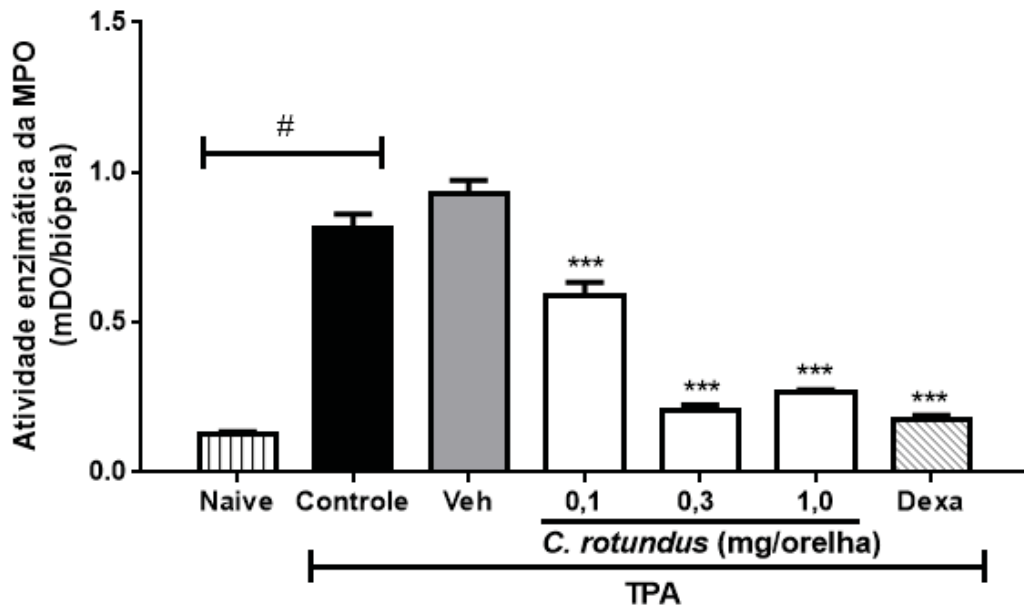
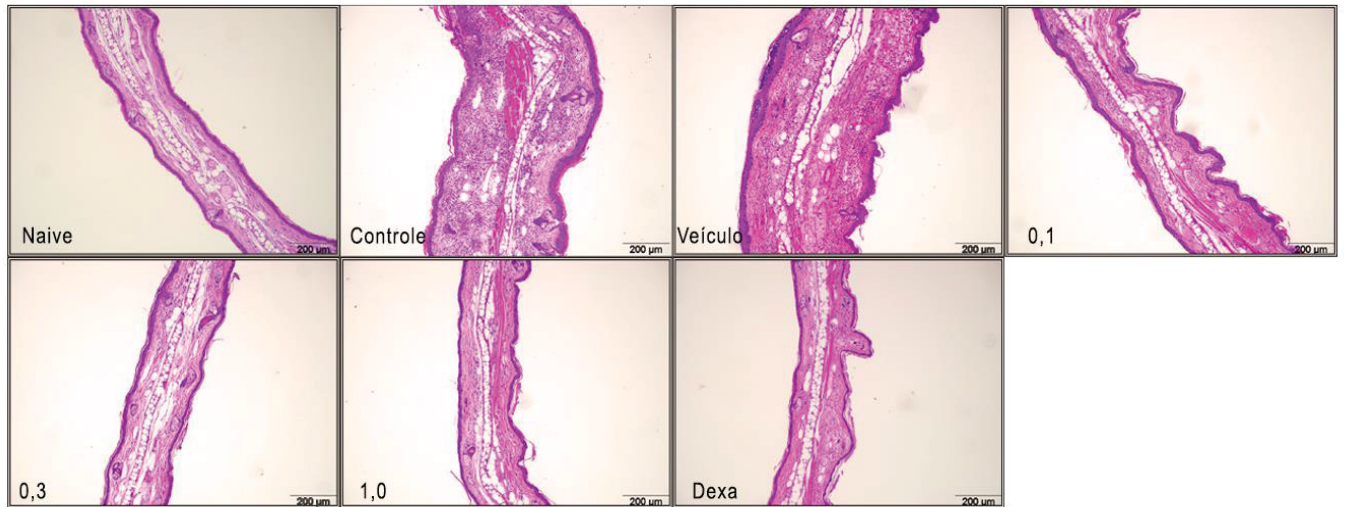


FIGURA 8. Efeito do tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* sobre o aumento na atividade da enzima MPO causada pelo TPA. Após 24 h da aplicação do TPA, as amostras teciduais de orelha (6 mm) foram coletadas e submetidas à análise da atividade da enzima MPO. As barras representam a média \pm SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); Veículo (Veh, 3:7 etanol e acetona); extrato da *C. rotundus* (0,1, 0,3 e 1,0 mg/orelha), dexametasona (Dexta, 0,1 mg/orelha). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo veículo (Veh) ***p <0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e # representa diferença entre o naive e controle.

Para confirmar o efeito do extrato de *C. rotundus* na inflamação cutânea induzida pelo TPA, foi realizada a análise histológica (FIGURA 9a). A análise dos cortes histológicos das orelhas dos camundongos indica que o tratamento com TPA após 24 h propiciou intenso infiltrado celular na derme e edema, o mesmo foi observado no grupo tratado apenas com o veículo. O tratamento com o extrato de *C. rotundus* nas diferentes doses reduziu o infiltrado celular na derme, apresentando inibição na dose 0,1 mg/orelha de $63,64 \pm 5,97$ %, na dose de 0,3 mg/orelha de $94,59 \pm 2,94$ %, na dose 1,0 mg/orelha $92,36 \pm 2,34$ %, assim como o controle positivo dexametasona que promoveu uma inibição de $96,00 \pm 1,08$ % (FIGURA 9b).

a)



b)

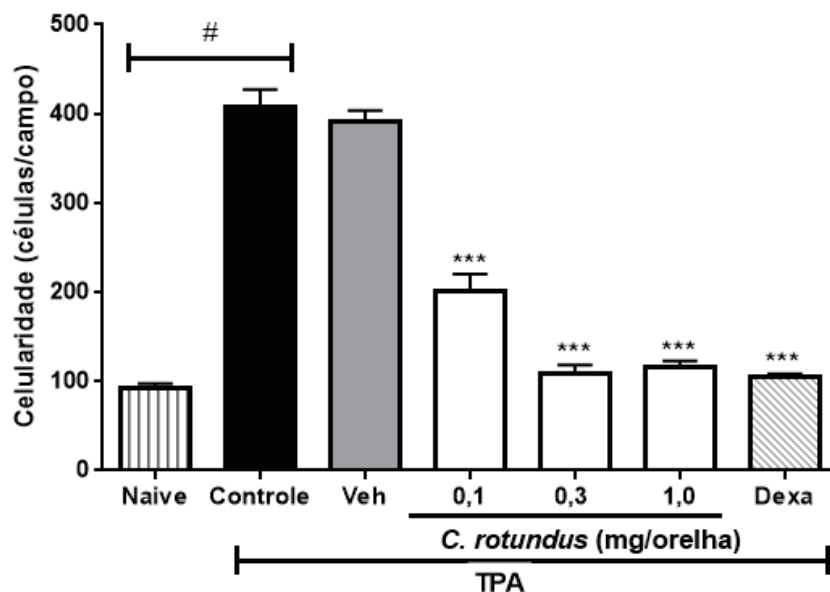


FIGURA 9. Influência do tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* sobre a infiltração celular induzida por TPA. (a) A partir de amostras teciduais (6 mm) coletadas no do modelo de inflamação induzida por TPA, foram realizadas análises histológicas onde as imagens foram adquiridas com microscópio óptico, e foi quantificada a celularidade pelo software Prism 7.0. (b) A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 200x em três campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras representam a média \pm SEM (n=3) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); Veículo (Veh, 3:7 etanol e acetona); *C. rotundus* (0,1, 0,3 e 1,0 mg/orelha), Dexa (dexametasona, 0,1 mg/orelha). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo veículo (Veh) *** p < 0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e # representa diferença entre o naive e controle.

4.3 MODELO INFLAMATÓRIO INDUZIDO PELO AA

Como observado na FIGURA 10, a administração tópica do AA (2 mg/orelha) na orelha promoveu o aumento da espessura da orelha após 1 h. Novamente verificamos que o veículo sozinho usado para preparar o extrato não interfere na resposta inflamatória do AA. Contudo apenas o tratamento tópico de *C. rotundus* na dose de 0,3 mg/orelha foi capaz de reduzir o edema em $58,05 \pm 12,76\%$ quando comparado com o grupo veículo. O controle positivo Indometacina, anti-inflamatório não esteroide, inibiu ($60,30 \pm 5,24\%$) de forma significativa a espessura da orelha quando comparada com o veículo.

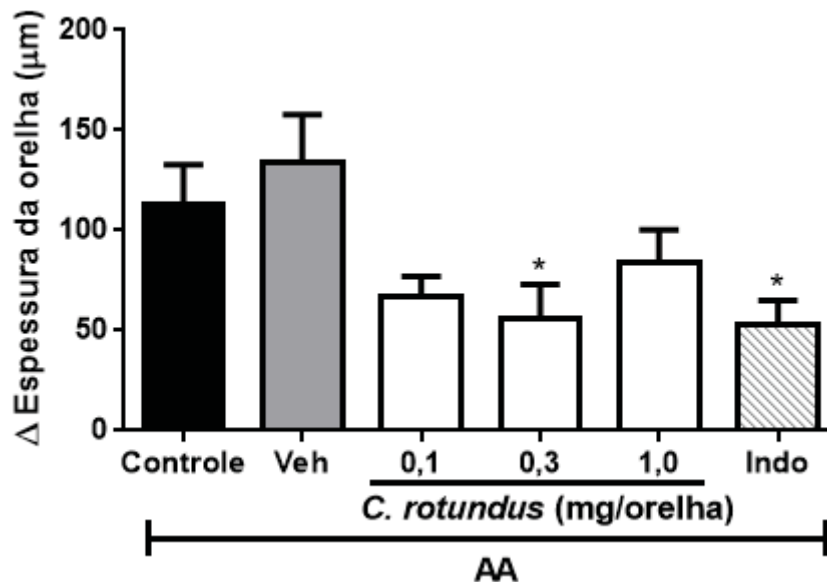


FIGURA 10. Efeito do tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* no modelo de edema de orelha induzido por AA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de AA (2,0 mg/orelha). Em seguida, foi realizado o tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* (dose de 0,1; 0,3; 1,0 mg/orelha), veículo ou indometacina (2,0 mg/orelha). A espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro 1 h após a aplicação do AA. As barras representam a média \pm SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Controle (somente AA); Veículo (Veh, 3:7 etanol e acetona); *C. rotundus* (doses do extrato), Indometacina (Indo, controle positivo). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo veículo (Veh) *p <0,005 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc).

4.4 TRATAMENTO TÓPICO COM EXTRATO DE *C. rotundus* NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DA PELE INDUZIDA POR MÚLTIPLAS APLICAÇÕES DE TPA

Para verificar se a atividade anti-inflamatória demonstrada pelo extrato de *C. rotundus* aplicado topicamente se manteria em uma situação de processo inflamatório já estabelecido, os animais foram submetidos ao protocolo que mimetiza o processo inflamatório crônico de pele onde o edema de orelha é induzido pelas múltiplas aplicações de TPA na orelha dos camundongos. Nesse experimento, foi testada apenas a dose de 0,3 mg/orelha. A múltipla aplicação de TPA em dias alternados promoveu edema, migração leucocitária e aumento da espessura da epiderme da orelha dos animais (FIGURAS 11, 12 e 13). No quinto dia do protocolo, onde está estabelecido o processo inflamatório, o tratamento com o extrato de *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) foi capaz de reduzir a formação do edema sendo observado uma redução de $68,38 \pm 7,86$ % no 9° dia de tratamento. O controle positivo dexametasona foi capaz de reduzir o edema com inibição de $87,21 \pm 3,50$ % no 9° dia quando comparado com o grupo controle (FIGURA 11).

