

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IVONE LEILA LIMA DELGADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DE DERIVADOS FUROXÂNICOS E BENZOFUROXÂNICOS COMO
ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA ACNE VULGAR**

ARARAQUARA
2017

IVONE LEILA LIMA DELGADO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO
DE DERIVADOS FUROXÂNICOS E BENZOFUROXÂNICOS COMO
ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA ACNE VULGAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Delgado, Ivone Leila Lima

D352a Avaliação do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos como alternativa para o tratamento da acne vulgar / Ivone Leila Lima Delgado. – Araraquara, 2017.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. *Propionibacterium acnes*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Concentração Inibitória Mínima. 4. Furoxanos. 5. Benzofuroxanos. 6. Acne vulgar. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

IVONE LEILA LIMA DELGADO

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADOS
FUROXÂNICOS E BENZOFUROXÂNICOS COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA
ACNE VULGAR

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Mestra em
Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 23 de maio de 2017.

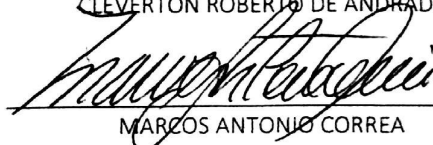
BANCA EXAMINADORA



JEAN LEANDRO DOS SANTOS



CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE



MARCOS ANTONIO CORREA

Este trabalho contou com a colaboração dos seguintes professores da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP:

Prof.^aDr. Hérica Regina Nunes Salgado

Prof.^a Dr. Ana Marisa Fusco Almeida

Prof.^aDr. Iracilda Zeppone Carlos

Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

"A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

*Dedico este trabalho aos meus pais,
irmãos e a todos os familiares e amigos
pelo apoio e incentivo durante estes dois anos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu forças todas às horas, principalmente nas de desalento para lutar por mais este objetivo. Aos meus pais, Maria e João, por sempre me terem apoiado em todas as circunstâncias, aos meus irmãos pelo apoio e incentivo de sempre, vocês são muito especiais.

À todos os familiares e amigos que mesmo longe se fizeram presente.

Ao meu orientador professor Jean Leandro dos Santos, por me ter orientado numa área de conhecimento diferente e muito importante para a minha formação.

À professora Hérica Regina Nunes Salgado, por me ter guiado na realização de parte deste trabalho e por me permitir fazer parte do laboratório onde foi possível realizar parte desta dissertação.

À professora Ana Marisa Fusco de Almeida, à professora Iracilda Zepponi Carlos, ao professor Marcos Antônio Corrêa e ao professor Cleverton Roberto de Andrade pela contribuição na realização de parte dos procedimentos nos seus laboratórios.

Aos companheiros do laboratório de controle microbiológico de medicamentos, Tahisa, Felipe, Lívia, Bianca, Mariana, Carol, Eliane, Danilo e Ketylin pelos ensinamentos, ajuda, companheirismo, preocupação e amizade. Em especial ao Felipe sempre disposto a ajudar, apresentando sempre uma solução para os problemas, pela amizade, meu muito obrigado.

À Fátima Rodrigues Moreti, sempre prestativa, agradeço por tudo.

Agradeço também à Karina, à Marisa e ao Cauê pela ajuda e apoio em parte deste trabalho, agradeço ainda ao Guilherme, à Aline, Aylime e à Priscila pelo apoio e pelas substâncias cedidas para realização deste trabalho.

À Fernanda, Wanessa e a Mônica pelo apoio e ajuda.

Agradeço a todas as pessoas que conheci nos diferentes laboratórios por onde passei e que puderem me ensinar sempre algo, em especial a Luciani, ao Lucas e à Ana Carolina. À Natália Costa, pela amizade que se estende até hoje, pela amizade, suporte, e apoio de sempre, meu muito obrigado. Ainda, as minhas amigas Marina, Amanda, Sueli e Bruna que sempre estão disponíveis e que quando preciso posso contar. Ao Alexandre Pazoti e à Ana Cristina agradeço por tudo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À todos que de uma forma ou de outra foram extremamente importantes na realização deste trabalho e que contribuíram para que este pudesse dar frutos, pelo incentivo e apoio. Deixo aqui meus agradecimentos a todos. Muito Obrigada!

RESUMO

A acne é uma doença autolimitada de componente multifatorial, caracterizada pela presença de inflamação e colonização bacteriana pelo microrganismo *Propionibacterium acnes*. Atualmente, o tratamento tópico e/ou oral, inclui fármacos com propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e queratolíticas. Apesar dos efeitos benéficos no tratamento da acne, a terapia atual apresenta limitações que justificam a busca de novos fármacos. Furoxanos e benzofuroxanos são compostos heterocíclicos contendo a função *N*-óxido e que apresentam uma grande diversidade de propriedades farmacológicas, incluindo antimicrobiana. Neste trabalho investigou-se o efeito antimicrobiano de compostos furoxanos e benzofuroxanos pertencentes à biblioteca de moléculas do laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Para fins de caracterização do espectro de ação, além do *P. acnes* foi realizado *screening* do perfil de atividade antimicrobiana frente às cepas fúngicas, bactérias Gram positivas e Gram negativas usando as técnicas de microdiluição. Os furoxanos e benzofuroxanos foram testados em concentrações que variaram de 0.03 a 100 µg/mL. Foram usados controles como a cefazolina (0.39 µg/mL) para *P. acnes*, o imipenen (<0.39 µg/mL) para as bactérias Gram positivas, aztreonam (<0.39 µg/mL) para as Gram-negativas, anfotericinaB (0.25 µg/mL) e o fluconazol (65 µg/mL) para as espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, respectivamente. Após incubação, foram realizadas leituras visuais sem e com revelador resazurina (0.01%) para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Dos 20 compostos avaliados, 14 foram capazes de inibir o crescimento de, pelo menos, um microrganismo. O composto (*E*)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol-2-óxido (composto 15) se mostrou o mais ativo contra *P. acnes* apresentando CIM de 0.19 µg/mL. Estudos *in vitro* demonstraram para este composto capacidade de liberação de óxido nítrico, sendo este aumento de estresse oxidativo um dos possíveis mecanismos de ação. Esta molécula também foi capaz de inibir a produção do NO em macrófagos na concentração de 0.78 µg/mL. A avaliação *in vitro* da citotoxicidade em macrófagos e atividade anti-inflamatória por determinação quantitativa de IL1-β e a TNF-α foram realizadas. Determinou-se para o composto mais ativo contra *P. acnes* que a viabilidade em macrófagos é de 100% em concentrações inferiores a 0.09 µg/mL; entretanto, não foi possível observar capacidade de inibição destas citocinas nas concentrações usadas. Ensaio *in vivo* para o composto 15 não permitiram identificar redução da inflamação em modelo animal induzido por *P. acnes*. Em resumo, esses resultados permitem concluir que o composto (*E*)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol-2-óxido apresenta potente atividade antimicrobiana contra *Propionibacterium acnes* e pode se tornar uma alternativa terapêutica ao tratamento dessa doença.

Palavras-chave: *Propionibacterium acnes*. Atividade antimicrobiana. Concentração Inibitória Mínima. Furoxanos. Benzofuroxanos. Acne vulgar.

ABSTRACT

Acne is a self-limiting disease of multifactorial component characterized by the presence of inflammation and bacterial colonization by *Propionibacterium acnes*. Currently, topical and oral treatments include drugs presenting anti-inflammatory, antimicrobial, exfoliating and keratolytics properties. The current treatment has shown adverse effects that justify the search for new anti-acne drugs. Furoxan and benzofuroxan are heterocyclic compounds containing the *N*-oxide function that exhibit a wide range of pharmacological properties, including antimicrobial. Here, we investigated the antimicrobial effect of furoxans and benzofuroxans derivatives from a library of compounds belonging to the Medicinal Chemistry Laboratory on the School of Pharmaceutical Sciences - UNESP. In order to characterize the spectrum of action not only *P. acnes*, but also fungal, Gram positive and Gram negative strains of bacteria were used. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution technique. Benzofuroxan and furoxans were tested at concentrations ranging from 0.03 to 100 µg/mL. It was used as controls: cefazolin (0.39 µg/mL) for *P. acnes*; imipenem (<0.39 µg/mL) for Gram positive bacteria; aztreonam (<0.39 µg/mL) to Gram-negative; amphotericin B (0.25 µg/mL) and fluconazole (>65 µg/mL) for species of *Candida* and *Cryptococcus*, respectively. After incubation, visual readings were performed with and without revealing reagent (0.01%) to determine the MIC value. Over 20 compounds evaluated, 14 were able to inhibit the growth of at least one microorganism. The compound (E)-4-(3-((2-(3-hydroxybenzoyl) hydrazono) methyl) phenoxy)-3-(phenylsulfonyl)-1,2,5-oxadiazole-2-oxide was the most active molecule against *Propionibacterium acnes*, presenting MIC value of 0.19 µg/mL. *In vitro* studies showed that this compound was able to release nitric oxide, which should be one of the modes of action for this compound. There was also inhibition of NO production in macrophage at the concentration of 0.78 µg/mL. The cellular viability against macrophage cells and the anti-inflammatory effect characterized by the inhibition of IL1-β and TNF-α were performed. It was characterized in murine macrophages that the limit of 100% of viability is found at concentrations inferior to 0.09 µg/mL; however, it was not observed inhibition ability of these cytokines in the concentration used. The *in vivo* assay did not show anti-inflammatory activity of the tested compound. As conclusion, we identified the compound (E)-4-(3-((2-(3-hydroxybenzoyl) hydrazono) methyl) phenoxy)-3-(phenylsulfonyl)-1,2,5-oxadiazole-2-oxide as a new drug antimicrobial active against *Propionibacterium acnes*. This compound could be used as a new alternative to treat acne.

Keywords: *Propionibacterium acnes*, antibacterial activity, Minimum Inhibitory Concentration, furoxan, benzofuroxan and acne vulgaris.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos núcleos furoxânicos e benzofuroxânicos.....	43
Figura 2. Jarra de anaerobiose.	49
Figura 3. Fluxograma para a determinação da CIM pelo método de microdiluição...	51
Figura 4. Cortes emblocados em parafina	61
Figura 5. Mecanismo proposto para doação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos.....	73
Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos murinos na presença do composto 15.	74
Figura 7. Quantificação de liberação da citocina IL1- β pelo composto 15 nas concentrações de 0.78; 0.39; 0.19 e 0.09 $\mu\text{g/mL}$. Resultados expressos em pg/mL como média $\pm$ desvio padrão.	75
Figura 8. Quantificação de liberação da citocina TNF- α pelo composto 15 nas concentrações de 0.78; 0.39; 0.19 e 0.09 $\mu\text{g/mL}$. Resultados expressos em pg/mL com média $\pm$ desvio padrão.	76
Figura 9. Quantificação da produção do NO pelo composto 15 nas concentrações de 0.78 a 0.09 $\mu\text{g/mL}$, expressos em porcentagem de produção de NO.	77
Figura 10. Lesão inflamatória, dados macroscópicos e histológicos dos grupos dos animais.....	78
Figura 11. Lesão inflamatória dados macroscópicos	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas bacterianas e fúngicas	47
Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos 20 compostos furoxanos e benzofuroxanos avaliados contra as bactérias.....	64
Tabela 3- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do ensaio do <i>P. acnes</i> na ausência/presença do PTIO	67
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos 13 compostos analisados para cepas fúngicas (espécies de <i>Candida</i>).	68
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos 13 compostos avaliados contra cepas fúngicas da espécie de <i>Cryptococcus</i>	70
Tabela 6. Liberação de óxido nítrico pelo composto [(E)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol-2-óxido] (composto 15) na presença de cisteína (5mM) expresso em porcentagem (n =3).	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura química de fármacos usados no tratamento da acne via tópica	27
Quadro 2. Estrutura química de fármacos usados no tratamento da acne via sistêmica	35
Quadro 3. Algoritmo do tratamento da acne.....	41
Quadro 4. Estrutura química dos derivados benzofuroxanos e furoxanos testados nos ensaios	45
Quadro 5. Formulações testadas.	58
Quadro 7. Constituintes da formulação gel	59
Quadro 8. Constituintes da formulação	59
Quadro 9. pH das formulações testadas	60
Quadro 10. Análise de Colágeno	80
Quadro 11. Infiltrado inflamatório justaeepitelial.....	81
Quadro 12. Presença de cisto.....	82

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Anf B- Anfotericina B

ATCC -*American Type Culture Collection*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

COC - Contraceptivos Orais Combinados

CFU- Unidades formadoras de colônia

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN - Controle Negativo

DMSO -Dimetilsulfóxido

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

IC₅₀- Índice de Citotoxicidade

IL1- β -Interleucina 1-beta

IS - Índice de seletividade

LPS- Lipopolissacarídeo

MMPs- Metaloproteinases

MTT -[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobrometo]