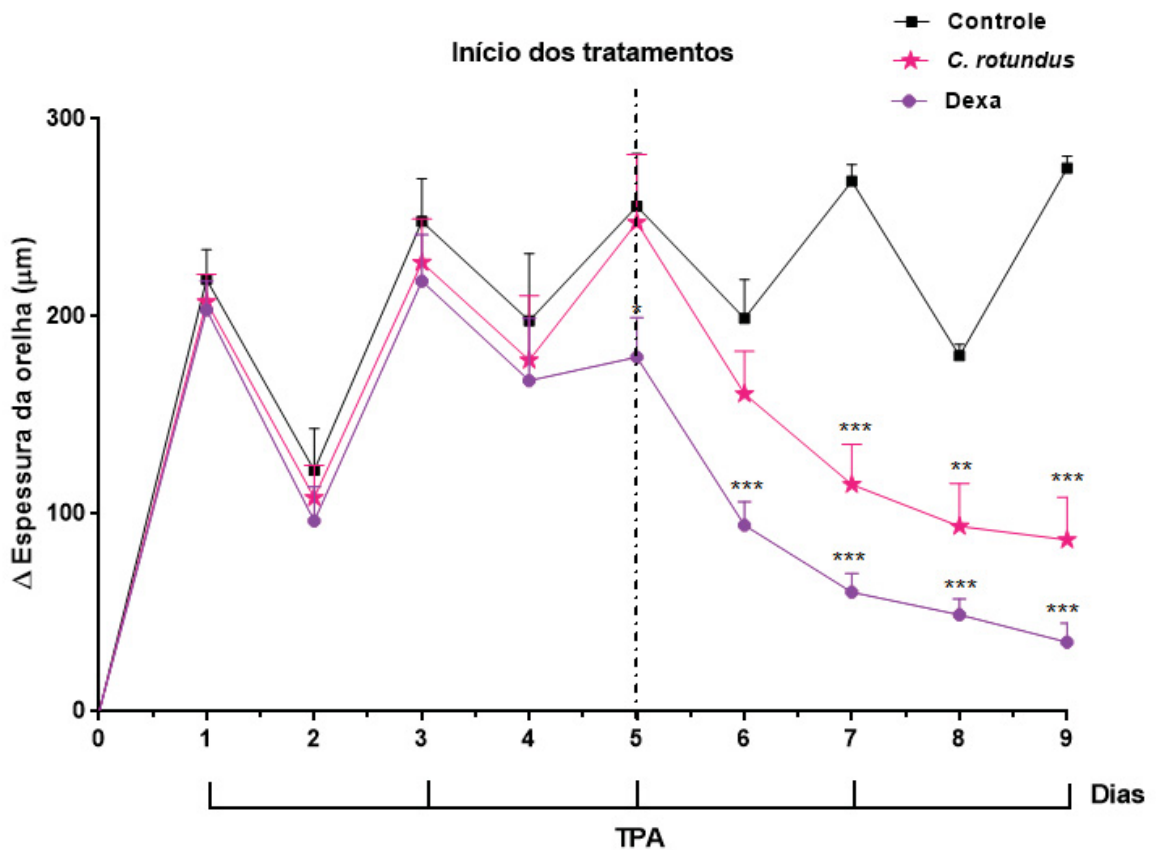
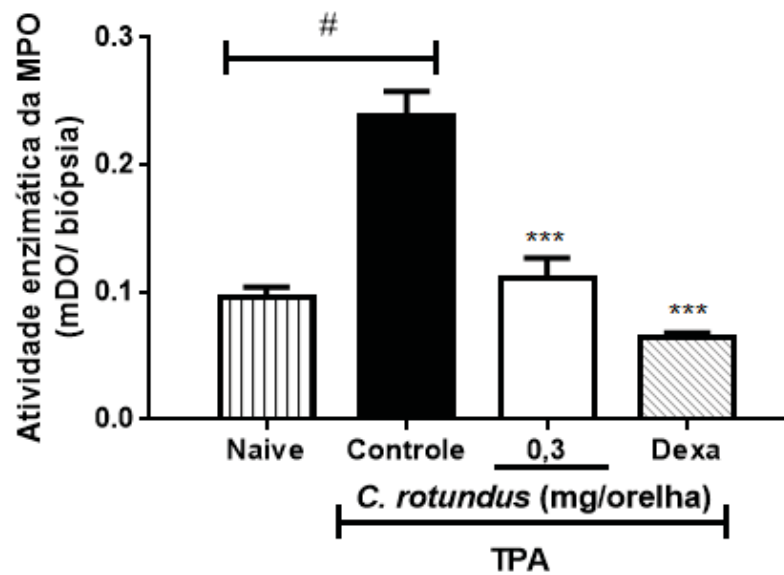


FIGURA 11. Aplicação tópica do extrato de *C. rotundus* reduz o edema de orelha causado por modelo crônico. O processo inflamatório crônico foi induzido com a aplicação tópica de TPA (2,5 μg/orelha) em dias alternados durante 9 dias. A partir do 5º dia foi iniciado o tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) administrados 2 vezes ao dia. A espessura da orelha foi medida diariamente. As barras representam a média ± SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexa (dexametasona, controle positivo). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo controle (somente TPA) ** p <0,01 *** p <0,001 (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc).

No ensaio enzimático da MPO o extrato de *C. rotundus* na dose de 0,3 mg/orelha foi capaz de inibir a atividade da enzima em $89,18 \pm 11,10\%$ (FIGURA 12a). Resultado semelhante foi observado com a dexametasona (0,1 mg/orelha), que foi capaz de inibir a atividade da enzima a níveis basais. Entretanto, na atividade enzimática da NAG, que representa a presença indireta de células mononucleares, o extrato de *C. rotundus* na dose de 0,3 mg/orelha não causou alteração significativa e a dexametasona promoveu redução de $86,71 \pm 7,36\%$ na atividade da enzima (FIGURA 12b).

a)



b)

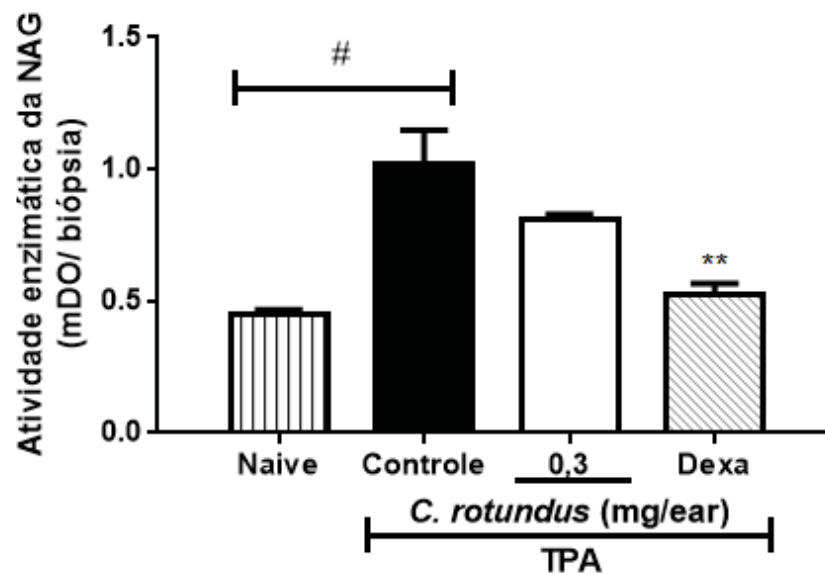


FIGURA 12: Efeito do extrato de *C. rotundus* sobre a atividade das enzimas MPO (a) e NAG (b) na inflamação crônica da pele induzida por aplicações múltiplas de TPA. Após o 9º dia da aplicação do TPA as amostras teciduais de orelha (6mm) foram coletadas e submetidas à análise da atividade da enzima MPO e NAG. As barras representam a média \pm SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexta (dexametasona, 0,1 mg/orelha). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo de controle (somente TPA) ** p <0,01 *** p <0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e # representa diferença entre o naive e controle.

Para avaliar a migração leucocitária, foi realizado a análise histológica do tecido das orelhas após a múltipla administração tópica de TPA (FIGURA 13).

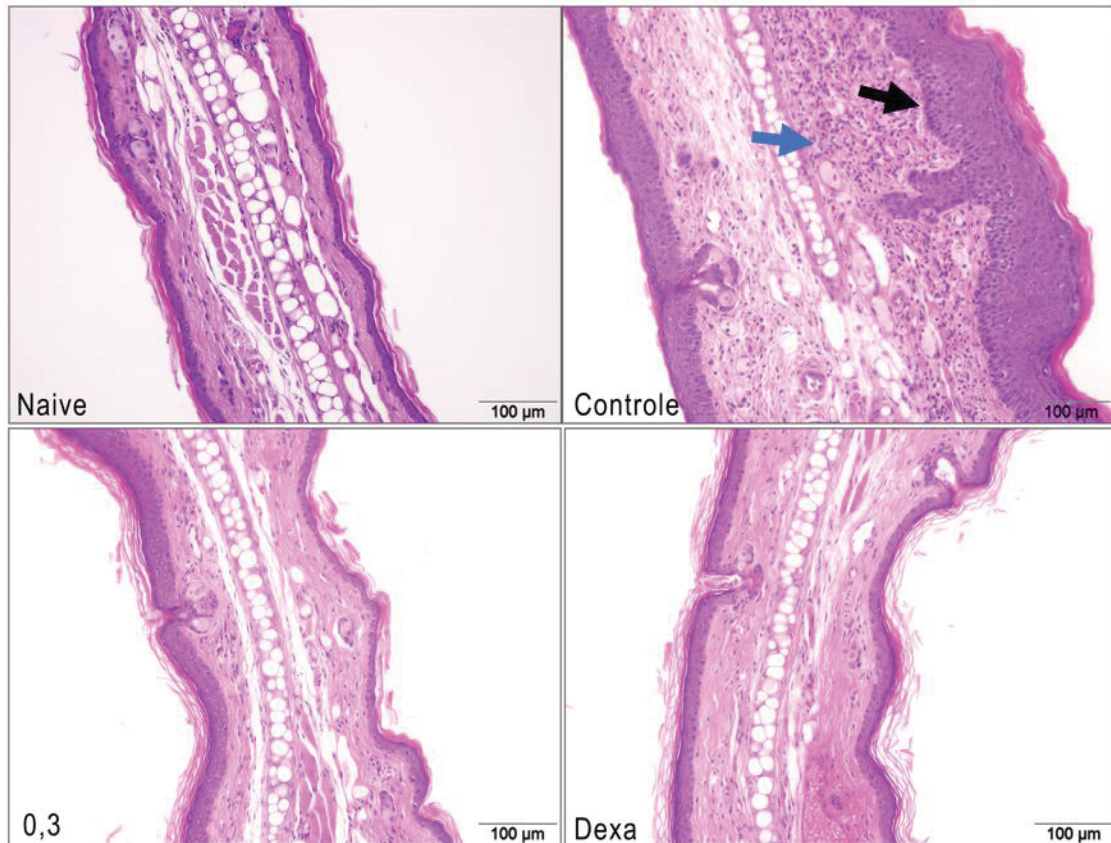
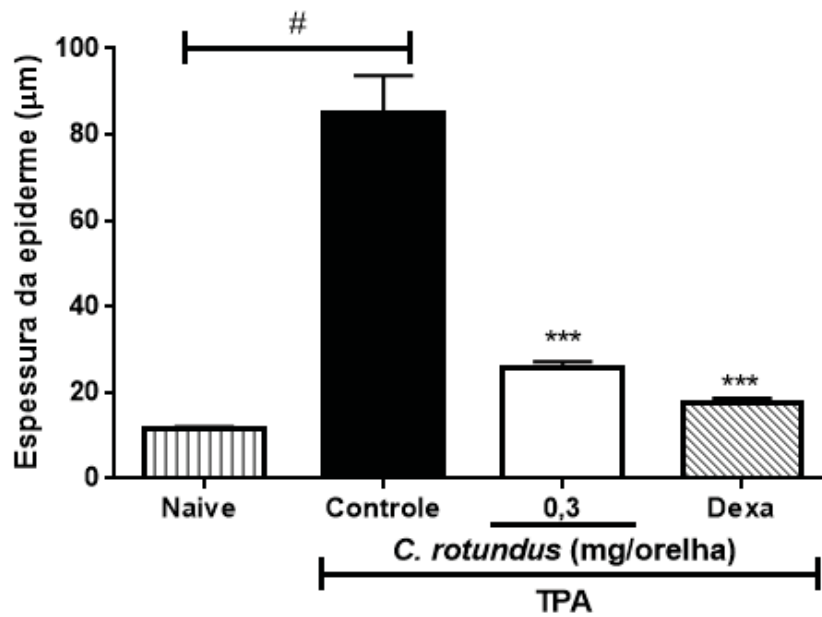


FIGURA 13. Fotos representativas da análise histológica do tecido das orelhas de animais submetidos à múltiplas aplicações de TPA e o efeito do extrato de *C. Rotundus*. A partir de amostras teciduais (6 mm) coletadas no 9º dia no modelo de edema induzido pelo TPA, foram realizadas análises histológicas onde as imagens foram adquiridas com microscópio óptico. A quantificação da celularidade foi feita pelo software Prisma 7.0. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexa (dexametasona 0,1 mg/orelha). A seta em preto representa o aumento da espessura da epiderme e a flecha em azul indica região de intensa celularidade.

Na FIGURA 13 é possível verificar que a múltipla aplicação de TPA promoveu a hipertrofia da epiderme, causada pela intensa proliferação de queratinócitos e aumento da celularidade na derme, quando comparado ao tecido de animais naive. O tratamento com o extrato de *C. rotundus* propiciou redução na espessura epidérmica de $80,95 \pm 2,11\%$ e de $76,76 \pm 1,72\%$ na migração celular na derme. O controle positivo dexametasona também reduziu em $91,85 \pm 1,50\%$ a espessura da epiderme e em $95,30 \pm 1,58\%$ a migração celular dérmica (FIGURA 14).

a)



b)

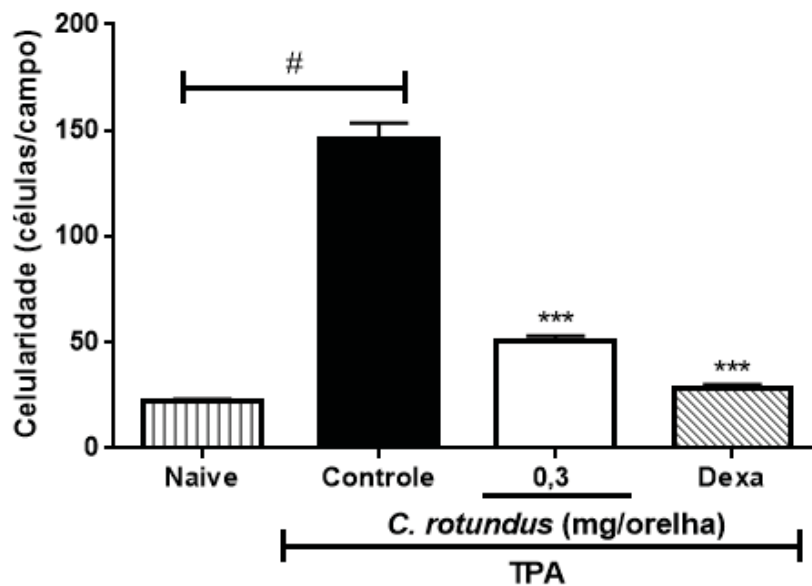
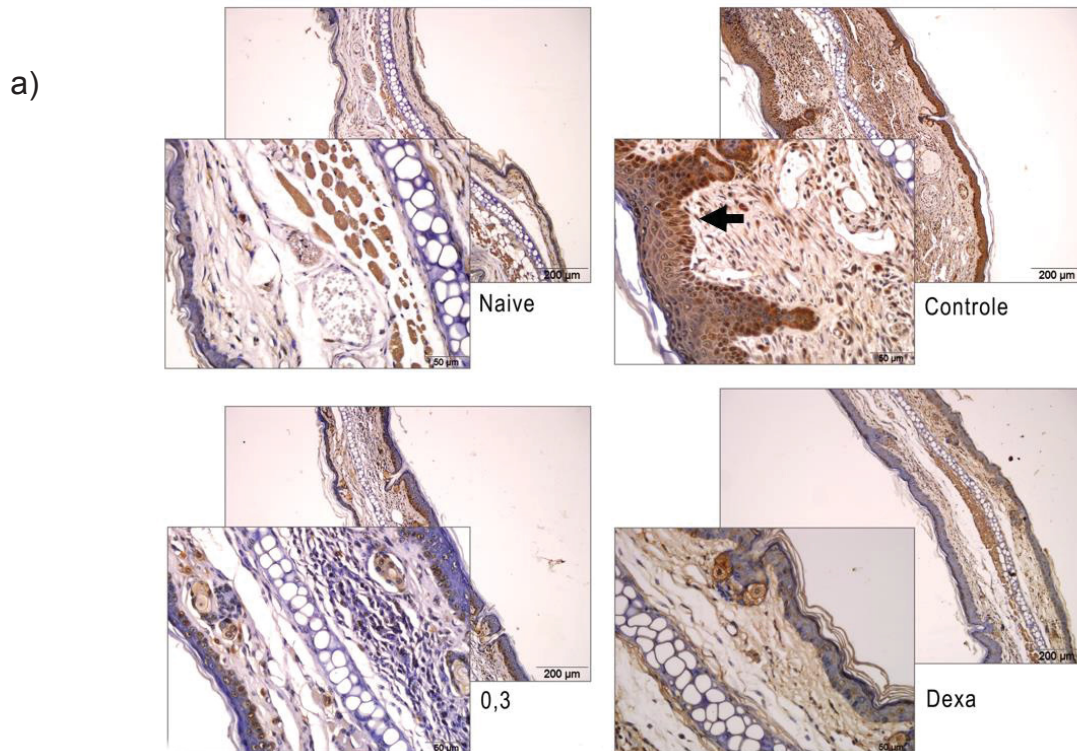


FIGURA 14: Efeito do extrato de *C. rotundus* sobre espessura da epiderme e migração leucocitária na derme induzida pela aplicação múltipla de TPA. Quantificação da análise histológica de (a) espessura da epiderme e (b) celularidade após múltiplas aplicações de TPA. A quantificação da celularidade foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 200x em três campos distintos de quatro cortes histológicos de cada grupo, assim como a espessura da epiderme. As barras representam a média \pm SEM ($n=6$) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexta (dexametasona 0,1 mg/orelha). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo controle (somente TPA) ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e # representa diferença entre o naive e controle.

Para verificar a taxa de multiplicação celular na epiderme utilizamos a quantificação da expressão da proteína PCNA nas amostras de orelhas de animais submetidos ao protocolo das múltiplas aplicações de TPA. Na FIGURA 15a é possível observar que todos os grupos apresentaram células em proliferação, positivas para PCNA, mas a marcação é muito mais intensa no grupo Controle, com nítida redução pelos tratamentos com *C. rotundus* e dexametasona. O grupo controle apresentou níveis aumentados de células positivas para PCNA, enquanto o tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* inibiu em $73,18 \pm 3,80\%$ este aumento (FIGURA 15b). A dexametasona (controle positivo) promoveu redução dos níveis de PCNA em $94,20 \pm 1,34\%$ (FIGURA 15b).

Objetivando verificar a influência do tratamento com o extrato sob a diferenciação dos queratinócitos, foi realizado a imuno-marcação da K14 na pele das orelhas após os tratamentos no modelo crônico de inflamação (FIGURA 16). Nas fotos representativas notam-se células positivas K14 na amostra de todos os grupos (FIGURA 16a); de tal modo que o grupo controle exibiu níveis aumentados e o tratamento com o extrato e o controle positivo promoveram uma redução das células positivas, quando comparado ao tecido de animais naive. A aplicação repetida de TPA causou aumento no número de células positivas K14, e o tratamento com o extrato reduziu em $76,56 \pm 1,39\%$. Já a aplicação de dexametasona inibiu em $96,42 \pm 1,32\%$ o número de células K14 positivas (FIGURA 16b).



b)

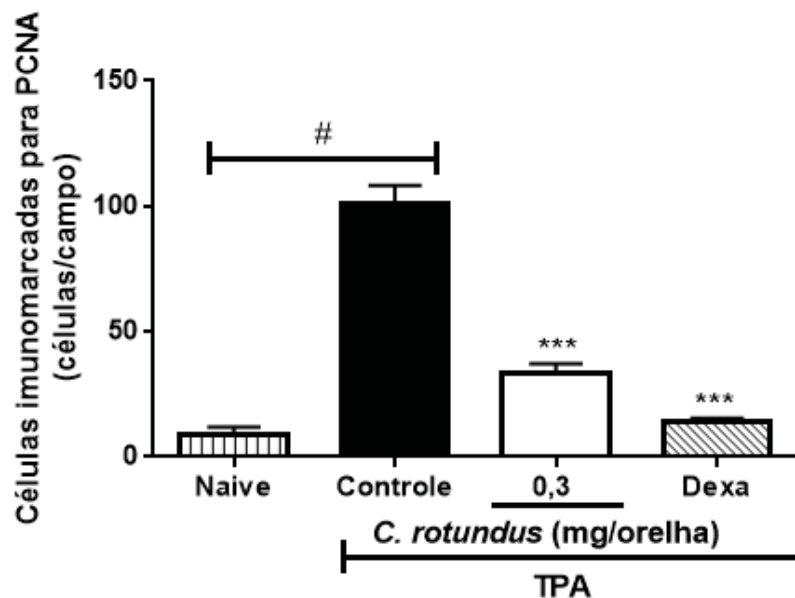
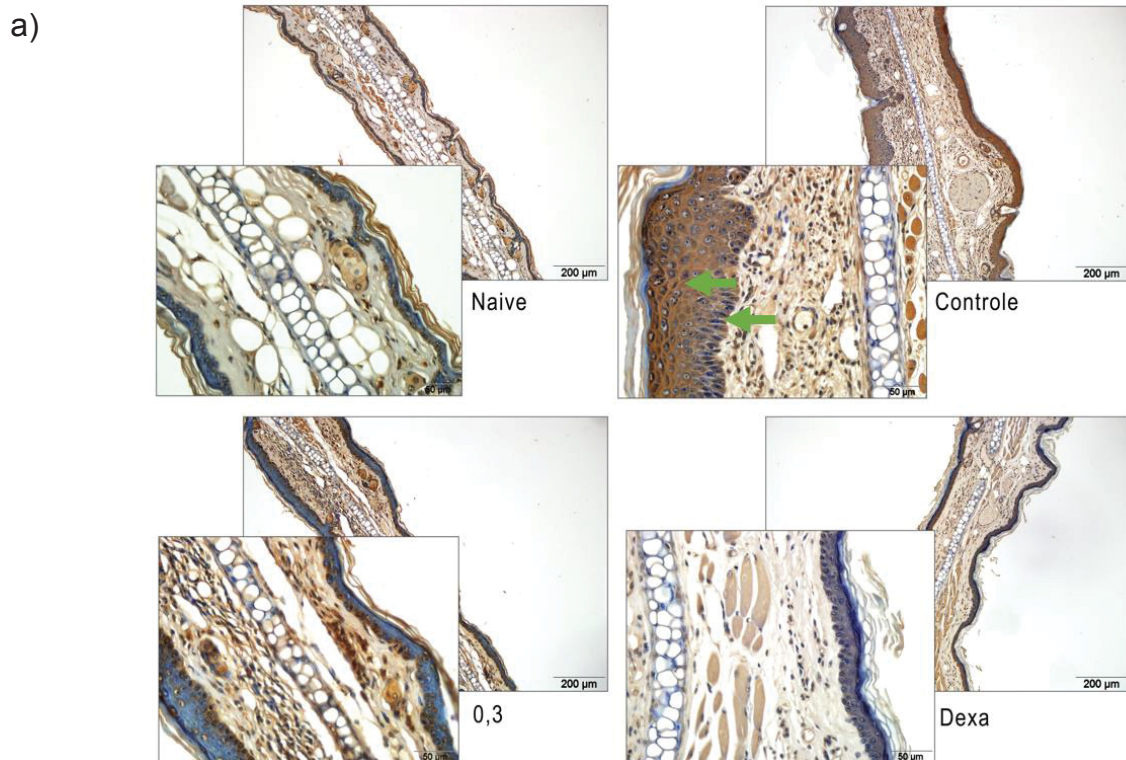