NO - Óxido Nítrico

NOs- Óxido Nítrico Sintetase

TLR –*Toll Like Receptor*

PTIO - 2-(4-carboxifenil)-4, 4, 5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Pele e anexos	16
1.1.2. Microbiota da pele	17
1.2. Etiopatogenia da acne.....	18
1.3. <i>Propionibacterium acnes</i> e a resposta inflamatória.....	23
1.4. Tratamento da acne vulgar	26
1.4.1. Tratamento tópico	28
1.4.2. Retinoides Tópicos.....	29
1.4.3. Tratamento sistêmico	32
1.4.4. Tratamentos alternativos	38
1.4.5. Tratamento hormonal	39
1.5. Derivados benzofuroxânicos e furoxânicos	41
2. OBJETIVOS	44
2.1. Objetivo geral	44
2.2. Objetivos específicos	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. Compostos utilizados	45
3.2. Ensaio microbiológicos	47
3.2.1. Preparo das soluções.....	48
3.2.2. Preparo do inóculo para cepas bacterianas	48
3.2.3. Estoque e manutenção das cepas bacterianas.....	49
3.2.4. Padronização da suspensão bacteriana.....	50
3.2.5. Teste de Microdiluição.....	50
3.2.6. Leitura dos testes	51
3.3. Avaliação da atividade antifúngica	51
3.3.1. Padronização da suspensão antifúngica	51
3.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	52
3.4. Ensaio de liberação de óxido nítrico - determinação quantitativa de nitrito	53
3.5. Ensaio de citotoxicidade e de inibição da liberação de citocinas TNF- α e IL-1 β	54
3.5.1. Animais.....	54
3.5.2. Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	55
3.5.3. Ensaio de viabilidade de macrófagos	56
3.5.4. Determinação quantitativa da inibição das citocinas	56
4. Ensaio anti-inflamatório <i>in vivo</i>	57
4.1. Ensaio <i>in vivo</i>	57
4.2. Grupos de animais e formulações	58

4.3. Estudo histopatológico	60
4.3.1. Processo de desidratação e parafinização.....	60
4.3.2. Cortes histológicos - micrótomo	60
4.3.4. Processo de coloração histopatológica	61
4.3.5. Análises histopatológicas	61
6. Resultados e Discussão	63
7. Conclusão	84
Referências	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele e anexos

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e desempenha um papel complexo de proteção e defesa ao organismo. Esta estrutura reveste o corpo externamente e tem por função isolar componentes orgânicos do meio exterior e impedir a ação de certos agentes externos. É responsável ainda por manter a homeostasia corporal, realizar a termoregulação e proteger o sistema imunológico, assim como evitar a perda de água e eletrólitos (EDMONDS-WILSON et al., 2015; THYSSEN et al., 2014) .

Estruturalmente, é formada por uma camada superior designada epiderme, seguida de uma camada intermediária denominada derme e uma camada profunda denominada hipoderme (KAO et al., 2015). A camada superior ou externa, a epiderme, está em contato direto com o meio ambiente. Mais de 90% das células da epiderme são queratinócitos, responsáveis pela síntese da queratina. Estes formam quatro ou cinco camadas diferentes de epiderme, isto é, a camada córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e a camada basal. A espessura do estrato córneo varia de 0.03 mm a 0.1 mm na maior parte das regiões do corpo, sendo que a parte mais espessa se encontra na palma das mãos, e na planta dos pés, já que a pele requer proteção adicional, uma vez que são mais frequentemente envolvidos em atividades diárias em comparação com outras partes do corpo (LIU et al., 2013).

A segunda grande camada da pele é a derme, que é de 5 a 7 vezes mais espessa do que a epiderme. A derme contém uma alta densidade de colágeno, elastina e matriz extrafibrilar, que fornece suporte e dá à pele a sua elasticidade e propriedades de extensibilidade. Abaixo da derme se encontra uma camada de tecido subcutâneo também chamado de hipoderme. É composto por fibras e tecidos adiposos desempenhando papel importante no isolamento térmico e mecânico de proteção contra danos externos (LIU et al., 2013).

Em continuidade com a derme estão às glândulas sebáceas que são estruturas unilobulares ou multilobulares frequentemente associadas ao

folículo piloso e são compostas por alvéolos interligados a um canal excretor normalmente composto de epitélio estratificado escamoso. A glândula sebácea unida ao folículo piloso recebe a designação de unidade pilossebácea (CORAL; OLIVEIRA, 2012).

1.1.2. Microbiota da pele

Na sua grande extensão a pele é colonizada por diversos tipos de microrganismos, a maioria dos quais são inofensivos ou até mesmo benéficos para o hospedeiro. Assim, a pele constitui a primeira camada de defesa contra microrganismos infecciosos e agentes tóxicos (EDMONDS-WILSON et al., 2015 ;THYSSEN et al., 2014) .

Devido à localização e extensa superfície, a pele possui um ecossistema com uma abundância de dobras e invaginações constantemente exposta a vários tipos de microrganismos do ambiente. Deste modo, a pele normal do ser humano é colonizada por diversos microrganismos (bactérias, vírus e fungos) sendo que, a concentração bactéria na difere da área do corpo, da espessura da pele, de dobras e da densidade dos folículos pilosos (EDMONDS-WILSON et al., 2015).

Em regiões úmidas há o crescimento de microrganismos, como por exemplo, os fungos. As regiões com uma elevada densidade de glândulas sebáceas, como o rosto, peito e costas, estimulam o crescimento de microrganismos lipofílicos, como é o caso do *Propionibacterium* spp. e da *Malassezia* spp. Em outros locais da pele, como nos braços e nas pernas, a pele é relativamente desidratada e experimenta grandes flutuações de temperatura; portanto estas áreas são capazes de abrigar quantitativamente menos organismos do que nas áreas úmidas da superfície da pele (GRICE; SEGRE, 2011; CUNDELL, 2016).

Em geral, fatores como a temperatura da superfície da pele, a acidez (pH em torno de 5.6), o suor, a anatomia da pele local e a secreção de sebo se correlacionam com o microbioma predominante (BEYLOT et al.,2014).

Normalmente, o corpo humano possui um número estimado de 1×10^{14} células bacterianas, isso significa 10 vezes mais células bacterianas do que células humanas. A maioria destas bactérias se encontram no trato

gastrointestinal. Na pele é encontrada a quantidade média de 1×10^6 UFC por cm^2 contribuindo com metade do microbioma (CUNDELL et al., 2016; NEVES et al., 2015).

Estes microrganismos estabelecem uma residência mais ou menos permanente, ou seja, colonizam, mas não geram doenças em condições normais; porém, quando rompida a superfície da pele, a infecção subcutânea muitas vezes, se desenvolve levando às disfunções da estrutura da pele. Sabe-se que a microbiota da pele é estabelecida imediatamente logo após o nascimento, com o passar dos anos a diversidade da microbiota aumenta, assim como a especificidade de localização. Na puberdade, em resposta a secreção de glândulas sebáceas estimulada pelos hormônios, a taxa lipofílica aumenta e alguns difteróides como o *Propionibacterium* que são tipicamente anaeróbios se tornam mais proeminentes sobre a pele, habitando os folículos pilosos. O crescimento destes difteróides ocorre nas glândulas sebáceas e é um fator de desenvolvimento da acne (CUNDELL et al., 2016).

1.2. Etiopatogenia da acne

A acne é uma das dermatoses mais frequentes no mundo, atingindo cerca de 80% da população, principalmente adolescentes e adultos jovens. Deste grupo entre 15 a 30% dos indivíduos apresentam sintomas moderados a graves e requerem tratamento medicamentoso via oral e/ou tópica (PRETSCH et al., 2014). A *acne vulgaris* foi apontada como uma das dez doenças mais prevalentes no mundo no ano de 2010. Especificamente, de acordo com o estudo conduzido pela *Global Burden of Disease*, a acne aparece na oitava posição entre as doenças mais prevalentes no mundo (TUCHAYI et al., 2015).

A acne é uma doença dermatológica que atinge as glândulas pilossebáceas (folículo piloso e a glândula sebácea), causando um processo inflamatório (ITOH et al., 2014). Devido a maior distribuição dessas glândulas pilossebáceas na face, tórax e dorso, é comum encontrá-la majoritariamente nestas regiões (SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014).

A doença se manifesta em cerca de 40 a 60% dos jovens brasileiros entre os 12 e 30 anos de idade. Apesar de ser considerado um sintoma

menor, sem morbidade grave, a acne pode levar a vários problemas psicológicos como aqueles relacionados à autoestima dos adolescentes e jovens. Geralmente, as manifestações da doença se iniciam na puberdade, apresentando maior ocorrência entre os 14 e 17 anos para o sexo feminino, e entre os 16 e 19 anos para o sexo masculino. O sexo masculino apresenta maior predisposição para manifestar a forma mais grave da doença, devido à influência androgênica que leva à maior produção de sebo (SILVA; COSTA; MOREIRA, 2014).

A produção de sebo é mediada por hormônios como a testosterona. *In vivo* esse hormônio é convertido pela enzima 5- α -redutase tipo I para 5- α -dihidrotestosterona que é mais potente que a testosterona (DHT). Essa enzima é responsável ainda pelas alterações sebáceas nas áreas seborréicas, sobretudo face e tronco (FIGUEIREDO et al., 2011).

O *P. acnes* anteriormente denominado de *Corynebacterium acnes* vive especialmente em meio anaeróbio e sobrevive no interior das células de macrófagos, sendo capaz de gerar inflamação e de produzir biofilme nos folículos. Biofilme são comunidades bacterianas que aderem à unidade polissebácea formando um polímero de glicocálix, levando à adesão dos queratinócitos e formação dos comedões. A matriz do biofilme proporciona uma barreira protetora que impede a penetração de antibióticos. O modelo de formação de biofilme fornece pelo menos uma explicação parcial porque os antibióticos são frequentemente utilizados ao longo de meses no tratamento de acne. O *P. acnes* também é capaz de migrar do seu *habitat* do microbioma cutâneo para tecidos mais profundos com habilidade de sobreviver e apresentar potencial patogênico (NEVES et al., 2015; LEVIN, 2016).

A duração da doença é variável, podendo persistir na idade adulta em 50% das pessoas acometidas. Em alguns casos, a doença pode deixar sequelas/traumas na estrutura da pele (GOLNICK; ZOUBOULIS, 2014).

Há relatos do aparecimento da acne em outras faixas etárias, incluindo recém-nascidos, lactentes e crianças, podendo ser associados com diagnósticos que diferem daqueles presentes nos adolescentes. Os recém-nascidos muitas vezes apresentam limitada quantidade de pápulas (pequenas lesões); entretanto, as erupções também podem ocorrer.

Normalmente o aparecimento da acne em lactentes e crianças até 7 anos de idade é devido ao surgimento de anormalidades que podem indicar uma anomalia sistêmica subjacente (doenças endocrinológicas, tumores, gonadal/patologia do ovário) ou ainda virilização precoce. A maioria dos ensaios clínicos para o tratamento da acne são realizados em pacientes com 12 anos de idade ou mais, existindo pouca evidência de artigos publicados a respeito da segurança e eficácia dos medicamentos para pacientes pediátricos (EICHENFIELD et al., 2013).

A acne resulta da interação de vários fatores patogênicos. Entretanto, estudos sugerem que quatro são os parâmetros tidos como principais no desenvolvimento da doença, a saber: a) comedogênese (formação do comedão); b) produção de sebo; c) colonização bacteriana pelo *Propionibacterium acnes*; e) presença do processo inflamatório (PRETSCH et al., 2014).

Os dois primeiros são beneficiados pelo aumento do hormônio androgênico circulante. Este estimula a hiperproliferação no infundíbulo da glândula, originando uma “rolha” que oclui o orifício folicular e impede a drenagem do sebo, dando início a comedogênese (ZUCHETO et al., 2011).

O sebo secretado pela glândula sebácea é constituído por uma mistura oleosa de triglicéridos, ésteres de cera, esqualeno, ácidos graxos, pequenas quantidades de colesterol e ésteres de colesterol. A produção de sebo é regulada por muitos fatores que ativam vias envolvidas na proliferação e diferenciação, e estão envolvidos na liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (TUCHAYI et al., 2015).

O aumento da secreção de sebo está relacionado com o desenvolvimento de lesões de acne, já que o sebo serve como fonte de nutriente para o *P. acnes*. Além da descamação folicular resultante da barreira mecânica produzida pelo comedão, há também hiperestimulação androgênica que propicia a colonização microbiana e instalação do processo inflamatório (PRETESCH et al., 2014).

No canal folicular, o sebo se mistura com a queratina formando um tampão, apresentando-se como um comedão aberto, ou “cravo preto”, devido à melanina acumulada. A inflamação ou trauma dos folículos pode resultar na formação de um comedão fechado ou “cravo branco”. A proximidade de

comedões, geralmente evolui para lesões inflamatórias maiores. Se houver o rompimento ou dano da parede folicular, pode ocorrer o extravasamento do conteúdo do folículo para a derme e agravamento do processo inflamatório originando pústulas, pápulas ou máculas. Os glicerídeos sebáceos são transformados em ácidos graxos livres e glicerol pelas lipases, produzidas pelo *P. acnes*. Os ácidos graxos livres podem causar irritação na parede do folículo, atração e ativação de leucócitos mononucleares e inflamação (ZUCHETO et al., 2011).