FIGURA 15: Influência do tratamento com o extrato de *C. rotundus* sobre a imunomarcagem da proteína PCNA em tecidos submetidos aplicação múltipla de TPA. A partir de amostras teciduais (6 mm) coletadas no 9º dia do modelo de inflamação induzida por TPA, foram realizadas análise de imuno-histoquímica para PCNA. (a) Fotos representativas e (b) quantificação de células positivas para PCNA avaliada no aumento de 400x de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras representam a média \pm SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexa (dexametasona, 0,1 mg/orelha). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo controle (somente TPA) *** p <0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e # representa diferença entre o naive e controle. A flecha preta indica células em proliferação.



b)

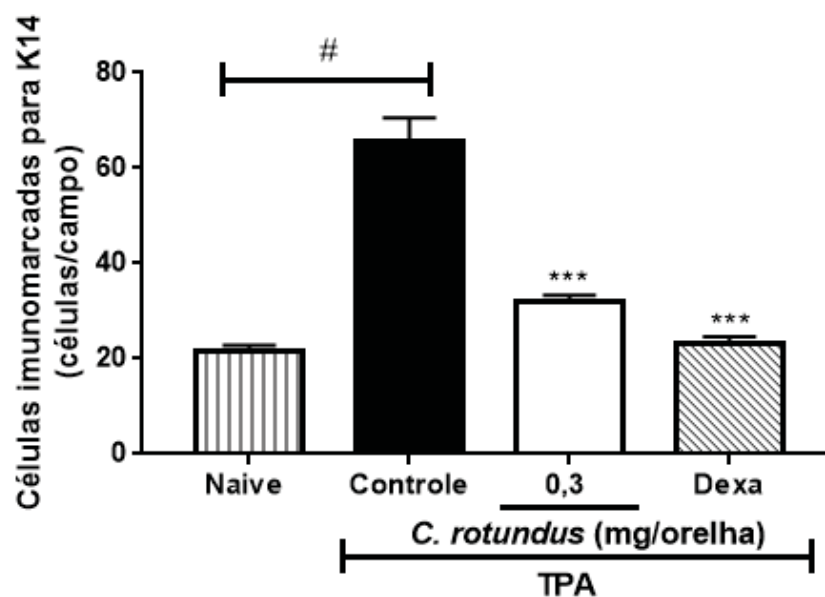


FIGURA 16: Efeito do extrato de *C. rotundus* sobre diferenciação dos queratinócitos (K14) após a aplicação múltipla de TPA. A partir de amostras teciduais (6 mm) coletadas no 9º dia do modelo de inflamação induzida por TPA, foram realizadas análise de imuno-histoquímica (a) e quantificação de células positivas para K14 (b) com aumento de 400x de quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras representam a média \pm SEM (n = 6) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexa (dexametasona 0,1 mg/orelha). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo controle (somente TPA) *** p < 0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e # representa diferença entre o naive e controle. A flecha verde indica células em diferenciação.

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO DO EXTRATO DE *C. rotundus* NA ATROFIA CUTÂNEA E NOS ÓRGÃOS LINFOIDES.

A fim de verificar uma possível toxicidade do tratamento tópico do extrato de *C. rotundus*, camundongos foram tratados por via tópica na orelha por 7 dias, duas vezes ao dia com o extrato ou o controle positivo. Conforme demonstrado na FIGURA 17a, nenhum dos tratamentos alterou o peso corporal dos animais.

Diferente do grupo da dexametasona, o tratamento com *C. rotundus* não foi capaz de reduzir a espessura da orelha e causar atrofia cutânea, ao contrário do grupo tratado com a dexametasona que reduziu significativamente a espessura da orelha em $36,33 \pm 5,65 \mu\text{m}$ quando comparado com o grupo naive (FIGURA 17b).

O peso dos órgãos linfoides e adrenais, não foi observado nenhum efeito adverso significativo no grupo tratado com o extrato, diferente da dexametasona, onde foi observado como efeito colateral a redução do peso do baço em $73,16 \pm 3,05\%$ e timo em $84,79 \pm 2,81\%$ (FIGURA 17d e 17e).

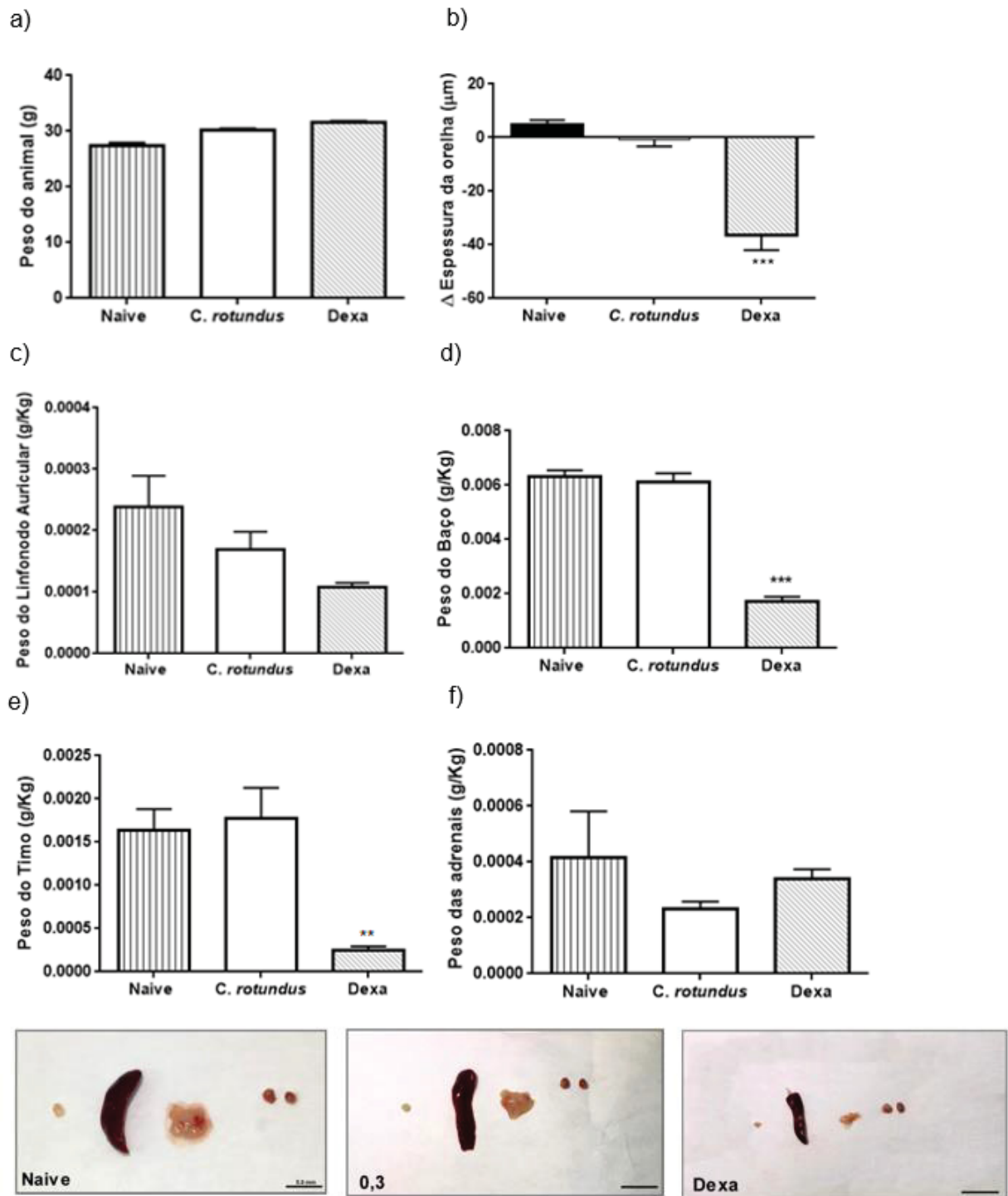


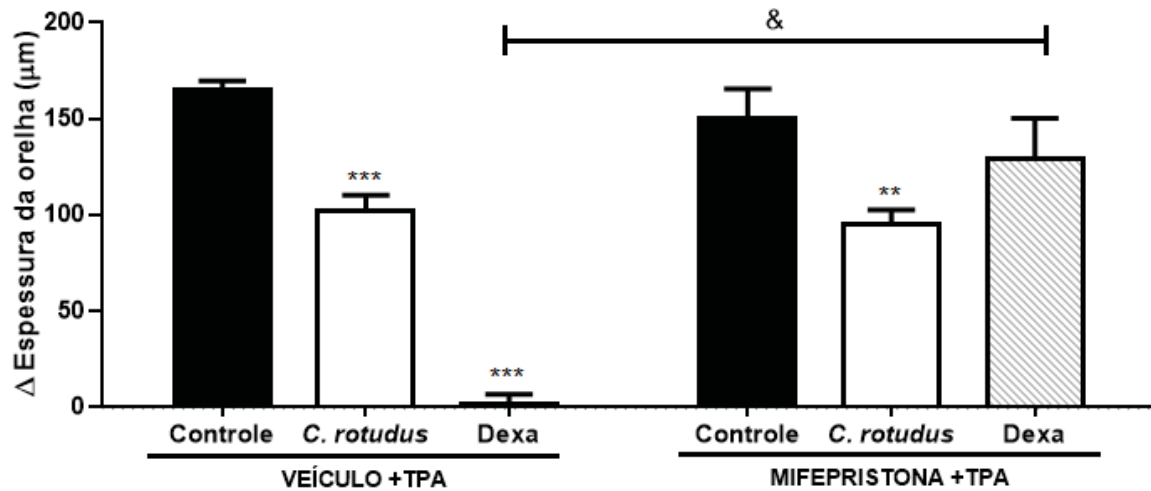
FIGURA 17: Influência do tratamento tópico com extrato de *C. rotundus* na atrofia cutânea e nos órgãos linfoides. (A) o peso dos animais, (B) espessura da orelha, peso, (C) linfonodo auricular, (D), peso do baço (E) peso do timo e (F) das glândulas adrenais. O tratamento com o extrato de *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) ou da dexametasona (0,1 mg/orelha) foi realizado duas vezes ao dia em um período de sete dias e a espessura da orelha direta dos animais foi avaliada no 1º e último dia de experimento. As amostras foram coletadas no último dia de experimento. As barras representam a média \pm SEM (n =6) da espessura aumentada da orelha. Naive (sem tratamento); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexa (dexametasona). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo naive (sem tratamento) ** p < 0,01 *** p < 0,001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc).

4.6 ENSAIO DE REVERSÃO POR ANTAGONISTA DE GLICOCORTICOIDE

Conforme demonstrado na FIGURA 18a, o pré-tratamento com PEG 400, não interferiu no aumento da espessura da orelha com a administração de TPA e na atividade da mieloperoxidase (FIGURA 18b). A aplicação tópica do extrato promoveu inibição de $38.20 \pm 7,8\%$ na formação do edema e na atividade da MPO em $90,14 \pm 10,25\%$ assim como a dexametasona $98.89 \pm 5.08\%$ e $95,96 \pm 10,7\%$, respectivamente, quando comparados com o grupo TPA/PEG400.

Em contrapartida, como esperado, o pré-tratamento com a mifepristona reverteu o efeito anti-edematogênico e a atividade da MPO do grupo tratado com dexametasona, quando comparado com o grupo TPA/mifepristona. Contudo, o pré-tratamento com a mifepristona não reverteu o efeito do tratamento com o extrato na espessura da orelha (inibiu a formação do edema em $38.54 \pm 4.91\%$) e na atividade da MPO (reduziu a atividade da enzima em $68,64 \pm 9,74\%$) quando comparados com o grupo TPA/mifepristona (FIGURA 18a e 18b).

a)



b)

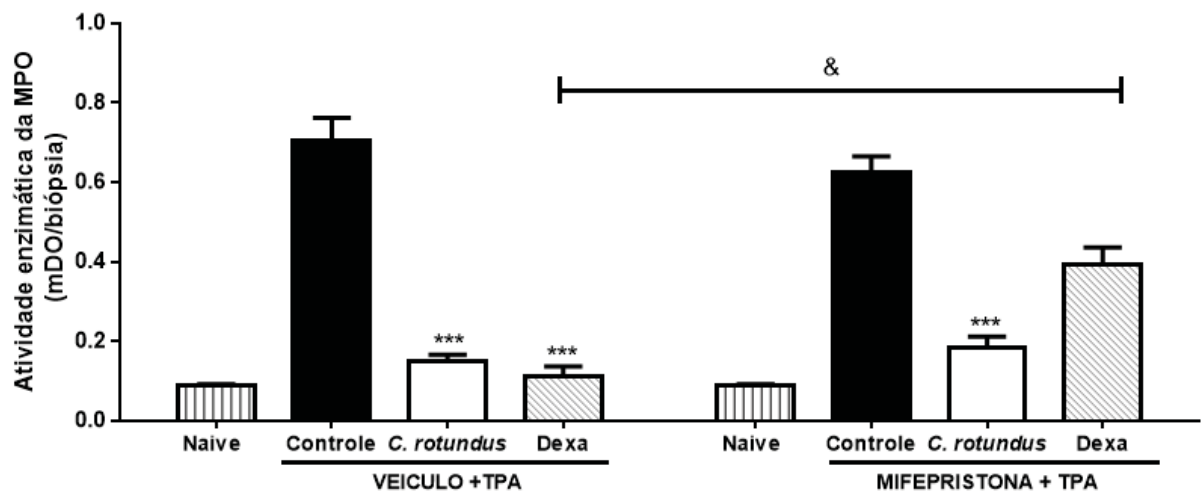


FIGURA 18: Influência do antagonista de glicocorticoides no efeito anti-inflamatório do extrato de *C. rotundus*. A mifepristona (50 mg/Kg, s.c.) foi administrada 30 minutos antes do TPA. Foi realizado o tratamento com *C. rotundus* (0,3 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) logo após a administração de TPA. O edema da orelha foi medido 6 horas após a administração do TPA (a) e atividade da enzima MPO (b) foi avaliada 24 h após. As barras representam a média \pm SEM (n =6-11). Naive (sem tratamento); Veículo (PEG 400); Controle (somente TPA); *C. rotundus* (0,3 mg/orelha), Dexa (dexametasona, controle positivo). Os símbolos representam o nível de significância ao comparar os grupos de tratamento com o grupo de controle (TPA + Veículo) e (TPA + Antagonista). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni post-hoc) e & representa diferença entre os grupos (Dexa+ Veículo) e (Dexa+ Mifepristona).

5 DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, *C. rotundus* é uma planta de uso popular, utilizada para o tratamento de condições inflamatórias entre outras desordens por vários grupos étnicos, em países asiáticos praticantes da medicina Ayurveda (MEENA *et al.*, 2010). A grande utilização popular dessa planta, têm despertado interesse em pesquisadores devido ao conhecimento sobre seu potencial terapêutico e dos seus compostos bioativos.

Existem muitos relatos na literatura sobre o efeito medicinal de *C. rotundus*. Neste estudo, mostramos pela primeira vez que o extrato de *C. rotundus* tem uma atividade tópica anti-inflamatória em diferentes modelos de inflamação da pele. Exibimos que o extrato de rizoma de *C. rotundus* aplicado diretamente na pele foi eficaz, reduzindo quase completamente a resposta inflamatória causada pelo TPA e pelo AA. Em todos os parâmetros avaliados, o extrato reduziu todos os parâmetros inflamatórios relacionados à dermatite irritativa, que são edema e migração celular

Diversos estudos já mostraram o potencial anti-inflamatório de *C. rotundus*. Conforme revisado por Kumar, Rani e Meher (2017), a atividade anti-inflamatória do extrato de rizoma de *C. rotundus* foi descrita pela primeira vez por Gupta e colaboradores em 1971 no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Chithran *et al.* (2012) avaliaram o efeito anti-edematogênico do uso do extrato etanólico do tubérculo neste mesmo modelo de inflamação aguda, verificando uma atividade anti-inflamatória semelhante ao controle positivo indometacina. Puratchikody *et al.*, (2006), por sua vez, avaliaram a atividade cicatrizante de feridas utilizando a parte tuberosa de *C. rotundus* em forma de pomada em modelos de cicatrização (modelo de excisão de pele), observando uma redução do tempo de fechamento da ferida comparado ao controle, sugerindo a utilização de *C. rotundus* como um cicatrizante natural. Seo *et al.* (2001) observaram o uso do extrato metanólico dos rizomas da planta como candidato anti-inflamatório para o tratamento de doenças inflamatórias mediadas pela superprodução de óxido nítrico e superóxido. Das e Misra (1988) fizeram um levantamento etnomedicinal de 35 plantas utilizadas como tratamento de várias desordens nas tribos do distrito de Koraput, em Orissa (Índia), sendo as raízes de *C. rotundus* utilizadas por via oral como tratamento de dermatite. Porém não existe nenhum dado científico sobre a atividade anti-inflamatória de *C. rotundus* como tratamento das desordens de pele.

A pesquisa fitoquímica da planta é importante principalmente quando ainda não existem estudos químicos com a espécie de interesse, proporcionando a identificação de grupos de metabólitos secundários relevantes. O estudo preliminar com o extrato foi realizado devido à indicação popular observada a partir do levantamento etnofarmacológico na literatura (BESSA *et al.*, 2013). No teste de triagem realizado, identificamos a presença de flavonoides, saponinas e taninos no extrato dos rizomas de *C. rotundus*.

A capacidade anti-inflamatória de várias plantas medicinais pode ser referida à existência de diversos metabólitos como: flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas e antraquinonas, que atuam como inibidores de mediadores pró-inflamatórios e alvos moleculares nas respostas inflamatórias. Plantas que apresentam saponinas e flavonóides são relatadas com várias ações farmacológicas como atividade antiviral, antitumoral, antimicrobiana, etc., entre elas a anti-inflamatória. (NAVARRO *et al.*, 2001; SPARG, LIGHT, VAN STADEN, 2004; BESSA *et al.*, 2013; MANOSROI *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2017). Samariya e Sarin, (2013) isolaram 4 flavonoides (quercetina, kaempferol, catequina e miricetina) dos rizomas de *C. rotundus* e identificaram que a quercetina está presente em grandes quantidades, composto este, conhecido por atuar em várias vias moleculares envolvidos com a resposta inflamatória. Segundo Lee *et al.* (2018) a vias do NF- κ B, Erk1/2 e JNK podem ser alvos moleculares de quercetina em uma resposta inflamatória induzida por LPS. Recentemente, Hou *et al.* (2019) observaram que o tratamento com quercetina atenuou a expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α) por imuno-histoquímica em modelo de dermatite atópica induzida por MC903 em camundongos.

Como revisado por Peezarda e colaboradores (2015) vários estudos relataram a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenóides, sesquiterpenóides e entre outros, no óleo essencial dos rizomas e tubérculos de *C. rotundus*. Isso se justifica, porque os rizomas e tubérculos dessa planta são ricos em metabólitos secundários na forma de óleos essenciais. Sendo assim, estudos complementares sobre a identificação e isolamento compostos fitoquímicos de diferentes extratos (etanólico, metanólico, aquoso) dos rizomas ainda são escassos, porém, são necessários para associar prováveis atividades biológicas podendo então justificar o uso popular dos extratos de rizomas de *C. rotundus*.

Segundo Kamala *et al.* (2018), alguns estudos já identificaram a presença dos flavonoides (quercetina, kaempferol, catequina e miricetina), saponinas, taninos e até mesmo sesquiterpenos nos rizomas de *C. rotundus*. De fato, muitos compostos encontrados nos rizomas já são conhecidos por possuírem atividades anti-inflamatórias e são de grande demanda para uso em vários medicamentos fitoterápicos nas indústrias farmacêuticas. Por exemplo, recentemente CHEN e colaboradores (2017) relataram que a atividade anti-inflamatória da quercetina pode estar associada com a regulação negativa da via do NF- κ B, atenuando os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-17 no modelo de inflamação de pele psoriática induzida pelo imiquimod. O kaempferol, também é um flavonoide bastante investigado encontrado em *C. rotundus* e em muitas outras plantas medicinais, possui ação anti-inflamatória através da supressão direta das atividades de quinase: Src, Syk, IRAK1 e IRAK4, envolvidas na ativação de NF- κ B e AP-1 (KIM *et al.*, 2015). Esses mecanismos já poderiam explicar o efeito anti-inflamatório tópico do extrato de *C. rotundus*, no entanto, são necessários mais estudos para isolar e caracterizar constituintes químicos anti-inflamatórios presentes nos rizomas de *C. rotundus*.

Através do modelo de indução de edema de orelha é possível avaliar o processo inflamatório cutâneo, induzido por diferentes agentes: TPA, AA, Fenol, entre outros. Além de verificar a formação de edema, permite fazer análise de outros parâmetros do processo inflamatório. Primeiramente, foi realizado o modelo de dermatite irritativa onde a inflamação na pele é causada pela aplicação de TPA. Esse modelo é amplamente utilizado para avaliar e compreender a atividade inflamatória de compostos. O TPA é o principal constituinte ativo do óleo de cróton, obtido do arbusto *Croton tiglium* (Euphorbaceae). A aplicação tópica desse agente flogístico é utilizada como padrão farmacológico para doenças de pele, por estimular a liberação de vários mediadores, atuando em diversas vias inflamatórias. Seu mecanismo é por ativação direta da proteína quinase C (PKC), promovendo a ativação da via da MAPK, causando a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como NF- κ B e AP-1, que são essenciais na liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α). Além disso, ocorre também a ativação da cascata do AA, via ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), responsáveis por desencadear e manter o processo inflamatório. Como resultado, esses eventos promovem aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração de leucócitos, liberação de histamina e serotonina, além de aumentar os níveis de eicosanoides sintetizados

pelas enzimas COX e LOX (GABOR, 2000; MURAKAWA *et al.*, 2006; BADILLA *et al.*, 2007).

Sabe-se que 2 h após a aplicação tópica de TPA ocorre vasodilatação e um acentuado infiltrado celular com pico máximo de resposta após 6 h de indução, retornando aos valores basais após 48 h. O TPA promove aumento dos níveis de TNF- α com pico em torno de 5 horas e aumento gradual dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) na pele, responsável pela regulação de várias citocinas envolvidas na resposta inflamatória. De acordo com os dados obtidos neste modelo, o tratamento tópico com o extrato de *C. rotundus* foi capaz de inibir a formação de edema nas três doses testadas (0,1 mg, 0,3 e 1,0 mg/orelha). Compostos testados capazes de inibir o edema nesse modelo, provavelmente estão interagindo especificamente em uma ou mais vias moleculares descritas acima responsáveis pelo processo inflamatório induzido pelo TPA (GABOR, 2000 TUBARO *et al.*, 1986; MIYAURA *et al.*, 2003; ANDÚJAR *et al.*, 2010).