É bem estabelecido que o excesso de sebo contribui para o desenvolvimento da acne. No entanto, nem todos os pacientes com acne apresentam a hiperseborréia, e de fato, a correlação entre a produção de sebo e a severidade da acne depende da idade e do sexo do indivíduo. O sebo apresenta conteúdo pró-inflamatório, com frações lipídicas contendo ácidos graxos monoinsaturados conhecidas como (MUFAs) e produtos resultantes da peroxidação do lípidio esqualeno. Este conteúdo sebáceo influencia na proliferação e diferenciação de queratinócitos, contribuindo assim para a hiperqueratinização folicular – uma das etapas envolvidas na doença. É demonstrado que diferentes grupos étnicos apresentam diferenças na quantidade de produção desse conteúdo lipídico pró. Isto justifica parcialmente porque a acne é mais prevalente em indivíduos afro-americanos do que em americanos considerados brancos (TUCHAYI et al., 2015).

A condição clínica do paciente pode ser ainda induzida ou exacerbada de vido à tensão emocional, ciclo menstrual, exposição a certos produtos químicos, utilização de cosméticos comedogênicos ou matérias primas adicionadas com tendência comedogênica (como exemplo: óleo mineral, manteiga de cacau, miristato de isopropila, ácido oleico, lanolina, ácido esteárico, entre outros óleos), medicamentos como esteroides anabolizantes, corticosteroides tópicos e sistêmicos, lítio, isoniazida e anticoncepcionais orais (FIGUEIREDO et al., 2011; LYN et al., 2016).

O estilo de vida moderno, que inclui dieta inadequada, estresse, pressão socioeconômica, tabagismo e variações nos padrões de sono, constituem também fatores de risco para o surgimento da acne. A dieta pode contribuir com substratos para a síntese de lipídios sebáceos, tais como o ácido linoleico. Dietas de baixa carga glicêmica podem reduzir a produção de

sebo através de efeitos endócrinos. O papel do tabagismo no desenvolvimento da acne não é claro. Um potencial mecanismo pelo qual o tabagismo pode induzir a acne é pelo aumento do estresse oxidativo que resulta em subsequente acumulação de peróxidos lipídicos em comedões (TUCHAYI et al., 2015). O peróxido lipídico (LPO) em comedões são produzidos como resultado da oxidação do sebo, podendo potencialmente induzir a produção de interleucina-1 α (IL-1 α) e exacerbar a comedogênese e as alterações inflamatórias em comedões (YANG et al., 2014). Esses lipídeos podem ainda promover a indução de fosfolipase A2-dependente de cascatas de sinalização de inflamação, exacerbando o processo inflamatório associado à doença (TUCHAYI et al., 2015).

A respeito do caráter hereditário, não há muitas informações disponíveis. O que se sabe, é que no desenvolvimento da acne há genes pertencentes ao citocromo P-450-1A1, a hidroxilase do esteroide 21 e certas glicoproteínas, que influenciam a produção do androgênio na glândula adrenal (LYN et al., 2016).

A acne é classificada de acordo com o grau das lesões e pode variar dos níveis I - V. A acne não inflamatória ou grau I é a forma mais leve da doença, caracterizada pelo predomínio de comedões. Acne com predominância de efeito inflamatório é encontrada nos graus II, III, IV e V. Na acne grau II há predomínio de lesões pápulo-pustulosas e comedões. Na acne grau III ou moderada se observam nódulos e cistos. A acne grau IV, mais conhecida como conglobata, é uma forma severa com predomínio de vários nódulos inflamatórios, formação de abscessos e fístulas. Por fim, a acne grau V, conhecida como acne fulminante, é uma forma rara e grave da doença. Este tipo apresenta instalação abrupta e normalmente é acompanhada de manifestações sistêmicas tais como, febre, leucocitose e artralgia (ZUCHETO et al., 2011).

Atualmente, são descritas duas espécies de microrganismos associadas ao desenvolvimento da acne: o *Propionibacterium acnes* que está presente na microbiota natural da nossa pele e é considerado o principal promotor ligada a inflamação da acne e as leveduras do gênero *Malassezia* sp. também presentes naturalmente na superfície da nossa pele. Entretanto

evidências científicas destacam o *P. acnes*, como o principal microrganismo envolvido na patogênese da doença (LYNN et al., 2016).

O *P. acnes* é uma bactéria anaeróbia facultativa, do tipo difteroides Gram positiva que possui forma de bastonete (NEVES et al., 2015). É pertencente ao grupo de bactérias da microbiota da pele, se localizando predominante nos folículos pilosos e preferindo condições anaeróbicas de colonização. O efeito deletério do *Propionibacterium* na acne é resultante da sua intensa proliferação, o que leva ao aumento do metabolismo bacteriano com ação inflamatória, decorrente de ácidos graxos livres liberados através da ação de lipases bacterianas (FIGUEIREDO et al., 2011).

É uma bactéria comensal presente dentro da unidade pilossebácea, podendo abrigar até 10^7 organismos viáveis. Esta bactéria metaboliza triglicéridos em ácidos graxos e glicerol. O glicerol é utilizado e os ácidos graxos livres podem servir para promover a inflamação perifolicular, num ambiente anaeróbico, isto é, predominantemente rico em lipídeos. Este microrganismo produz ainda enzimas, como as lipases, que estão envolvidas no processo de ruptura folicular e inflamação dérmica (LEVIN, 2016).

O *P. acnes* secreta ainda além das lipases, fatores quimiotáticos, metaloproteases e porfirinas. Estes diminuem as espécies de oxigênio e os radicais livres que causam danos aos queratinócitos (BEYLOT et al., 2014).

A hidrólise dos triglicérides com liberação de ácidos graxos livres contribui para manutenção do pH ácido na superfície da pele, que é um fator de proteção da pele. O *P. acnes* possui capacidade de fermentar carboidratos em ácido propiônico e ácidos graxos de cadeia curta. Lipídeos e ácidos graxos, portanto, são as principais fontes de nutriente dessa bactéria (NEVES et al., 2015).

1.3. *Propionibacterium acnes* e a resposta inflamatória

O organismo responde à presença do microrganismo através de anticorpos específicos contra o *P. acnes*. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a infecção. Componentes do *P. acnes* podem assim ativar os receptores do tipo *Toll-Like* (RYU et al., 2015).

Toll like receptors (TLR) são receptores transmembrânicos do sistema imune inato presentes em monócitos, neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas e em granulócitos (BEYLOT et al., 2014). Atualmente, se conhecem 11 tipos de TLR. Sabe-se que o *P. acnes* possui um fator solúvel, que apresenta atividade dependente do gene CD14. Este último é capaz de ativar principalmente os TLR-2 e TLR-4, induzindo a síntese de fatores pró-inflamatórios locais, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e da interleucina 1 β (IL1- β). Especificamente, os linfócitos CD4+ e os macrófagos estão envolvidos na produção de citocinas, que vão ativar as células endoteliais locais a atrair marcadores inflamatórios, como por exemplo, E-seletina, VCAM-1, ICAM-1 e HLA-DR nos microvasos adjacentes aos folículos. Além disso, as metaloproteinases (MMPs) têm capacidade para destruir os componentes da matriz extracelular e promover o rompimento do folículo pilossebáceo, promovendo assim extravasamento do conteúdo e exacerbação do processo inflamatório (PRETSCH et al., 2014; BEYLOT et al., 2014).

Observa-se ainda aumento expressivo da atividade da interleucina IL-1 nos folículos levando à hiperproliferação epitelial e a ativação dos queratinócitos. O aumento da IL-1 induz a regulação de genes que codificam as metaloproteinases (MMPs, B-defensina, IL-8 e a granulosa 7). Estabelecida a inflamação, as lesões inflamatórias do *P. acnes* vão ativar o fator nuclear (NF- κ B) assim como as citocinas reguladas por este fator, a exemplo da IL1- β , IL-8, IL-10 e o TNF- α . Estas citocinas por sua vez, vão induzir a síntese de ácidos graxos induzida pelas vias JNK, PI3K e AKT.

O aumento dos níveis de IL-8 atraem células inflamatórias como os leucócitos e linfócitos promovendo a produção de IL-17 e indução da célula T helper 17 (TH-17) que induzirá a produção de mediadores lipídicos anormais e levará a ativação de fatores de plaquetas. Esta última irá regular os níveis da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e da IL-8 em sebócitos.

O aumento do conteúdo lipídico ativa ainda PPAR- γ , que induz aumento na expressão gênica de COX-2 em queratinócitos e sebócitos, promovendo também a exacerbação do processo inflamatório (TUCHAYI et al., 2015).

Após rompimento do folículo, há ruptura da parede folicular com extravasamento de lipídios na derme favorecendo a liberação de substância-P, responsável por interferir no funcionamento da glândula sebácea (MONTAGNER; COSTA, 2010).

O *P. acnes* regula positivamente a secreção de diferentes citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) por queratinócitos humanos, sebócitos ou macrófagos. A interleucina 1 (IL-1) promove a formação do comedão. O *P. acnes* estimula a secreção da IL-1 pelos queratinócitos na participação da formação do comedão (BEYLOT et al., 2014).

Desta forma, o processo inflamatório associado ao crescimento excessivo do *P. acnes* é um dos principais alvos para a prevenção e tratamento da acne vulgar. Outro ponto importante do processo inflamatório associado à acne é a produção de radicais reativos de oxigênio e nitrogênio. A enzima óxido nítrico sintase produz óxido nítrico (NO) através da conversão da L-arginina a L-citrulina. A enzima é ativada na presença de vários estímulos, tais como o lipopolissacarídeo (LPS), o interferon gama (IFN- γ), o TNF- α e a interleucina-1 β (IL-1 β). O NO liberado por fagócitos ocasionam a lise de microrganismos invasores e promovem a sua morte celular (TSAI et al., 2012).

O *P. acnes* estimula as glândulas sebáceas e a síntese de sebo via receptor hormônio liberador de corticotropina que é um sistema capaz de aumentar a atividade lipogênica de sebócitos humanos (BEYLOT et al., 2014).

O aumento da produção de sebo é estimulado pela influência de andrógenos, queratinização ductal anormal, resultando em comedões, hipercolonização bacteriana e inflamação. O que está diretamente associada com o desenvolvimento de lesões de acne, uma vez que o sebo serve como uma fonte de nutrientes para o *Propionibacterium acnes* (PRETSCH et al., 2014).

O *P. acnes* produz várias enzimas dentre elas as lipases e fosfatases, todas envolvidas no processo de ruptura folicular e inflamação dérmica. Além das enzimas, produz fatores quimiotáticos para neutrófilos e linfócitos, e, por meio de fragmentos de sua parede celular, estimula macrófagos a

produzirem IL-8, IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa, cuja ação conjunta amplifica a inflamação (PRETSCH et al., 2014).

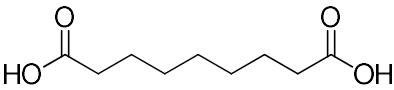
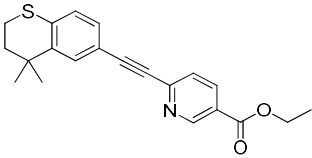
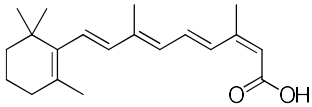
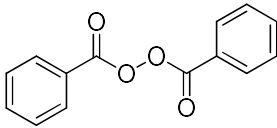
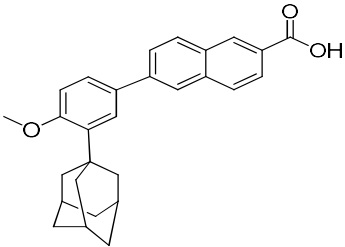
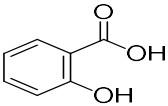
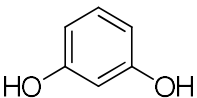
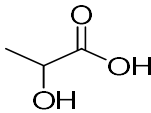
1.4. Tratamento da acne vulgar

A escolha do fármaco para tratamento da acne dependerá do tipo clínico e da classificação (gravidade) encontrada no paciente no momento do diagnóstico. A terapia antimicrobiana com agentes tópicos e sistêmicos isolados e/ou combinados são utilizados há muitos anos como tratamento da doença. Os antibióticos de uso tópico normalmente são utilizados para casos de pacientes que apresentam o quadro clínico da acne leve a moderada. Já a via sistêmica é indicada para casos mais graves (GOLNICK; ZOUBOULIS, 2014).