Ainda nesse modelo, foi avaliada a ação do extrato sobre a atividade da enzima MPO. A MPO é uma enzima catiônica, que contém o grupo heme, sendo o principal constituinte dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos. Por isso, é considerada como um marcador sensível de quimiotaxia e infiltração de neutrófilos onde essa migração ocorre no máximo 24 h após a aplicação do TPA tópico. O nível de atividade dessa enzima é diretamente proporcional à quantidade de neutrófilos no local inflamado (DE YOUNG *et al.*, 1989; GARRIDO *et al.*, 2004, RAYNER, LOVE e HAWKINS, 2014).

A MPO é restrita da linhagem mielóide, por isso durante a diferenciação celular da linhagem mielóide ela também pode ser expressa em menor grau por lisossomos primários de monócitos. Porém, quando os monócitos são liberados na circulação, a síntese de MPO é inibida devida a sua diferenciação em macrófagos. A função dos neutrófilos no local da inflamação é complexa, são responsáveis por liberarem diversas substâncias, entre elas, mediadores pró-inflamatórios e atuam como fagócitos, exibindo uma atividade microbicida através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e secreção de enzimas intracelulares como a MPO. Na presença de peróxido de hidrogênio e haletos (cloreto, brometo ou tiocianato), a MPO catalisa a formação de intermediários reativos de oxigênio, podendo formar ácido hipocloroso e outras porções reativas que possuem ação microbicida. É por esse mecanismo microbicida intracelular de fagócitos que a MPO contribui para a defesa

inata do organismo. Contudo, a MPO também pode ser liberada para o exterior da célula, assim como o peróxido de hidrogênio, para potencializar sua função a um alvo extracelular em situações onde o alvo não é fagocitado pelo neutrófilo devido a sua extensão. Sua toxicidade induzida aos alvos extracelulares é semelhante ao que ocorre em um fagossoma intracelular quando algum micro-organismo é fagocitado (KLEBANOFF, 2005; HANSSON *et al.*, 2006; STRZEPA *et al.*, 2017).

A aplicação tópica de TPA promoveu aumento da atividade enzimática da MPO, sendo este aumento revertido pela aplicação do extrato de *C. rotundus* nas diferentes doses. Esses resultados corroboram com a análise histológica que demonstrou que o tratamento com o extrato promoveu redução da celularidade na derme quando comparado com o grupo veículo. Assim, ao reduzir a o número de células como os neutrófilos, o extrato provavelmente está impedindo a amplificação para um processo inflamatório crônico, pois estas células participam da manutenção da resposta inflamatória pelo crosstalk com outras células (infiltrantes e residentes) do tecido através da liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, enzimas proteolíticas e ROS. (TERUI, OZAWA, TAGAMI, 2000).

O TPA estimula várias vias inflamatórias decorrentes da ativação da PKC, e por isso vários compostos anti-inflamatórios com mecanismos de ação distintos respondem a esse modelo. Uma das vias relacionadas é a dos eicosanoides via fosfolipase A₂ (PLA₂) (MURAKAWA *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2015). Portanto, foi de interesse verificar se o efeito anti-inflamatório do extrato de *C. rotundus* poderia estar envolvendo a via do AA. Esse ácido graxo poli-insaturado presente na camada fosfolipídica das membranas celulares é clivado pela enzima PLA₂. Então, o AA livre pode ser metabolizado pela enzima 5-LOX levando à formação de leucotrienos (LT), e pela enzima COX-2 levando a formação de prostaglandinas. Estas irão mediar os eventos iniciais da inflamação, como alterações na permeabilidade vascular e vasodilatação. O LTB₄ gerado induz a migração e fixação de neutrófilos polimorfonucleares no endotélio vascular. A aplicação de AA induz uma rápida dilatação vascular, eritema, edema e infiltração leucocitária (FERREIRA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2017). Neste modelo, foi observado que apenas a dose de 0,3 mg/orelha inibiu a formação do edema de orelha induzida pela aplicação tópica de AA. Esse resultado sugere que parte do efeito anti-inflamatório do extrato é por interferência na via do AA. Sendo assim, alguns compostos bioativos do extrato

podem estar interagindo sinergicamente por outras vias na cascata inflamatória, inibindo a formação do edema.

Dando sequência, foi selecionada a dose intermediária do extrato de *C. rotundus* (dose 0,3 mg/orelha- dose mais efetiva nos modelos testados anteriormente) para avaliar se o extrato também poderia ter uma atividade anti-inflamatória no modelo crônico de inflamação de pele, uma vez que esse modelo é relevante para avaliar atividade anti-inflamatória de compostos, frente a uma lesão inflamatória estabelecida, mimetizando o que se assemelha na terapia clínica dermatológica, onde o tratamento é iniciado após o processo inflamatório estabelecido (STANLEY *et al.*, 1991).

O tratamento tópico com extrato foi capaz de interferir de modo significativo frente ao processo inflamatório já estabelecido. Sobre o edema avaliado diariamente, os dados mostram que o efeito inibitório do extrato da *C. rotundus* foi visível no sétimo dia do protocolo experimental (ou seja, no 2º. dia de tratamento) e se estendeu até o último dia. O tratamento com o extrato também foi capaz de reduzir a atividade da MPO, porém não alterou a atividade do NAG. A NAG é uma enzima lisossomal presente em altos níveis em macrófagos ativadas, por isso é considerada marcador indireto da presença de células mononucleares no tecido inflamado (BAILEY, 1988). Assim, a diminuição do número total de células quantificadas pela análise histológica é provavelmente devida à interferência do extrato nos neutrófilos em outras células, mas não nas células mononucleares.

A múltipla aplicação tópica de TPA origina uma reação inflamatória prolongada que mimetiza um processo psoriático, que consiste em infiltrado de células inflamatórias (caracterizado principalmente por macrófagos e células T) e pela hiperproliferação de queratinócitos (representados pelo aumento da espessura da epiderme). Sabe-se que um dos mecanismos que promove a proliferação de queratinócitos é a presença aumentada de citocinas (principalmente a IL-6, IL-1 e TNF- α) e a presença de células T (CARRENHO *et al.*, 2015; STANLEY *et al.*, 1991). A aplicação do extrato foi eficaz promovendo uma redução na espessura da epiderme, o que poderia indicar que o extrato pode estar interferindo na proliferação celular. Para investigar esse parâmetro, foi realizado a análise imuno-histoquímica para expressão da proteína PCNA. O PCNA é um cofator da DNA polimerase no processo de replicação do DNA de células eucarióticas. É uma proteína nuclear correlacionada com o estado proliferativo da célula. Como tal, a imunolocalização de PCNA pode ser

utilizada como um indicador de proliferação celular e a sua expressão é indicativo de proliferação celular ativa (ARISAWA *et al.*, 2010). Foi observado uma inibição significativa da proliferação de queratinócitos na epiderme resultante de menor quantidade de células positivas para PCNA no grupo que recebeu o tratamento com o extrato de *C. rotundus* quando comparado com o grupo controle TPA. Terui (2000) relatou que as células T ativadas influenciam o desencadeamento e a manutenção das lesões psoriáticas, estimulando a proliferação epidérmica e a migração de neutrófilos que são quimioatrativos e se acumulam nas áreas inflamadas dessas lesões. Estes neutrófilos infiltrados promovem a proliferação e diferenciação dos queratinócitos epidérmicos através da produção de uma grande quantidade de citocinas (incluindo IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, IL-12 e IL-10) produzidas por essas células imunes. Como o extrato de *C. rotundus* promoveu interferência na migração de neutrófilos, é possível que seja por esse mecanismo que interferiu na hiperproliferação de queratinócitos. Entretanto, não se exclui uma possível ação direta do extrato sobre a proliferação de queratinócitos, que, além da atividade anti-inflamatória, pode apresentar atividade antiproliferativa. Na verdade, de qualquer forma, esses resultados tornam o *C. rotundus* uma futura opção para o tratamento de condições inflamatórias crônicas da pele, como a psoríase de casos leves a moderados, onde a terapia tópica é o tratamento de primeira escolha (AFIFI *et al.*, 2005)

Não obstante, a atividade antiproliferativa dos rizomas de *C. rotundus* já foi relatada na literatura. WANG *et al.* (2019) investigaram o efeito do extrato do rizoma de *C. rotundus* na proliferação celular em células de câncer de mama triplo-negativo (TNBC-*Triple-negative breast cancer*), onde os efeitos antiproliferativos induzidos pelo extrato estavam relacionados com a interrupção do ciclo celular na fase G₀/G₁, impedindo que o ciclo celular prosseguisse para a fase de divisão celular (fase M). Sendo assim, esse mecanismo pode estar relacionado com a atividade antiproliferativa sobre os queratinócitos observado no presente estudo.

De forma complementar, foi avaliado o efeito do tratamento com o extrato sobre a diferenciação anormal dos queratinócitos através da marcação por imunohistoquímica da K14 no modelo da múltipla aplicação de TPA. As queratinas são proteínas que fazem parte dos filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto das células. Diversas citoqueratinas são expressas pelas queratinócitos durante a proliferação e diferenciação, permitindo distinguir em qual camada (estrato) essas células se encontram. Os queratinócitos basais da epiderme, que estão em

estado proliferativo, expressam as citoqueratinas K5 e K14. Assim que eles migram para a próxima camada da epiderme, eles perdem a atividade mitótica, passando a expressar um novo conjunto de queratinas específicas de diferenciação, ou seja, à medida que o queratinócito se diferencia, ele muda a expressão das queratinas. Nesse estudo, foi possível observar que o TPA promoveu aumento de número de células positivas K14 na camada basal da epiderme (devido a hiperproliferação dos queratinócitos), assim como nas outras camadas, sugerindo uma diferenciação anormal dos mesmos. Já a pele tratada com o extrato tem marcação positiva para a K14 apenas na camada basal. A expressão da K14 está localizada nas células epidérmicas em proliferação no estrato basal, e é tipicamente ausente em queratinócitos em diferenciação. Isto sugere, que o tratamento com o extrato de *C. rotundus* promoveu o restabelecimento da diferenciação epidérmica para mais próxima da pele saudável, devido a redução do número de queratinócitos indiferenciados e em estágios proliferativos (FUCHS, 1993; BRAGULLA e HOMBERGER, 2009). Sendo assim, o tratamento com o extrato de *C. rotundus* poderia melhorar esses parâmetros característicos da psoríase como a hiperproliferação e alteração da diferenciação terminal nos queratinócitos (PERERA *et al.*, 2012).

Os glicocorticoides como a dexametasona são conhecidos por regularem diversas funções celulares, incluindo desenvolvimento, homeostase, metabolismo e inflamação. Devido a sua ação anti-inflamatória, antiproliferativa e imunomoduladora, são os medicamentos mais prescritos no mundo, por serem usados na clínica para o tratamento de várias doenças inflamatórias de pele. Os efeitos terapêuticos dos corticoides estão relacionados a sua ligação com seu receptor de glicocorticoide (GR) o qual encontra-se expresso na maioria dos tipos de células e tecidos em todo o corpo. Assim, devido seu receptor estar expresso em diversos tipos de células e tecidos, vários estudos tem relatado efeitos adversos locais e sistêmicos. A terapia com essa classe de medicamentos é limitada devido aos efeitos adversos associados a altas doses, seu uso a longo prazo e uma pequena parcela dos pacientes não respondem ao tratamento com glicocorticoides tópicos, mesmo em altas doses. Devido a numerosos efeitos colaterais locais e sistêmicos relatados no tratamento de distúrbios dérmicos inflamatórios resultantes da terapia atual, a busca por terapias menos agressivas e eficazes têm motivado o uso de plantas medicinais para fins terapêuticos e pelos princípios ativos presentes nessas plantas (SCHÄCKE,

DÖCKE, ASADULLAH, 2002; COONDOO et al., 2014 RAMAMOORTHY e CIDLOWSKI, 2016).