O tratamento precoce é de extrema importância a fim de prevenir sequelas físicas e psicológicas que a acne pode trazer ao paciente. Assim os objetivos do tratamento da acne consistem na redução da produção de sebo, na normalização da queratinização, redução interfolicular do *P. acnes* e da inflamação, assim como a resolução das lesões inflamatórias e não inflamatórias (BROTOS et al., 2015). Não existe um sistema de classificação universal para a *acne vulgaris*, devido à grande variedade de apresentações da doença e as multiplicidades dos fatores envolvidos, logo o tratamento deve ser individualizado. Busca-se normalmente a redução do microcomedo e a prevenção na formação de novos o que é essencial para a gestão das lesões. Para isso é importante que o paciente e o médico estejam cientes que o tratamento da acne na fase ativa visa minimizar lesões evitando sequelas e complicações. Motivos que fazem com que o tratamento seja prolongado, até que se dê a eliminação espontânea do processo (CAPDVILA, 2014).

Os principais fármacos usados no tratamento tópico incluem: isotretinoína, peróxido de benzoíla (PB), ácido azelaico, adapaleno, tazaroteno, eritromicina, clindamicina e agentes queratolíticos com ação antibacteriana leve (ácido salicílico, enxofre e resorcina) (Quadro 1) (CAPDVILA, 2014).

Quadro 1. Estrutura química de fármacos usados no tratamento da acne via tópica

	
ácido azelaico	tazaroteno
	
isotretinoína	peróxido de benzoíla
	
adapaleno	ácido salicílico
	
resorcina	ácido láctico

1.4.1. Tratamento tópico

Peróxido de Benzoíla

O peróxido de benzoíla (PB) é indicado para pessoas com acne facial leve a moderada (WILLIAMS et al., 2012). Possui atividade antimicrobiana efetiva contra bactérias Gram-positivas e reduz de maneira significativa o número de *Propionibacterium acnes* e do *Staphylococcus epidermidis* na pele. O fármaco sofre decomposição na pele, liberando radicais livres de oxigênio que oxidam as proteínas bacterianas. Possui ainda, certo grau de atividade comedolítica e queratolítica, haja visto que o fármaco desestrutura o tampão folicular e provoca esfoliação das células epiteliais (OKAMOTO et al., 2016). É um fármaco de natureza lipofílica que permite penetrar no estrato córneo e entrar no ducto pilossebáceo para promover sua ação (KOSMADAKI; KATSAMBAS, 2017).

O PB é considerado seguro e eficaz, podendo ser aplicada ao redor da região afetada. Pode ser usado isolado ou em combinação com antibióticos orais ou tópicos, a fim de minimizar a resistência microbiana, reduzindo assim a colonização do *P. acnes*. A aplicação do produto pode provocar inicialmente uma pequena irritação local e neste caso os pacientes são aconselhados a esperar a irritação cessar antes da reaplicação. Recomenda-se o uso do medicamento contendo concentrações baixas (2,5% ou 5%) de peróxido de benzoíla, uma vez que causa menos irritações e não há nenhuma evidência de que preparações mais concentradas sejam mais eficazes. Com frequência o PB induz efeitos colaterais, como pele seca e escamosa, uma vez que reduz a gordura livre na superfície da pele, além de outros efeitos colaterais tais como, eritema, mancha nas roupas e alergia de contato (LYNN et al., 2016; CAPDEVILA, 2014).

Ácido Azelaico

O ácido azelaico é um fármaco usual no tratamento da acne leve e moderada e em pacientes que não toleram o peróxido de benzoíla. É recomendada também em casos de hiperpigmentação pós-inflamatória. É de uso tópico e possui atividade, anti-inflamatória leve. É usado como tratamento de segunda escolha, pois pode apresentar como efeitos adversos:

prurido, dores agudas e rápidas e sensação irritante na superfície da pele leve e transitória (BOTROS et al., 2015).

O fármaco atua normalizando a queratinização folicular e reduzindo a concentração de *P. acnes* na unidade pilo-sebácea. Normalmente comercializado na concentração de 20%, sob a apresentação de creme. O ácido azelaico pode ser aplicado normalmente duas vezes ao dia. É uma excelente opção para pacientes com pele seca e/ou clara, não provoca fotossensibilidade, embora cause uma pequena irritação cutânea. Deve-se ter precaução quanto ao uso na gestação, pois estudos mostram que o fármaco não é seguro para estas pacientes (CAPDEVILA, 2014).

Além do efeito anti-inflamatório, o ácido azelaico possui atividade antimicrobiana. Embora o mecanismo de ação para tal não seja bem estabelecido, é proposto que o fármaco pode interferir com o gradiente de pH transmembranar inibindo a síntese protéica de microrganismos susceptíveis (KOSMADAKI; KATSAMBAS, 2017).

1.4.2. Retinoides Tópicos

Os retinoides têm seu uso controlado, devido à ocorrência de irritação após o início do tratamento. Os mais utilizados são o ácido retinoico na concentração de (0.025 a 0.1%), isotretinoína 0.05% e o adapaleno 0.1%. Deve-se iniciar o tratamento com concentrações baixas quando se opta pelo ácido retinoico e ir aumentando gradativamente para concentrações maiores dependendo da resposta clínica do paciente (CAPDVILLA, 2014).

O uso da isotretinoína oral e tópica diminui o número total de microrganismos bacterianos resistentes sobre a pele e reduz diretamente a quimiotaxia dos neutrófilos. A longo prazo reduz em 70% a 89% do processo inflamatório. É indicada para acne severa, fulminante, ou para indivíduos que não respondem às terapias convencionais, incluindo antibióticos tópicos e orais (BRITO et al., 2010).

A Isotretinoína e a tretinoína que são compostos derivados do metabolismo do retinol (vitamina A) reduzem a hiperseborreia, suprimem a produção de sebo, diminuem a proliferação basal e terminal de sebócitos e minimiza o tamanho das glândulas sebáceas. Todos estes efeitos resultam

em diminuição da colonização do *Propionibacterium acnes* na unidade pilosebácea (EICHENFIELD et al., 2013).

A segurança e eficácia dos retinoides em uso tópico estão bem documentadas, e são recomendados tanto para pacientes pediátricos quanto jovens. Os retinoides normalizam as descamações foliculares do epitélio, prevenindo a formação de novos microcomedões. Possuem atividade anti-inflamatória, e os mais comumente utilizados nos dias atuais são a isotretinoína, o adapaleno e o tazaroteno (EICHENFIELD et al., 2013).

Os efeitos adversos comuns incluem ardor, secura e descamação da pele. O adapaleno (fármaco de terceira geração) é um retinoide distinto dos outros, pois é bem tolerado pelos pacientes, e geralmente está disponível em formulações incluindo creme, gel e loção. O adapaleno é fotoestável, podendo ser usada em combinação com o peróxido de benzoíla, apresenta atividade queratolítica e anti-inflamatória. O tazaroteno é um retinoide tópico eficaz, porém poucas vezes é usado como agente de primeira linha para o tratamento da acne, devido a preocupações sobre a sua tolerabilidade, é conhecido por ser mais irritante entre os retinoides (EICHENFIELD et al., 2013).

Outra reação adversa comum é a fotossensibilidade associada ao uso de retinoides, sendo conveniente o uso de filtro solar e proteção adicional durante o uso desses produtos, pois a exposição solar pode causar queimaduras. Retinoides mais recentes, como a isotretinoína e o adapaleno, são mais toleráveis e normalmente são associados aos antimicrobianos em formulações comerciais (CAPDVILLA, 2014; BRITO et al., 2010).

A isotretinoína ou o ácido 13-cis-retinoico é um dos fármacos mais eficazes empregado no tratamento da acne, sendo recomendada como tratamento de primeira escolha para a acne grave (acne nodular severa pápulo-pustulosa, acne conglobata). Além do uso oral, pode ser indicado pelo médico para uso tópico. As doses recomendadas variam de 0.3-0.5 mg/Kg para a acne nodular pápulo-pustulosa grave e ≥ 0.5 mg/Kg de peso corporal para a acne conglobata. A terapia deve ser contínua por 6 meses ou por vezes até 24 meses. Existe o risco de aumento da potencialização e teratogenicidade quando há combinação do ácido retinoide com altas doses de vitamina A. Pode causar ainda depressão e há indícios de risco de

pensamento suicida durante o uso do fármaco (GOLNICK; ZOUBOULIS, 2014). Outros efeitos secundários comuns vistos na terapia de baixa dose incluem secar em mucosas (boca, nariz, pele) e olhos, mialgias, cicatrização anormal de feridas, queimaduras solares, descamação e maior fragilidade da pele. A maioria destes sintomas se resolvem quando o tratamento é suspenso (LYNN et al., 2016).

A isotretinoína também pode causar vários sintomas oculares, tais como a diminuição da adaptação ao escuro, diminuição da visão. É contraindicada para grávidas por ser um fármaco teratogênico (ZOUBOULIS; BETTOLI, 2015).

Ácido salicílico e substâncias usadas em 'peeling' químico

O ácido salicílico é um agente queratolítico com ação antibacteriana leve. Apresenta ainda atividade comedolítica e anti-inflamatória, e pode ser associado à retinoides tópicos no tratamento da acne comedônica ou usado como tratamento de segunda escolha. Ele é usado em concentrações de 0.5-2%. Em concentrações baixas é considerado seguro para uso durante a gravidez e lactância. Um dos efeitos interessantes desse fármaco é a combinação do efeito anti-inflamatório e antibacteriano (CAPDVILA, 2014).

Em altas doses e por períodos prolongados, pode provocar salicilismo, especialmente em peles mais permeáveis devido à inflamação ou ao processo de esfoliação que ocorre. O fármaco deve ser evitado em gestantes, pois há riscos para o feto ou recém-nascido. Devido ao efeito queratolítico, o ácido salicílico também é usado em *peelings* químicos (CAPDVILA, 2014).

Os *peelings* químicos, também chamados de esfoliação química, podem ser classificados em superficiais e profundos. *Peelings* químicos superficiais ou profundos são considerados como tratamentos adjuvantes para o tratamento da acne e consiste na aplicação de substâncias químicas que produzem destruição controlada da epiderme, para sua posterior re-epitelização. Muitas vezes são usados em combinação com as terapias de primeira linha, tais como os retinoides e antibióticos. Os *peelings* químicos são geralmente considerados seguros e eficazes, formando uma parte

importante do tratamento da acne. Auxiliam ainda na redução das cicatrizes decorrentes causadas pelas lesões acnéicas (HANDOG et al., 2012).

Além do ácido salicílico, comumente se utiliza alfa-hidroxiácidos cuja principal função é queratolítica e anti-seborreica. O mais utilizado é o ácido glicólico e a menor concentração habitual é de 2%; entretanto, muitas vezes essa concentração é insuficiente para corrigir as cicatrizes mais profundas e acabam gerando aumento de toxicidade ou complicações. Alfa-hidroxiácidos são seguros durante a gestação e lactação. Deve-se evitar combinações com ácido salicílico, ácido retinóico, ácido tricloroacético e fenol durante uso dos alfa-hidroxiácidos devido a efeitos irritativos na pele (CAPDEVILA, 2014).

São incluídos ainda no tratamento da acne e suas cicatrizes, solução de *Jessner*, resorcinol e ácido tricloroacético. A solução de *Jessner* é uma combinação formada de 14% de resorcinol, 14% de ácido salicílico, 14% de ácido láctico e etanol. Mais recentemente, surgiram no mercado outros compostos com capacidade de 'peeling' químico como ácido láctico, e uma combinação de ácido salicílico e ácido mandélico. No entanto, o uso de *peelings* químicos pode ter efeitos adversos, tais como hiperpigmentação pós-inflamatória que é mais comumente visto em tipos de pele mais escura. A força do *peeling* é determinada pelo número de camadas da solução aplicada, e é normalmente usado em combinação aumentando a profundidade do *peeling* global. O resorcinol pode causar hiperpigmentação pós-inflamatória em pessoas com tendência em desenvolver discromias. Há também o risco de desenvolver dermatite de contato; por isso, '*peeling*' químico deve ser utilizado com precaução, e associado com o tratamento mais adequado ao paciente (HANDOG et al., 2012).

1.4.3. Tratamento sistêmico

Em relação ao tratamento sistêmico recomendado para casos mais graves da doença geralmente são usados três grupos de antibióticos de amplo espectro são eles: tetraciclina, eritromicina e clindamicina. Todos são indicados para os diversos tipos de acne inflamatória, principalmente para a acne de grau moderado (LYNN et al., 2016). O tratamento geralmente dura de seis a oito semanas, sendo que os efeitos começam a ser observados apenas no final do tratamento (CAPDEVILA, 2014).

A acne inflamatória e com formação de nódulos frequentemente requer um tratamento sistêmico, incluindo antibióticos. A eficácia do antibiótico depende da sua capacidade em reduzir a carga de *P. acnes* e modular a inflamação. Antibióticos como a doxiciclina, minociclina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim se tornaram comuns nos tratamentos. Para acne grave, por exemplo, a primeira escolha é a minociclina (NAGLER et al., 2015).