Os efeitos terapêuticos anti-inflamatórios e imunossupressores dos glicocorticoides são decorrentes da sua ligação com o GR, presente no citoplasma celular de várias células. Na presença dos glicocorticoides, o receptor sofre mudanças conformacionais e o complexo glicocorticoide-GR é translocado para o núcleo por um processo que envolve proteínas presentes na membrana celular. No núcleo promove transcrição gênica regulando positiva ou negativamente a expressão dos genes alvos. A transcrição gênica pode ser regulada por dois mecanismos: a) transrepressão gênica: é a interação do GR com as subunidades de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, essa interação promove efeito inibitório de suas funções, reprimindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-2, TNF- α e moléculas de adesão; b) transativação gênica: facilita a transcrição de genes codificantes de proteínas anti-inflamatórias como a expressão de anexina I (também denominada lipocortina-1), proteína anti-inflamatória que inibe a PLA₂ citosólica, bloqueando a liberação de AA e a sua subsequente conversão em eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos; e da MAPK fosfatase 1, a qual bloqueia a fosforilação da cascata das MAPKs quinases, impedindo a expressão de proteínas inflamatórias (BOSSCHER, BERGHE, HAEGEMAN, 2003; RHEN e CIDLOWSKI, 2005).

Pelo fato de *C. rotundus* exercer um efeito anti-inflamatório expressivo, buscou-se compreender se a ação estaria associada à ativação de GR através do pré-tratamento com o antagonista desse receptor, mifepristona. A mifepristona é um antagonista dos GR não seletivo e de alta afinidade. Ela se liga ao GR com uma afinidade de quatro vezes maior que a dexametasona e cerca de dez vezes maior que o cortisol. É utilizada na terapia clínica de pacientes com síndrome de Cushing, onde o objetivo do tratamento é controlar o excesso de cortisol (BERTAGNA et al., 1984; JOHANSEN e ALLOLIO, 2007). Com a administração de mifepristona no modelo utilizado, o efeito anti-inflamatório dos tratamentos não pode ocorrer via GR. Neste estudo, observou-se que, o pré-tratamento com a mifepristona não foi capaz de reverter o efeito anti-inflamatório sobre a formação do edema de orelha no grupo tratado com o extrato de *C. rotundus*. Já o tratamento com a dexametasona, como se trata de um corticoide, teve o efeito anti-inflamatório completamente revertido pelo pré-tratamento com mifepristona. Resultados esses, confirmados pela análise enzimática MPO, onde o pré-tratamento com a mifepristona não inibiu o efeito do extrato na

redução de neutrófilos no local da inflamação. Esses resultados propõem que o efeito anti-inflamatório de *C. rotundus* não envolve o mecanismo de receptor glicocorticoide (GR).

Uma vez comprovado o efeito anti-inflamatório do extrato, tornou-se interessante investigar se o extrato poderia promover uma possível toxicidade relacionada ao seu tratamento. As múltiplas administrações de *C. rotundus* não promoveram atrofia cutânea e mostraram não interferir no peso dos animais e órgãos linfoides. No entanto, como esperado, por ser um dos efeitos colaterais mais frequentes da terapia com corticosteroides tópicos de longa duração, o tratamento tópico com o corticoide dexametasona promoveu atrofia cutânea. Este efeito dos corticoides é ocasionado por causa da sua ação supressora sobre a atividade proliferativa dos queratinócitos e a diminuição da síntese proteica e atividade proliferativa dos fibroblastos dérmicos. As alterações dérmicas são ocasionadas principalmente sobre o turnover de colágeno, um dos principais componentes da MEC e a regulação de outras proteínas como a elastina, bem como produção de ácido hialurônico, tornando a pele do paciente mais fina e frágil (RUSSELL *et al.*, 1995; PÉREZ, *et al.*, 2001).

Alterações nos órgãos linfoides, como baço e timo, também ocorreram com a aplicação tópica da dexametasona. Esses efeitos ocorrem devido ao seu efeito imunossupressor que leva à atrofia dos órgãos linfoides, modulando o desenvolvimento e a função de várias células do sistema imune. Os glicocorticoides atenuam a resposta imune inata inibindo a ativação e a diferenciação das APCs, reduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a imunidade adaptativa também é afetada porque o tratamento com glicocorticoide torna os linfócitos T imaturos, os linfócitos T maduros tornam-se mais suscetíveis a apoptose e diminuição da quantidade de linfócitos B também é observada, embora não na mesma extensão que as células T. Devido a essa modulação no desenvolvimento e função das células do sistema imune os pacientes ficam predispostos a infecções oportunistas (CAIN e CIDLOWSKI, 2017).

Portanto, nossos resultados destacam outra vantagem do uso tópico de *C. rotundus* para doenças inflamatórias de pele, por ter demonstrado uma atividade anti-inflamatória significativa, proporcionando menor incidência de efeitos indesejáveis, pelo menos por um curto período, comparado ao tratamento com a dexametasona.

Desse modo, o presente trabalho exhibe pela primeira vez a eficácia do extrato de rizomas de *C. rotundus* quando aplicado topicamente para tratamento de doenças de pele. É importante salientar que *C. rotundus* é considerada uma erva daninha invasora na agricultura, economicamente prejudicial para a produção agrícola, com diversos produtos no mercado objetivando sua erradicação, mas que por outro lado, apresenta grande potencial como anti-inflamatório. Sendo assim, o extrato de *C. rotundus* pode ser uma nova ferramenta terapêutica para tratamento das desordens da pele.

Tendo em vista todos os pontos levantados neste trabalho, mais estudos são necessários para isolar e caracterizar os constituintes químicos responsáveis pela atividade anti-inflamatória dos rizomas de *C. rotundus*, visto que poucas pesquisas foram realizadas até agora para identificar possíveis metabólitos secundários. Avaliações adicionais são indispensáveis para esclarecer todo o mecanismo de ação do extrato.

6 CONCLUSÃO

O tratamento tópico com o extrato dos rizomas de *C. rotundus* apresentou atividade anti-inflamatória nos modelos de inflamação cutânea testados nesse trabalho. Tanto nos modelos agudos com AA e TPA, quanto no modelo com múltiplas aplicações de TPA, mostrou-se capaz de reduzir o edema e o infiltrado celular. O extrato de *C. rotundus* também apresentou uma atividade antiproliferativa e promoveu o reestabelecimento da diferenciação celular através da redução da expressão de PCNA e K14, tornando o extrato de *C. rotundus* uma opção interessante para o tratamento de condições inflamatórias crônicas hiperproliferativas da pele, como a psoríase.

Os resultados farmacológicos sugerem que o uso tópico do extrato não induz efeitos indesejados como os efeitos promovidos pelos glicocorticoides. Porém, estudos adicionais são necessários para a confirmação do mecanismo de ação e segurança de seu uso.

Assim, nossos resultados mostram que os extrato de *C. rotundus* podem ser uma ferramenta terapêutica atraente, de fácil cultivo e aquisição, para o tratamento de doenças inflamatórias da pele.

REFERÊNCIAS

AFIFI, T.; GANNES, G. DE; HUANG, C.; et al. Topical therapies for psoriasis: evidence-based review. **Canadian Family Physician**, v. 51, n. 4, p. 519–525, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRAZIL); FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Farmacopeia brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, 2013.

ANDÚJAR, I.; RECIO, M.; BACELLI, T.; et al. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with I κ B α degradation thus inhibiting translocation of NF- κ B to the nucleus. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 376–388, 2010.

ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; ROCHA, R. F. DA; et al. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67 breve revisão. **Brazilian Dental Science**, v. 2, n. 1, 2010.

BADILLA, B.; CAMBRONERO, J.; CICCIO, J. F.; et al. Determination of topical anti-inflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, p. 139, 2007.

BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, Bullous Skin Diseases: Part I., v. 29, n. 4, p. 360–376, 2011.

BARONI, A.; BUOMMINO, E.; DE GREGORIO, V.; et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, 2012.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**, v. 162, p. 327–334, 1988.

BERTAGNA, X.; BERTAGNA, C.; LUTON, J.-P.; et al. The New Steroid Analog RU 486 Inhibits Glucocorticoid Action in Man. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 59, n. 1, p. 25–28, 1984.

BESSA, N. G. F. DE; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4 suppl 1, p. 692–707, 2013.

BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; et al. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 10, p. 472–479, 1999.

BIRADAR, S.; KANGRALKAR, V.A.; MANDAVKAR, Y.; et al. Anti-inflammatory, anti-arthritic, analgesic and anticonvulsant activity of Cyperus essential oils. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 2, p. 112–115, .2010

BLANCO, F. M. G. Invasoras. Caderno Técnico. Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, n. 90, p. 2-7, 2006.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 1–36, 2003.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.

BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 4, p. 516–559, 2009.

BROWN, T. M.; KRISHNAMURTHY, K. Histology, Dermis. **StatPearls**, 2019. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

BRYSON, C. T., CARTER, R. The significance of Cyperaceae as Weeds. In: Naczi, R. F. & Ford, B. A. (Eds). *Sedges: uses, diversity and systematics of the Cyperaceae*. Saint Louis, **Missouri Botanical Gardens Press**, p. 15-101, 2008.

BRYSON, C.T.; DE FELICE, M.S. 2009. *Weeds of the South*. University of Georgia Press, Athens, GA. Can Baser, K.H., 2008. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 29, p. 3106-3119, 2009.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews. Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017.

CARRENHO, L. Z. B.; MOREIRA, C. G.; VANDRESEN, C. C.; et al. Investigation of anti-inflammatory and anti-proliferative activities promoted by photoactivated cationic porphyrin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 444–458, 2015.

CATUNDA, M. G.; FREITAS, P.; SOUZA, C. L. M.; et al. Influência do extrato aquoso de *Cyperus rotundus* na germinação de sementes e na divisão celular do meristema radicular de alface. In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 22., Foz do Iguaçu. Resumos, p.78, 2000.

CHEN, H.; LU, C.; LIU, H.; et al. Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF-κB pathway. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 110–117, 2017.

CHITHRAN, A.; RAMESH BABU, T; HIMAJA, N. Comparative study on anti-inflammatory activity of *Cyperus rotundus* (L.) using different solvent system in carragenan induced paw edema in albino wistar rats. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 3, p. 130–134, 2012.

COONDOO, A.; PHISKE, M.; VERMA, S.; et al. Side-effects of topical steroids: A long overdue revisit. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 5, n. 4, p. 416–425, 2014.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; et al. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical antiinflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

DAINICHI, T.; KITOH, A.; OTSUKA, A.; et al. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. **Nature Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1286–1298, 2018.

DAS, P. K.; MISRA, M. K. Some ethnomedicinal plants of koraput district orissa. **Ancient Science of Life**, v. 8, n. 1, p. 60–67, 1988.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 4, p. 488-522, 2003.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W.; et al. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science**, v. 230, n. 4723, p. 330–332, 1985.

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

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.

DI MEGLIO, P.; PERERA, G. K.; NESTLE, F. O. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 857–869, 2011.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA G.M.; SARTORATTO A.; et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M.; TIMOSSI, P. C. **Estádios de desenvolvimento e vias de contato e absorção dos herbicidas na inviabilização de tubérculos de *Cyperus rotundus***. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 23, n.4, p. 621-626, 2005.

FENNER, J.; SILVERBERG, N. B. Skin diseases associated with atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**, Atopic Dermatitis: Part II., v. 36, n. 5, p. 631–640, 2018.

FERREIRA, F. S.; BRITO, S. V.; SARAIVA, R. A.; et al. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 514–520, 2010.

FUCHS, E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. **Journal of Cell Science. Supplement**, v. 17, p. 197–208, 1993.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 3, p. 199–209, 2002.

GABOR, M. *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*. Budapest: Akadémiai Kiadó. 24-37, 2000.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 143–149, 2004.

GILROY, D.; DE MAEYER, R. New insights into the resolution of inflammation. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 161–168, 2015.

GORDON, J. S.; WOLANIN, P.M.; GONZALEZ, A.V.; et al. Topical N-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine Inhibits Mouse Skin Inflammation, and Unlike Dexamethasone, its Effects Are Restricted to the Application Site. **Journal of Investigative Dermatology**. V, 128, p. 643, 2008.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p. 214–224, 2006.

HOU, D.-D.; ZHANG, W.; GAO, Y.-L.; et al. Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis. **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105676, 2019.

HWA, C.; BAUER, E. A.; COHEN, D. E. Skin biology. **Dermatologic Therapy**, v. 24, n. 5, p. 464–470, 2011.

IMAM, H.; ZARNIGAR, SOFI, G.; SEIKH, A.; LONE, A. The incredible benefits of Nagarmotha (*Cyperus rotundus*). **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v. 4, n. 1, p. 23, 2014.

JOLY, A. B. **Introdução a taxonomia vegetal**. 2 ed. São Paulo: EDUSP, 1975. 777p.

JOHANSEN, S.; ALLOLIO, B. Mifepristone (RU 486) in Cushing's syndrome. **European Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 561–569, 2007.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The Role of Neutrophils and Monocytes in Innate Immunity. **Trends in Innate Immunity**, v. 15, p. 118–146, 2008.

KAMALA, A.; MIDDHA, S.K.; SINDHURA, S.K.; et al. In-vitro antioxidante potentials of *Cyperus rotundus* Linn rhizome extracts and their phyrochemical analysis. **Pharmacognosy Magazine**. V, 14, p. 261- 267, 2018.

KASALA, S.; RAMANJANEYULU, K.; HIMABINDHU, J.; et al. Prelimiinary phytochemical screening and in vitro anthelmintic activity of *Cyperus rotundus* (L). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v, 5, p. 407-409, 2016.

KHALIDA, A. S.; SIDDIQUI, S. Weeds of Pakistan: Cyperaceae. **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, v. 20, p. 233-263, 2014.

KIM, S. H.; PARK, J. G.; LEE, J.; et al. The dietary flavonoid Kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 904142, 2015.

KIM, J.; KRUEGER, J. G. The Immunopathogenesis of Psoriasis. **Dermatologic Clinics**, Psoriasis: Advances in Knowledge and Care., v. 33, n. 1, p. 13–23, 2015.

KISSMANN, K.G. Plantas infestantes e nocivas. tomo I 2. ed. São Paulo. Basf p.222-229, 1997.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, 2005.

KOSTNER, L.; ANZENGRUBER, F.; GUILLOD, C.; et al. Allergic Contact Dermatitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, Allergic Skin Diseases., v. 37, n. 1, p. 141–152, 2017.

KRISHNAMOORTHY, S.; HONN, K. V. Inflammation and disease progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 481–491, 2006.

KRUEGER, G. G.; STINGL, G. Immunology/Inflammation of the Skin—A 50-Year Perspective. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 4, Supplement, p. S32–S53, 1989

KUMAR, S. V. S.; MISHRA, S. H. Hepatoprotective Activity of Rhizomes Of *Cyperus Rotundus* Linn Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 1, p. 84, 2005.

KUMAR, M.; RANI, M.; MEHER, B. Review on Pharmacology and Phytochemistry of *Cyperus rotundus* L. **Current Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 11-15, 2017.

KUMAR, S.; TIWARI, R., ALAM, N. Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Cyperus rotundus* rhizome on carrageenan induced paw edema in rats. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 3, p. 5097-5100, 2012.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787–795, 2002.

LEE, H. N.; SHIN, S. A.; CHOO, G. S.; et al. Anti-inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages and DNCB-induced atopic dermatitis animal models. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 2, p. 888–898, 2018.

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9352, p. 151–160, 2003.

LINDEN, K. G.; WEINSTEIN, G. D. Psoriasis: current perspectives with an emphasis on treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 107, n. 6, p. 595–605, 1999.

LIU, Y.; KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. M. Psoriasis: genetic associations and immune system changes. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 640p.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, Facial Reconstruction Post-Mohs Surgery., v. 25, n. 3, p. 283–289, 2017.

MANOSROI, A.; JANTRAWUT, P.; OGIHARA, E.; et al. Biological activities of phenolic compounds and triterpenoids from the galls of *Terminalia chebula*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1448–1463, 2013.

MARTINI, G.; DURIGAN, J. C. Influência do teor de água na superfície do solo sobre a eficácia e seletividade do flazasulfuron, na cultura de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 259-267, 2004.

MAYBA, J. N.; GOODERHAM, M. J. Review of Atopic Dermatitis and Topical Therapies. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 21, n. 3, p. 227–236, 2017a.

MELLO, S. C. N. de; TEIXEIRA, E. A.; NETO, C. R. B. Fungos e seus metabólitos no controle da tiririca. Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 2003. 55p.

MEENA, A. K.; YADAV, A. K.; NIRANJAN, U. S.; et al. Review on *Cyperus rotundus* – A potential herb. **Journal of Pharmaceutical Clinical Research**, v. 2, p. 20-22, 2010.

MILAM, E. C.; JACOB, S. E.; COHEN, D. E. Contact Dermatitis in the Patient with Atopic Dermatitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 7, n. 1, p. 18–26, 2019.

MIYAURA, C.; INADA, M.; MATSUMOTO, C.; et al. An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 10, p. 1303–1310, 2003.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; et al. 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.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 122, n. 3, p. 263–269, 2019.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 2002.

NAVARRO, P.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; et al. In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. **Life Sciences**, v. 68, n. 10, p. 1199–1206, 2001.

NEESER, C.; AGUERO, R.; SWANTON, C. J. Survival and dormancy of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) tubers. **Weed Science**, v. 45, n. 6, p. 784–790, 1997.

NIMA, Z. ABDUL-MAJID; JABIER, M. S.; WAGI, R. I.; et al. Extraction, Identification and Antibacterial activity of *Cyperus* oil from Iraqi *C. rotundus*. **Engineering and Technology Journal**, v. 26, n. 10, p. 1156–1163, 2008.

NOVAK-BILIĆ, G.; VUČIĆ, M.; JAPUNDŽIĆ, I.; et al. Irritant and allergic contact dermatitis – skin lesion characteristics. **Acta Clinica Croatica**, v. 57, n. 4, p. 713–720, 2018.

NWAEHUJOR, C. O.; EZEJA, M. I.; UDEH, N. E.; et al. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Mallotus oppositifolius* (Geisel) methanol leaf extracts. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 805–810, 2014.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 289–301, 2014.

PASTRE, V. **Controle de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) com aplicação de sulfentrazone e flazasulfuron aplicados isoladamente e em mistura na cultura da cana-de-açúcar**. 2006, 66f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) IAC – Instituto Agrônomo, Campinas, São Paulo, 2006.

PEERZADA, A. M. Biology, agricultural impact, and management of *Cyperus rotundus* L.: the world's most tenacious weed. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 12, p. 270, 2017.

PEERZADA, A. M.; ALI, H. H.; NAEEM, M.; et al. *Cyperus rotundus* L.: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 540–560, 2015.

PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 385–422, 2012.

PÉREZ, P.; PAGE, A.; BRAVO, A.; et al. Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 11, p. 2030–2032, 2001.

PINTO, N. DE C. C.; MACHADO, D. C.; DA SILVA, J. M.; et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015.

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

PURATCHIKODY, A.; DEVI, C. N.; NAGALAKSHMI, G. Wound healing activity of cyperus rotundus linn. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 1, p. 97, 2006.

QASIM, M.; ABIDEEN, Z.; ADNAN, M.Y.; et al. Traditional ethnobotanical uses of medicinal plants from coastal areas. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 2, n.1, 22-30, 2014.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 42, n. 1, p. 15–31, 2016.

RAYNER, B. S.; LOVE, D. T.; HAWKINS, C. L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 240–255, 2014.

RENERT-YUVAL, Y.; GUTTMAN-YASSKY, E. What's New in Atopic Dermatitis. **Dermatologic Clinics**, Therapeutic Hotline: New Developments in Dermatology., v. 37, n. 2, p. 205–213, 2019.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

RICCI, M. S. F.; ALMEIDA, D. L.; FERNANDES, M. C. A.; et al. **Efeitos da solarização do solo na densidade populacional 48 da tiririca e na produtividade de hortaliças sob manejo orgânico**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 35, n.11, p. 2175-2179, 2000.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The Biology of Chemokines and their Receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 217–242, 2000.

RUNDLE, C. W.; BERGMAN, D.; GOLDENBERG, A.; et. Contact dermatitis considerations in atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v. 35, n. 4, p. 367–374, 2017.

RUSSELL, S. B.; TRUPIN, J. S.; KENNEDY, R. Z.; et al. M. Glucocorticoid Regulation of Elastin Synthesis in Human Fibroblasts: Down-Regulation in Fibroblasts from Normal Dermis But Not From Keloids. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, n. 2, p. 241–245, 1995.

SANTOS, C. M. M.; RIBEIRO, D.; SILVA, A. M. S.; et al. Diarylxanthenes as Potential Inhibitors of Arachidonic Acid Metabolic Pathways. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 956–964, 2017.

SANTOS, A. L. M. dos. **Estudo químico e biológico de *Cyperus rotundus* L. aclimatada no Amazonas**. 2014. 157 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SAMARIYA, K.; SARIN, R. Isolation and identification of flavonoids from *Cyperus rotundus* linn. In vivo and in vitro. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, n. 2, 2013.

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

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. **Current Opinion in Pharmacology, Cancer • Immunomodulation.**, v. 13, n. 4, p. 632-640, 2013.

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. 349-361, 2008.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5922-5943, 2011.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SEO, W. G.; PAE, H. O.; OH, G. S.; et al. Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 59-64, 2001.

SHARMA, S.K.; SINGH, A.P. **Antimicrobial investigations on rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn.** *Der Pharmacia Lettre*, v. 3, p. 427-431, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Florianópolis. Editora da UFSC, 2007. 1102p.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 6, p. 672-686, 1994.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2–3, p. 219–243, 2004.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology: The Official Journal of the Skin Pharmacology Society**, v. 4, n. 4, p. 262–271, 1991.

STERN, R. S.; NIJSTEN, T.; FELDMAN, S. R.; et al. Psoriasis Is Common, Carries a Substantial Burden Even When Not Extensive, and Is Associated with Widespread Treatment Dissatisfaction. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 2, p. 136–139, 2004.

STRZEPA, A.; PRITCHARD, K. A.; DITTEL, B. N. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. **Cellular Immunology**, v. 317, p. 1–8, 2017.

TERUI, T. Inflammatory and immune reactions associated with stratum corneum and neutrophils in sterile pustular dermatoses. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 4, p. 239–248, 2000.

TERUI, T.; OZAWA, M.; TAGAMI, H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2000.

THOMAS, D.; GOVINDHAN, S.; BAIJU, E. C.; et al. *Cyperus rotundus* L. prevents non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric mucosal damage by inhibiting oxidative stress. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 5, p. 485–490, 2015.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; et al. The croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, n. 3–4, p. 347–349, 1986.

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

UMERIE, S. C.; EZEUZO, H. O. Physicochemical characterization and utilization of *Cyperus rotundus* starch. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 193-196, 2000.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 342–350, 2001.

WANG, F.; SONG, X.; MA, S.; et al. The treatment role of *Cyperus rotundus* L. to triple-negative breast cancer cells. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 6, p. BSR20190502, 2019.

WEIDINGER, S.; BECK, L. A.; BIEBER, T.; et al. Atopic dermatitis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1, 2018.

WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. *Inflammation Protocols*, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.

WOLF, K.; MÜLLER, R.; BORGMANN, S.; et al. Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3262–3269, 2003.

ZHOU, M.; HUANG, L.; LI, L.; et al. New furostanol saponins with anti-inflammatory and cytotoxic activities from the rhizomes of *Smilax davidiana*. **Steroids**, v. 127, p. 62–68, 2017.