Tetraciclinas

As tetraciclinas de primeira geração (clortetraciclina, oxitetraciclina, cloridrato de tetraciclina e dimetil-clortetraciclina) foram introduzidas em 1951 e são amplamente utilizados no tratamento da acne. As de segunda geração (doxiciclina, minociclina e lomeciclina) são derivados semissintéticos e possuem o tempo de meia-vida mais longo, o que lhes conferem melhor atividade antibacteriana (NGUYEN et al., 2014).

A dose de oxitetraciclina e tetraciclina recomendada para o tratamento da acne é de 500 a 1000 mg por dia. Já para minociclina, a dose recomendada é de 100 mg/dia. Este fármaco é ativo contra cepas de *Staphylococcus* sensíveis à tetraciclina e algumas cepas bacterianas Gram-positivas resistentes à vancomicina (CAPDVILA, 2014). A minociclina é mais comumente prescrita pelos médicos, uma vez que promove melhoria da acne inflamatória mais efetiva que a tetraciclina (BOTROS et al., 2015).

O mecanismo de ação das tetraciclinas está relacionado à inibição da síntese de proteínas bacterianas no ribossomo. A sua absorção não é completa e diminui na presença de agentes quelantes e alcalinos, como o leite, sais de alumínio e suplementos de cálcio, magnésio e ferro (NGUYEN et al., 2014).

Entre os efeitos adversos comuns da classe das tetraciclinas destacam-se: complicações gastrointestinais, fotossensibilidade, crescimento de fungos como a *Candida albicans* (podendo levar à vulvovaginite). Deve ser usada apenas em indivíduos com idade acima de 12 anos, e em mulheres grávidas deve ser evitada porque causa pigmentação dos dentes, além de apresentar baixa absorção se tomado com íons metálicos (ferro e

cálcio) podendo haver complexação com estes íons (EICHENFIELD et al., 2013).

Eritromicina

A eritromicina pertence à classe dos macrolídeos, possui ação antibacteriana e anti-inflamatória. É indicada no tratamento da acne inflamatória leve e moderada. É uma alternativa terapêutica aos indivíduos que não toleram as tetraciclinas (EICHENFIELD et al., 2013). Pode causar distúrbios digestivos e não é recomendada para crianças com idade menor que 12 anos e em mulheres gestantes (CAPDEVILA, 2014). Não é recomendada em monoterapia devido ao início de ação lenta e possibilidade de surgimento de resistência. Embora seja tão eficaz quanto à tetraciclina, parece induzir com mais frequência à resistência bacteriana; por isso, é comumente usado em associação com peróxido de benzoíla tópico. Os efeitos colaterais comumente relacionados ao medicamento incluem: distúrbios gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia), toxicidade hepática, ototoxicidade e pancreatite (EICHENFIELD et al., 2013).

Azitromicina

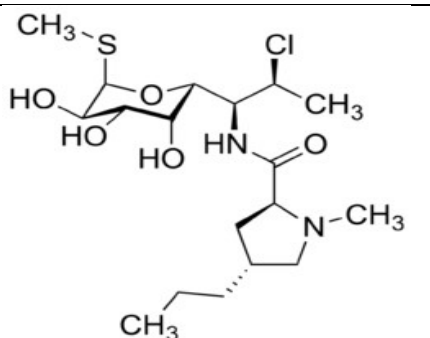
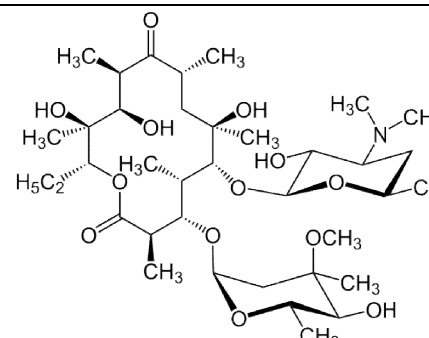
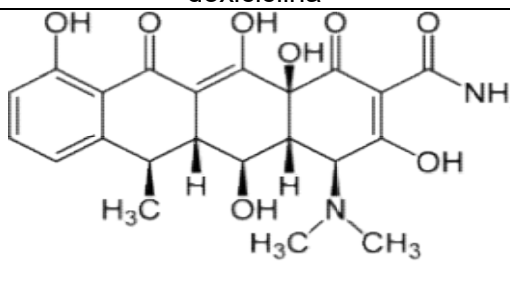
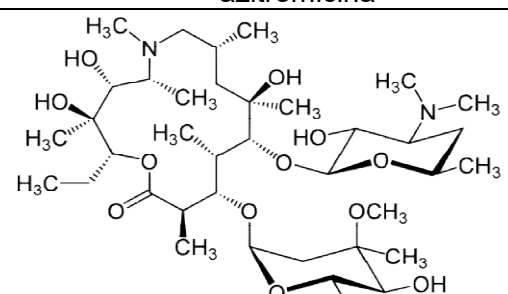
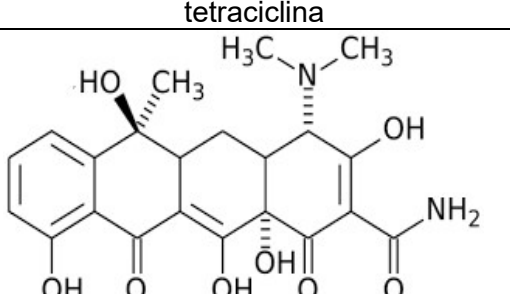
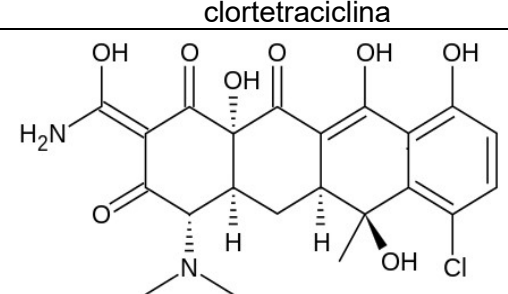
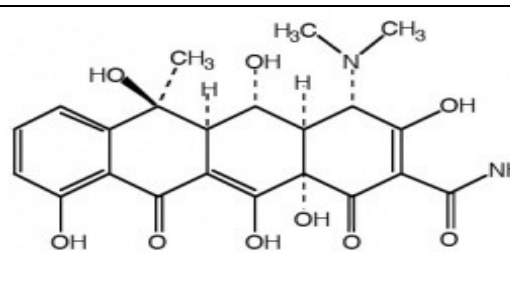
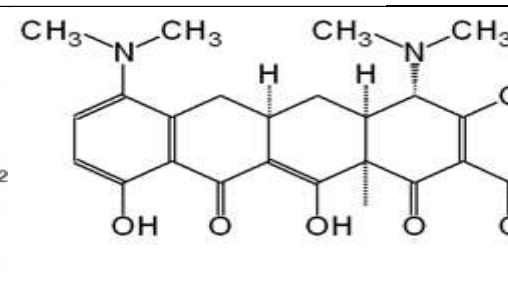
A azitromicina é normalmente bem tolerada, devido aos poucos efeitos colaterais que causa ao paciente e a comodidade posológica - uma dose de 500 mg via oral uma vez ao dia durante três dias com intervalo de dez dias em até três ciclos. É considerada segura para gestantes (CAPDEVILA, 2014).

Clindamicina

Clindamicinas são antibióticos bacteriostáticos que possuem adicional atividade anti-inflamatória no tratamento da acne. A dose recomendada é de 150 mg via oral uma vez ao dia e apresenta como efeito colateral a colite pseudomembranosa. O uso da clindamicina está associado a sérias complicações gastrintestinais graves, além da necessidade de monitoramento periódico de órgãos como o fígado e os rins durante a terapia prolongada. Devido a estes efeitos adversos, guias de orientações europeias recomendam evitar o uso via oral da clindamicina no tratamento da acne, deixando assim, este fármaco restrito a condições especiais de avaliação risco-benefício pelo médico (WALSH et al., 2016).

Para pacientes para os quais a terapia convencional de antibióticos falha ou que situações em que os pacientes não podem tolerá-los, outros antibióticos podem ser úteis, incluindo: amoxicilina, azitromicina, cefalexina e sulfametoxazol-trimetoprim (CAPDEVILA, 2014).

Quadro 2. Estrutura química de fármacos usados no tratamento da acne via sistêmica

clindamicina 	eritromicina 
doxiciclina 	azitromicina 
tetraciclina 	clortetraciclina 
oxitetraciclina 	minociclina 

Resistência aos antibióticos de uso sistêmico

Apesar da eficácia dos antibióticos no tratamento de acne, há preocupações para o surgimento de casos de resistência bacteriana (NAGLER et al., 2015). Infelizmente, hoje a resistência a antimicrobianos constitui um dos principais problemas de saúde pública com abrangência mundial, devido ao rápido aparecimento de bactérias resistentes. Nos dias atuais há uma preocupação constante na busca por novos agentes antimicrobianos, uma vez que, a potência efetiva dos antimicrobianos existentes, vem sendo de forma gradual reduzida e/ou anulada pelo desenvolvimento de cepas resistentes (VENTOLA, 2015; ÓTEO; ARACIL, 2015).

Conhecer os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é importante a fim de compreender o fenômeno. A resistência bacteriana varia de patógeno para patógeno, e é causada por alguns fatores básicos, a saber: a) inativação do antibiótico por alterações químicas diretamente na molécula bioativa, normalmente promovidas por enzimas bacterianas; b) modificações na estrutura do alvo que pode levar à perda de sensibilidade ao antibiótico; c) mudanças na permeabilidade externa da membrana que acabam reduzindo a concentração do antibiótico; d) aumento da expressão de bombas de efluxo; e) ausência ou diminuição da expressão do alvo (GUIMARÃES et al., 2010).

Os primeiros registros que se têm sobre a resistência antibiótica pelo *P. acnes* foram relativos à eritromicina. Para este fármaco, os mecanismos envolvidos e que foram identificados são: mutações pontuais nos genes que codificam o RNA ribossomal, mutação única no gene 16S e no gene 23S do rRNA. Os principais fatores de risco para a ocorrência de resistência estão relacionados à idade, uso inadequado e pré-exposição aos antibióticos tópicos (NEVES et al., 2015).

Tem sido relatado que a eritromicina tópica são cada vez menos eficazes no tratamento da acne (WALSH et al., 2016). Os antimicrobianos

atuam não somente contra *P. acnes*, mas também podem influenciar as bactérias comensais como é o caso do *Staphylococcus epidermidis* (EICHENFIELD et al., 2013). Este microrganismo é resistente a eritromicina, a roxitromicina e a clindamicina. O *S. epidermidis* tem a capacidade de transferir resistência através de plasmídeos. No entanto, não é comum relatos de *P. acnes* adquirir resistência de outras bactérias. Tem-se verificado que a resistência ao *P. acnes* está principalmente relacionada a situações de monoterapia (WASLH et al., 2016).

Assim chegou-se ao consenso de que a combinação de um retinoide tópico e agente antimicrobiano é preferido como terapia de primeira escolha para pacientes com acne. O peróxido de benzoíla (PB) é recomendado como um complemento para a terapia tópica, quando o uso de antibióticos a longo prazo é necessário, porque é um agente bactericida altamente eficiente que irá minimizar o desenvolvimento da resistência nos locais de aplicação e aumentará o espectro de atividade. Os antibióticos tópicos atuam de forma relativamente lenta contra o *P. acnes* e tem um efeito supressor fraco em comparação com o PB; no entanto os antibióticos orais são geralmente considerados como sendo mais eficazes do que antibióticos tópicos (WALSH et al., 2016).

Ensaio clínicos têm demonstrado que mais de 50 % das cepas de acne são resistentes, particularmente aos macrolídeos tópicos (clindamicina, eritromicina) tornando-se menos eficazes no tratamento da acne. O desenvolvimento dessa resistência se explica através de mudança mutacional, que é transferido verticalmente, e é comumente associada com mutações nos genes 16S e 23S do RNA mensageiro (WALSH et al., 2016).

Embora exista uma enorme variedade de antibióticos para tratamento da acne, grande número de estudos clínicos sobre a eficácia destes ainda é limitada. Geralmente, pacientes com acne fazem tratamentos prolongados (3 a 6 meses) utilizando um único antibiótico, isso a longo prazo resulta na exposição de concentrações variáveis que podem potencializar a resistência. Nos casos de infecções graves causadas pelo *P. acnes*, deve-se evitar o uso de medicações com possibilidade de resistência, sendo preferível a combinação de penicilina cristalina, vancomicina, daptomicina e rifampicina por seu efeito sobre o biofilme (NEVES et al., 2015).

Algumas estratégias são recomendadas para melhorar a prescrição e evitar a resistência do *P. acnes*:

- a) A prescrição oral deve ser limitada: recomenda-se até 3 meses em terapêutica contínua;
- b) O período para a antibioterapia tópica deve ser de 6 a 8 semanas, devendo ser interrompida sempre que não haja melhoria clínica;
- c) Nas recidivas não se deve voltar a fazer uso do mesmo antibiótico; Não se deve associar o mesmo produto por via tópica e oral;
- d) A regra que previne a emergência de resistências é a terapêutica combinada, ou seja, com retinoides tópicos ou com o peróxido de benzoíla (FIGUEIREDO et al., 2011). Deve-se evitar assim, a monoterapia.

1.4.4. Tratamentos alternativos

Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é um tratamento óptico extensivamente estudado que demonstrou ser seguro e eficaz no tratamento de lesões da acne. É uma terapia não invasiva que utiliza tratamentos de luz, juntamente com um agente de fotossensibilização. Os agentes de fotossensibilização usados neste tipo de terapia para acne são: ácido 5-aminolevulínico, aminolevulinato de metila e ácido indol-3-acético. Supõe-se que uma vez aplicado sobre a pele, os agentes fotossensibilizadores são preferencialmente levados até a unidade pilossebácea auxiliando na resposta à terapia de luz (KEYAL et al., 2016). É sabido que a luz de alta intensidade (405 a 420 nm de comprimento de onda) tem ação bactericida contra a *Propionibacterium acnes* e pode ser utilizada no tratamento (CAPDEVILA, 2014).

Fontes de luz incluindo a terapia fotodinâmica, *lasers* de infravermelho, *lasers* de corante pulsado, luz intensa pulsada, *laser* de fosfato, servem como tratamentos ópticos podendo também melhorar a acne inflamatória em curto prazo. Dor, vermelhidão, inchaço e aumento da pigmentação são alguns dos

efeitos adversos comuns observados durante a terapia fotodinâmica (WILLIAMS et al., 2012).

Higiene, manipulação e exposição solar

A higiene do local é um tratamento complementar importante no tratamento da acne. Em geral, é recomendada a lavagem com água e sabão neutro ou sabonetes líquidos na área a ser tratada, duas vezes ao dia. O processo de secagem deve ser feito com cuidado. Como regra geral, deve ser recomendado ao paciente evitar qualquer lesão devido à manipulação da inflamação, já que essas manipulações são as principais causas do aparecimento e da persistência de sequelas como lesões e cicatrizes (CAPDVILA, 2014).

Pacientes jovens com acne muitas vezes observam uma melhora do processo quando expostos a radiação solar, entretanto, efeitos rebote são observados após exposição e por isso devem ser evitados. A exposição solar deve ser acompanhada sempre do uso de protetores solares (CAPDVILA, 2014).

1.4.5. Tratamento hormonal

Os contraceptivos orais combinados (COC) contêm dois tipos de hormônios: estrogênio (etinilestradiol) e o progestogênio. São frequentemente prescritos para mulheres com acne, pois o estrogênio suprime a atividade da glândula sebácea e diminui a formação do hormônio androgênio (WILLIAMS et al., 2012).

Os COC também suprimem os hormônios da gonadotrofina luteinizante e folículo-estimulante. Isto diminui a produção ovariana de andrógeno e ovulação (HARPER, 2016).

A utilização isolada do contraceptivo progestogênio tende a piorar o quadro da acne, por isso, o tratamento hormonal visa antagonizar os efeitos andrógenos, uma vez que as glândulas sebáceas são andrógeno-dependentes. Desta forma, recomenda-se a terapia com contraceptivos orais

de maior efeito anti-androgênico (etinilestradiol+ciproterona), espirolactona e a flutamida (LYNN et al., 2016).

A terapia hormonal é recomendada para mulheres com acne moderada a grave, ou aquelas que não respondem bem à terapia convencional devido ao excesso de hormônios androgênicos combinada com sintomas de seborreia, hipersutismo e alopecia e quanto mais cedo for feito o tratamento melhores os resultados (WILLIAMS et al., 2012). Como efeitos adversos, aumentam o risco de tromboembolismo venoso, de infarto do miocárdio e de acidente vascular cerebral. Além disso, têm um impacto sobre os riscos de câncer do colo do útero e da mama (HARPER, 2016).

Algoritmo de tratamento da acne

O tratamento medicamentoso está baseado na severidade da acne, cuja classificação pode ser: leve, moderada e severa (Quadro 3). Para condições leves e comedônicas, o tratamento de primeira escolha recomendado é algum derivado retinoide tópico, e alternativas incluem uso de ácido salicílico e ácido azelaico. Para condições de severidade maior, como a acne nodular ou conglobata, recomenda-se o uso de retinoides por uso oral como primeira escolha, e como alternativo antibiótico oral retinoide tópico e peróxido de benzoíla. A utilização correta dos algoritmos de tratamento contribuem para seleção adequada dos fármacos, melhorando a atividade e diminuindo o surgimento de resistência. Para a elaboração destes algoritmos se leva em consideração a compilação de dados obtidos em estudos clínicos, e por isso, sendo baseados em evidências clínicas torna o tratamento menos empírico.

Quadro 3. Algoritmo do tratamento da acne.

Severidade	Leve		Moderada		Severa
Tipo de acne	Comedônica	Pápulo-Pustulosa	Pápulo-Pustulosa	Nodular	Nodular/Conglobata
1ª Escolha	RT	RT + AT	AO ou RT ou PB	AO+TR ou PB	IO
Alternativa	Alternar RT/AS/AA	Alternar RT+RT/AA	Alternar AO+RT+PB	IO ou alternar AO+alternar RT ou PB/AA	AO+RT+PB
Alternativa para mulheres	RT	RT+AT	AN+TR/AA ou AT	AN+RT ou AO ou alternar AT	NA+RT ou alternar AT
Terapia de manutenção	RT	RT	TR+PB	RT+PB	RT ±PB

PB=Peróxido de Benzoíla; RT=Retinoide Tópico
 AO=Antibiótico Oral; NA =Antiandrogênio Oral
 AA= Ácido Azelaico; AS= Ácido salicílico
 AT= Antimicrobiano Tópico; IO= Isotretinoína Oral

Fonte: Adaptado de DIPIRO et al., 2009.

1.5. Derivados benzofuroxânicos e furoxânicos

A classe dos benzofuroxanos (Figura 1), quimicamente (*benzo [1,2-c]-1,2,5-oxadiazol-N-óxido*) são conhecidas por suas propriedades antimicrobianas (TEIXEIRA et al., 2014). Tem recebido especial atenção, desde a síntese do 4,6-dinitrobenzofuroxano em 1899 por Drost. Os benzofuroxanos apresentam ainda efeitos antimaláricos, anti-tuberculose, antifúngica, leishmanicida, antichagásica, antileucêmica e propriedades de imunossupressão (JOVENÉ et al., 2013).

O mecanismo de ação dos derivados benzofuroxanos não está bem estabelecido, mas acredita-se que *in vivo* possam sofrer bioativação e aumentar o número de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Estas espécies seriam responsáveis por promover estresse oxidativo, principalmente em células bacterianas, promovendo assim a morte do microrganismo (TEIXEIRA et al., 2014; CHUGNOVA et al., 2016; JORGE et al., 2011).

Enquanto isso os derivados furoxânicos (Figura 1) quimicamente conhecidos como *1,2,5-oxadiazol-2-N-óxido* são heterocíclicos da família dos

isoxadiazóis, com a presença de um N-óxido em sua estrutura. Ambos os derivados *um, 2,5- isoxazol* e o *1, 2,4-oxadiazol* têm uma grande importância para a Química Farmacêutica e Medicinal e nos últimos anos tem sido muito utilizada como protótipos para obtenção de novos compostos ativos. Os derivados furoxânicos representam uma importante classe de compostos com variadas aplicações e propriedades farmacológicas. Diversas atividades biológicas já foram relatadas envolvendo este heterocíclico, como antimicrobiana (HERNÁNDEZ et al., 2013), a atividade antileishmania (DUTRA et al., 2014), antineoplásica (ZOU et al., 2011), vasodilatadora, antiagregante, entre outras.

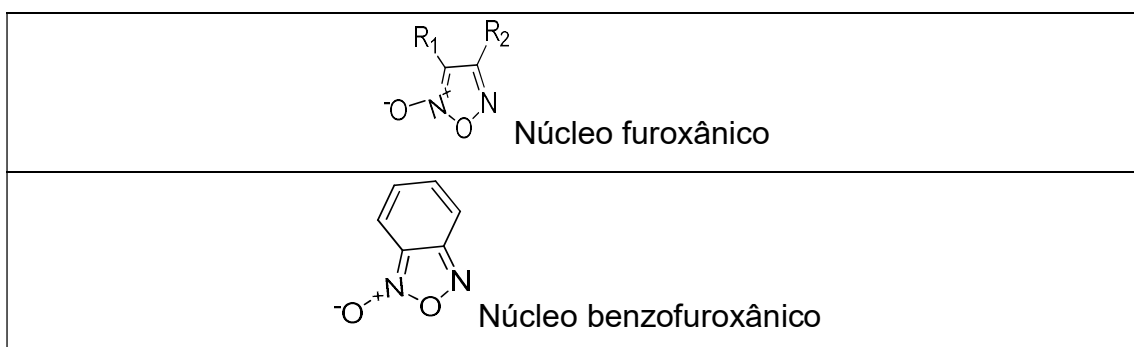
Essas atividades farmacológicas são relacionadas em parte à capacidade de doação de óxido nítrico pela subunidade furoxânica.

Os furoxânicos são compostos estáveis em meio ácido e são capazes de produzir óxido nítrico em solução fisiológica sob a ação de cofatores contendo o grupo tiol. A doação do NO está relacionada diretamente ao grupo ligado ao carbono vizinho à função N-óxido (AMIR et al., 2015).

Essa grande diversidade de atividade biológica dos núcleos heterocíclicos furoxânicos (*1, 2,5 oxadiazol 2- óxido*) e benzofuroxânicos (*benzo [1, 2,5] oxadiazol-1-óxido*) (Figura 1) tornam seus derivados interessantes protótipos a ser investigados como novos candidatos a fármacos (SCHIEFER et al., 2012). Assim, neste trabalho, a partir de uma biblioteca de compostos furoxânicos e benzofuroxânicos pertencentes ao laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da UNESP Araraquara, realizou-se uma triagem fenotípica contra diferentes cepas de fungos e bactérias (Gram positivas e Gram negativas).

Além da busca de compostos contra *P. acnes*, a triagem fenotípica permitiu a caracterização do espectro de ação dos novos compostos. Os efeitos anti-inflamatórios dos compostos mais ativos foram ainda avaliados, pois é descrito, que a combinação de efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos podem ser úteis ao tratamento da acne.

Figura 1. Estrutura química dos núcleos furoxânicos e benzofuroxânicos.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de derivados sintéticos furoxânicos e benzofuroxânicos que possam se constituir como alternativa para o tratamento da acne vulgar.

2.2. Objetivos específicos

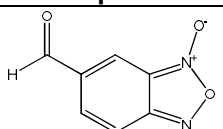
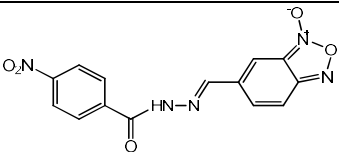
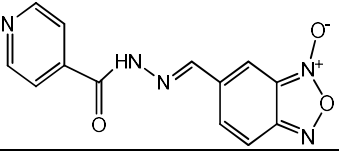
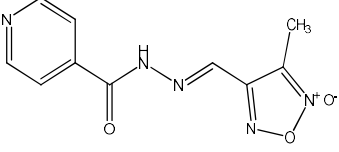
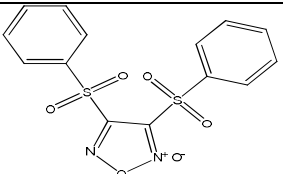
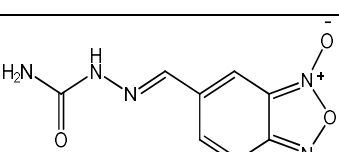
- Avaliar através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) a capacidade dos compostos em inibir *in vitro* a síntese das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β);
- Estudar *in vitro* a capacidade de liberação de óxido nítrico;
- Estudar *in vivo* através de estudos histológicos a atividade anti-inflamatória do derivado antimicrobiano mais ativo.

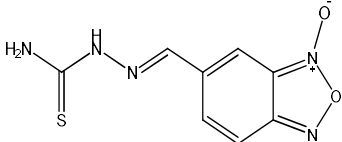
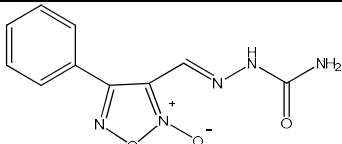
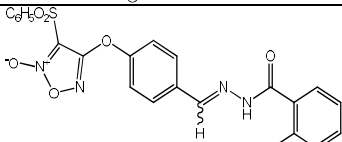
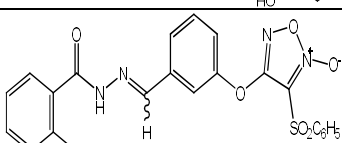
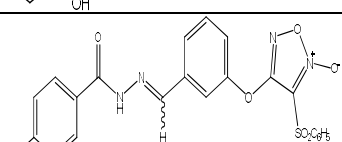
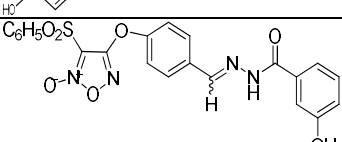
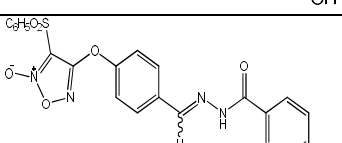
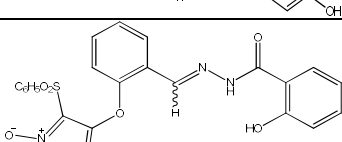
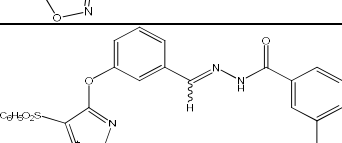
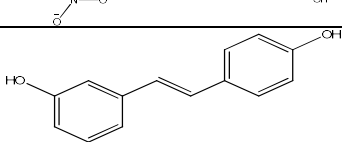
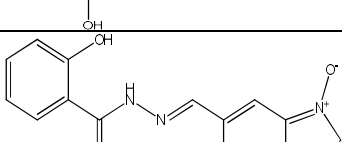
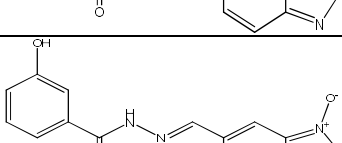
3. MATERIAL E MÉTODOS

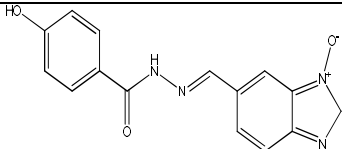
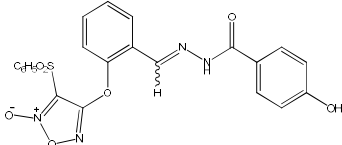
3.1. Compostos utilizados

Os compostos furoxanos e benzofuroxanos foram obtidos da biblioteca de moléculas do laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara. Foram utilizados 20 compostos derivados sintéticos furoxânicos e benzofuroxânicos, cuja a estrutura química e a nomenclatura são apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4. Estrutura química dos derivados benzofuroxanos e furoxanos testados nos ensaios

Compostos	Código	Nome IUPAC
	1	6-formilbenzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido
	2	(E)-6-((2-(4-nitrobenzoyl)hidrazona)metil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido
	3	(E)-6-((2-isonicotinoylhidrazona)metil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido
	4	(E)-4-((2-isonicotinoylhidrazona)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol
	5	3,4-bis(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido
	6	(E)-6-((2-carbamoylhidrazona)metil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido

	7	(E)-6-((2-carbamothioilhidrazona) metil) benzo [c] [1, 2,5] oxadiazol 1-óxido
	8	(E)-3-((2-carbamoilhidrazona) metil)-4-fenil-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido
	9	(E)-4-(2-((2-(2-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido
	10	(E)-4-(3-((2-(2-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido
	11	(E)-4-(2-((2-(4-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido
	12	(E)-4-(4-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido
	13	(E)-4-(4-((2-(4-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido
	14	(E)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido
	15	(E)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido
	16	(E)-5-(4-hidroxistiril) benzeno-1,3-diol
	17	(E)-6-((2-(2-hidroxibenzoil)hidrazona)metil)-2H-benzo[d]imidazol 1-óxido
	18	(E)-6-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil)-2H-benzo [d] imidazol 1-óxido

	19	(E)-6-((2-(4-hidroxi benzoi) hidrazona) metil)-2H-benzo[d]imidazol 1-óxido
	20	(E)-4-(3-((2-(4-hidroxi benzoi) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenil sulfoni)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

Todos os compostos usados nos ensaios foram previamente caracterizados por métodos analíticos, incluindo ressonância magnética nuclear (RMN), espectrofotometria na região do infravermelho e espectrometria de massas. A pureza dos compostos usados nos ensaios foi previamente determinada por cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE) e se mostrou superior a 98.5%.

3.2. Ensaios microbiológicos

O estudo do efeito antimicrobiano foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e no Núcleo da Protômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas as cepas padrão bacterianas e fúngicas conforme quadro abaixo:

Tabela 1. Cepas bacterianas e fúngicas

Cepas bacterianas		Cepas fúngicas		Antimicrobiano
Gram+	ATCC	Candidas/Cryptococcus	ATCC	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	<i>Candida albicans</i>	64548; 90028	Imipenen
<i>S. epidermides</i>	12228	<i>C. kruzei</i>	6258	Imipenen
<i>P. acnes</i>	2592	<i>C. glabrata</i>	90030	Cefazolina
		<i>C. tropicalis</i>	750	
Gram-	ATCC	<i>C. paropsilosis</i>	90018	Gram -
<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Cryptococcus neoformans</i>	56990	Aztreonan
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	<i>C. gatti</i>	9012	Aztreonan

Os meios de cultura utilizados para o crescimento dos microrganismos foram: caldo triptona de soja (TSB) para *S. aureus*, *S. epidermides*, *E. coli* e *P. auruginosa*. Caldo Sabouraud Maltose foi utilizado para *Cryptococcus*, caldo reforçado para *Clostridium* para *P. acnes*, RMPI para as espécies de *Candida*. Ágar sabouraud, Ágar Triptona de Soja e ágar bacteriológico na preparação dos meios de crescimento sólido do microrganismo. As preparações dos meios de cultura foram feitas seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.1. Preparo das soluções

Uma solução contendo 4% dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizada para diluir um miligrama (1 mg) de cada composto avaliado, obtendo concentração final de 100 µg/mL. Essa mesma solução de DMSO foi utilizada como controle negativo. A concentração de DMSO usada nos ensaios não teve nenhum efeito significativo sobre o crescimento dos microrganismos quando testada isoladamente conforme evidenciado pelos controles usados nos experimentos. Cada composto foi analisado utilizando diluições seriadas. Exceto o composto 15, que após demonstrar-se mais ativo foi analisado em concentrações maiores 50 a 0.03 µg/mL a fim de se determinar com precisão a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e são resultados de, no mínimo, três experimentos diferentes.

Os controles positivos foram também diluídos à concentração de 100 µg/mL, as exceções foram a anfotericina B e o fluconazol, respectivamente, 16 µg/mL e 130 µg/mL.

3.2.2. Preparo do inóculo para cepas bacterianas

No fluxo laminar o microrganismo foi inoculado em tubo de ensaio e incubado na estufa à temperatura de 35°C ± 2 por 18 a 24 horas. Para as cepas fúngicas, a temperatura foi de 37°C e o tempo de incubação do inóculo foi o mesmo para ambos microrganismos (bactéria e fungos). No caso do *P. acnes* foi usada uma jarra com o intuito de gerar um ambiente de anaerobiose propícia ao crescimento do microrganismo, pela inclusão de um

gerador de anaerobiose embebida em 30 mL de água destilada e na presença de uma fita indicadora que através da mudança de cor (azul – branco), confirmou o ambiente anaeróbico, após incubação da jarra a 37°C por 48 horas.

Figura 2. Jarra de anaerobiose.



Fonte: DELGADO, 2017.

3.2.3. Estoque e manutenção das cepas bacterianas

Todas as cepas foram repicadas periodicamente e mantidas a 8°C para o uso nos ensaios. Para o *P. acnes* a cepa bacteriana foi conservada em meio líquido acrescido de solução glicerol - salina e armazenada a - 5°C. Para os ensaios, as cepas foram repicadas em meio adequado e incubados conforme necessidade do microrganismo em tempos de incubação que variaram de 18 a 48 h.

3.2.4. Padronização da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 18 a 24 h para o *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Estas suspensões com o respectivo microrganismo foram lidas no espectrofotômetro a 580 nm de transmitância, e posteriormente diluídas em meio de cultura até obter uma transmitância de $25\% \pm 2$, correspondendo à concentração de aproximadamente 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônias por mililitros (UFC/mL). Posteriormente, dilui-se na porção de 1/20 em meio de cultura, obtendo-se suspensão de 5×10^5 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios. Para o caso do microrganismo *P. acnes* a suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura incubada por 48 horas mantida em condições de anaerobiose e obtendo-se uma suspensão equivalente a 2×10^6 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

3.2.5. Teste de Microdiluição

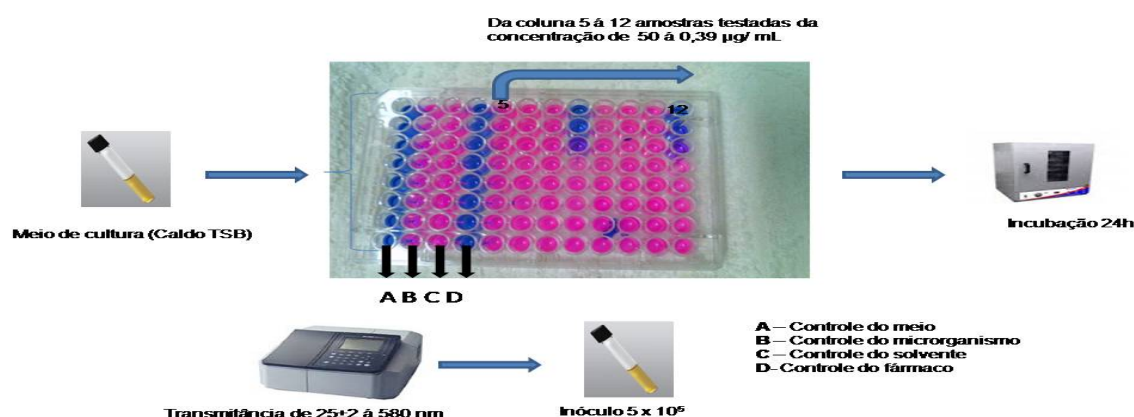
A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em caldo em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (V edição) e segundo a normativa M7-A6 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003) para as bactérias aeróbicas. Para a bactéria anaeróbica houve modificações na concentração final de bactérias, para a realização do ensaio, conforme descrito previamente (RYU *et al.*, 2015).

Em capela de fluxo laminar foram adicionados aos orifícios da microplaca estéril e descartável, 80 µL de meio de cultura. No primeiro orifício de cada coluna foi adicionada 100 µL da solução dos compostos na concentração de 100 µg/mL, foi homogeneizada e feita à diluição seriada das concentrações que variaram de 50 a 0,39 µg/mL (linha A até a G). Por fim, foi adicionada 20 µL da suspensão de microrganismo em cada orifício, exceto no orifício controle do meio de cultura. Na mesma placa foram realizados o controle de crescimento bacteriano, o controle dos compostos testados, o controle negativo (solvente) e o controle do fármaco referência antimicrobiano (controle positivo). Em cada microplaca foram testados 8 compostos. Os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos três vezes nas semanas

seguintes. As microplacas foram incubadas por 24 horas no caso das bactérias aeróbicas e a anaeróbica por 48 horas e em condições propícias.

A Figura 3 mostra esquematicamente o teste realizado na microplaca para as bactérias Gram-positivas e negativas aeróbicas.

Figura 3. Fluxograma para a determinação da CIM pelo método de microdiluição



Fonte: DELGADO, 2017.

3.2.6. Leitura dos testes

Após a incubação as microplacas foram submetidas à análise visual utilizando como revelador 0.03 mL de solução de resazurina (100 µg/mL), em cada orifício da microplaca. Após duas horas de incubação, a presença de cor azul representou ausência de crescimento, e a cor rosa indicou a presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

3.3. Avaliação da atividade antifúngica

3.3.1. Padronização da suspensão antifúngica

Inicialmente o fungo *Candida albicans* foi semeado em Agar *Sabouraud* dextrose e mantido a 37°C por 24 horas. Em seguida, de 3 a 5 colônias foram

inoculadas no caldo *Saboraud* dextrose fresco e mantido em agitação a 100 rpm a 37°C até a *C. albicans* alcançar a fase logarítmica. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄) a fim de remover o excesso de meio de cultura, e por fim as leveduras foram suspensas em PBS até obter uma concentração celular de 2.5×10^3 células/mL.

As mesmas condições foram aplicadas para o fungo *Cryptococcus neoformans* e *gatti*. Entretanto o tempo de crescimento do fungo foi de 48 horas e a temperatura de incubação foi de 30°C.

3.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de 96 orifícios de acordo com as metodologias da norma descrita na M27-A2 do CLSI (2002) para as espécies de *candida* e a M27- A3 do CLSI para as espécies de *Cryptococcus*. Cada orifício da microplaca foi preenchido com 100 µL de RPMI suplementado com 2% de glicose, exceto no controle do meio que é preenchido com 200 µL de RPMI (que é o volume final que deve conter cada poço). Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções dos compostos furoxanos e benzofuroxanos, solubilizados em DMSO e meio de cultura e realizada a diluição seriada com pipetador multicanal em concentrações que variaram de 0.39 a 50.00 µg/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 100 µL da suspensão de levedura em cada orifício da microplaca. Como controle positivo utilizou-se a anfotericina B na concentração de 16 µg/mL para as espécies de *Candida* e para as espécies de *Cryptococcus* o fluconazol na concentração de 100 µg/mL. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos compostos sintetizados e o controle negativo (solvente). As placas foram incubadas a 37° (*C. albicans*) ou 30° (*C. neoformans* e *C. gatti*) sob agitação por até 48 horas.

Após a incubação das microplacas, estas foram submetidas à análise visual em que presença da turvação ou a formação de aglomerados de células no fundo da cavidade da placa do meio indicaram o crescimento do

microrganismo e a não turvação (limpidez) indicou a inibição do microrganismo pelo composto testado.

3.4. Ensaios de liberação de óxido nítrico - determinação quantitativa de nitrito

O ensaio de detecção quantitativa de nitrito foi realizado pela Dra. Priscila Longhin Bosquesi da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Procedimento

A uma solução de DMSO contendo as moléculas de interesse (20 μ L), foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) 50 mM contendo 5 mM de L-cisteína. A concentração final em cada tubo foi de 10^{-4} M. Após 1 hora à temperatura de 37°C, 500 μ L de reagente de Griess foram adicionados e esta reação foi mantida por 10 minutos em temperatura ambiente para que ocorresse a reação. A absorvância foi medida em 540 nm usando espectrofotômetro UV-2501 PC Shimadzu. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito (NO_2^-) mol/mol $\pm$ desvio padrão, calculados pela relação entre o número de mols de NO_2^- detectados e o número de mols das moléculas avaliadas.

Preparação do tampão fosfato 50mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína

Conforme procedimento adotado, solubilizou-se 680 g de fosfato de potássio monobásico e 600 mg (5 mM) de cisteína em 80 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. Completou-se o volume, em balão volumétrico protegido da luz, para 100 mL com água destilada.

Preparação do reagente de Griess

Quatro gramas de sulfonilamida, 0,2 g de dicloridrato de N-naftil etilenodiamina, 20 mL de água destilada e 10 mL de ácido fosfórico 85% foram adicionados a balão volumétrico de 100 mL, sendo o volume final completado para 100 mL com água destilada.

Preparação da curva analítica

Soluções padrão de nitrito de sódio (10-80 nmol/mL) foram usadas para construção da curva analítica. A cada concentração da curva foi adicionado o reagente de Griess e esta mistura foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Ensaio com o PTIO

O PTIO ou o 2-(4-carboxifenil)-4, 4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido ou ainda (carboxi-PTIO) é um sequestrador de NO (CAO ; REITH, 2002) e foi usado no ensaio com o objetivo de avaliar a atividade dos compostos na presença de um sequestrador de NO.

3.5. Ensaios de citotoxicidade e de inibição da liberação de citocinas TNF- α e IL-1 β

Os ensaios sobre a viabilidade dos macrófagos foram realizados no laboratório de Imunologia do Departamento das Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.

3.5.1. Animais

Para o ensaio anti-inflamatório *in vitro* os animais foram obtidos do biotério central do CEMIB – Unicamp. Foram utilizados 12 camundongos adultos Swiss albino, machos, com 6 semanas de vida, enquanto que no ensaio anti-inflamatório *in vivo* foram utilizados 24 camundongos fêmeas da linhagem Balb c/ nude de seis semanas de vida provenientes do Biotério Central/FMUSP. Os animais foram mantidos em caixa plástica sobre ciclo claro-escuro (12h/12h) com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), no biotério do Departamento das Análises Clínicas e no biotério do Departamento de

Fármacos e Medicamentos respectivamente. Para realização destes ensaios, foi obtida aprovação prévia pelo Comitê de Ética e Pesquisa nos Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara, sob protocolo CEUA/ FCF/Ar nº 20/ 2016 (Anexo I) e CEUA/ FCF/CAr nº 53 / 2016 (Anexo II) respectivamente. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os guias atuais de cuidados de animais de laboratório e guias éticos para experimentos em animais e todos os esforços foram tomados a fim de minimizar o sofrimento.

3.5.2. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Foi inoculado 3 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% nos animais por via intraperitoneal. Após 72h deste procedimento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. O peritônio destes animais foi exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal, que foi lavado com 5,0 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril na porção mediana superior do abdômen, com auxílio de seringas e agulhas estéreis. Foi realizada uma leve massagem manual e as células do exsudato foram coletadas com a seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS e centrifugadas por 5 minutos em centrífuga a 2000 rpm a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI-1640 completo contendo 5% de PBS, β -mercaptoetanol (100 μ L), penicilina (200 μ L), estreptomicina (100 μ L) e soro fetal bovino (10 mL). O número de células foi determinado em câmara hemocitométrica de Neubauer utilizando o corante líquido de *Lazarus*. Ajustou-se as células à concentração ideal para cada ensaio em meio de cultura RPMI-1640-C. Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram distribuídas em placas e incubadas a 37 °C por uma hora em estufa com tensão constante de CO₂ para a aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram retiradas com lavagens com meio de cultura RPMI-1640.

3.5.3. Ensaios de viabilidade de macrófagos

Para a realização dos ensaios de viabilidade de macrófagos foi utilizada a técnica de MTT cuja metodologia foi descrita por MOSMAN em 1983. Utilizou-se microplacas de 96 cavidades, os quais foram incubados suspensões celulares (100 μ L por cavidade), na concentração de 5×10^6 células/mL durante uma hora para a aderência celular. O composto testado foi diluído em 10 μ L de DMSO e meio RPMI, obtendo concentração de 200 μ g/mL, a qual foi usada nos ensaios. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido; adicionou-se a cada orifício 100 μ L de solução de MTT na concentração de 1g/mL. A placa foi incubada por 3 horas a 37°C. Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido e 100 μ L de álcool isopropílico ou SDS foram adicionados a cada orifício.

Como controle positivo foi utilizado o LPS 1 μ g/mL (300 μ L) e como controle negativo, o meio de cultura RPMI-1640-C (300 μ L). Utilizou-se no teste apenas o composto que apresentou melhor valor de CIM contra o *P. acnes* (*E*)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido- composto 15). A solução do composto foi preparada na concentração de 200 μ g/mL. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A IC₅₀ concentração capaz de matar 50% das células foi calculada a partir da regressão linear dos valores obtidos.

3.5.4. Determinação quantitativa da inibição das citocinas

Os sobrenadantes do meio de macrófagos foram coletados, aliquotados em *eppendorfs* e estocados em *freezer* a -80°C. Em seguida, procedeu-se a determinação das citocinas através do teste imunoenzimático ELISA de captura. Quantificou-se as citocinas TNF- α e IL-1 β . Os procedimentos dos kits da *BD Bioscience* foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. As placas de 96 orifícios foram adsorvidas em 100 μ L do anticorpo de captura monoclonal, anti-citocina de camundongo, na concentração apropriada a cada citocina em PBS pH 7,0 e incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com

solução tampão de lavagem (PBS pH 7,0 contendo 0,05% de *Tween* 20) e bloqueadas com 200 µL/cavidade de PBS pH 7,0 contendo 10 % de diluente de ensaio à temperatura ambiente por 1 hora. Após incubação, as placas foram lavadas novamente 3 vezes com solução tampão de lavagem e em seguida foram adicionados 100 µL por cavidade do padrão das citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL por cavidade de anticorpo anti-citocina de camundongo marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina no diluente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 2 horas a temperatura ambiente e lavadas mais 3 vezes, seguidamente foram adicionadas 100 µL do conjugado peroxidase-estreptavidina (diluído a concentração adequada para cada citocina em diluente de ensaio) em cada cavidade e incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período as placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem e em seguida adicionadas 100 µL do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂ a cada cavidade. Por fim a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2N (solução *stop*) a cada cavidade e a absorvância foi lida em 450 nm com filtro de referência em 570 nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas. As concentrações de cada citocina foram quantificadas através de curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas.

4. Ensaio anti-inflamatório *in vivo*

4.1. Ensaio *in vivo*

Foram utilizados camundongos Balb/c nudes, uma vez que camundongos sem pelos são bons modelos para estudos de cicatrização de lesões de pele, como por exemplo, aquelas associadas à acne (ARAUJO, 2014). Neste estudo foi inoculado por via subcutânea no dorso do animal 20 µL de uma suspensão bacteriana do *Propionibacterium acnes* (ATCC 2592) (10⁹ Unidades Formadoras de Colônias - UFC) previamente reativados em

condições de anaerobiose. Após 2 dias, foi observada a presença de lesão do microrganismo. Constatada a presença das lesões, realizamos o tratamento aplicando por via tópica a formulação contendo o composto mais ativo (15). Os controles positivos foram realizados com dois produtos comerciais (creme Acnezil® e o gel Clean & Clear®) e como controle negativo a formulação creme base. As análises macroscópicas foram realizadas medindo diariamente com paquímetro, já as análises histológicas foram realizadas para determinar o grau e tipo de inflamação. Ao final do tratamento (14 dias) os animais foram sacrificados e as lesões de aproximadamente 0.5 mm de diâmetro foram removidas pela retirada da pele.

4.2. Grupos de animais e formulações

Os animais foram divididos em 6 grupos contendo 4 animais cada. Após indução da inflamação os animais foram tratados com cada uma das formulações conforme descrito no Quadro 5.

Quadro 5. Formulações testadas.

Grupos	Formulações
Grupo 01	Creme base (5 g)
Grupo 02	Creme base + Composto 15 na concentração de 2%
Grupo 03	Creme base + Composto 15 na concentração de 5%
Grupo 04	Creme comercial Acnezil® contendo 5 % de peróxido de benzoíla
Grupo 05	Gel comercial Clear & Clean® contendo 3% do AS
Grupo 06	Gel associado a 2% do composto 15 + 3% de AS

As formulações do gel (Quadro 7) e creme (Quadro 8) foram preparadas no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, com colaboração do Prof. Dr. Marcos Corrêa. Para os experimentos *in vivo*, foi utilizado aproximadamente 48 mg de cada formulação no tratamento das lesões nos diferentes camundongos e foi medido o pH das formulações (quadro 9).

Quadro 6. Constituintes da formulação gel

Constituintes	Concentração
Hidroxietilcelulose (natrosol)	2%
Detóxido de glicol (Trivalin)	40%
Ácido salicílico	3%
Composto 15	2%
Água qsp	20 g

Técnica de preparação do gel

A quantidade adequada de AS (3%) e o composto 15 (2%) foi dissolvida em trivalin. Posteriormente, foi acrescentado água e a mistura foi aquecida em banho Maria (60 °C). Em seguida, acrescentou-se o natrosol e a mistura foi aquecida novamente até obtenção de um gel.

Creme Base

Foram utilizados os constituintes listados no Quadro 8. Para as formulações contendo o composto ativo (15) a 2 e 5%, houve solubilização previa deste em trivalin e posterior incorporação à emulsão.

Quadro 7. Constituintes da formulação

Constituintes	Concentração
Óleo de girassol, ácido poliacrílico e selitil ácido cáprico (Emulfeel)	2%
Adipato de Dibutila	2%
T.A. Cáprico C.	3%
Chemynol	3%
EDTA Na ₂	3%
Detóxido de glicol (Trivalin)	2%
Água qsp	100 g

Quadro 8. pH das formulações testadas

O pH das formulações foram as listadas no quadro abaixo:

Formulações	pH
Creme base	5
Creme á 2% do ativo	5
Creme á 5% do ativo	5
Gel a 2% ativo e 3% AS	3

4.3. Estudo histopatológico

O processamento das peças foi realizado no Laboratório de Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia – UNESP – Araraquara, com colaboração do Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade. Foi analisada a pele de todos os animais avaliados no ensaio. Os órgãos foram removidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada por um período mínimo de duas horas e máximo de 48h horas. Após este período, os órgãos foram transferidos para álcool 70% até o processamento histológico.

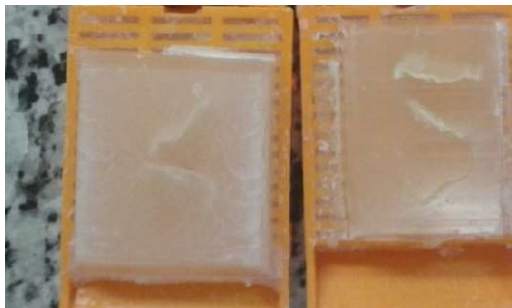
4.3.1. Processo de desidratação e parafinização

O processamento histológico envolve a desidratação (concentrações crescentes de álcool) dos órgãos com posterior substituição por xilol (crescentes concentrações) e, por fim, parafina de inclusão. O processo todo se inicia com a lavagem dos tecidos com a finalidade de remover resíduos de formol (12 horas em água corrente).

4.3.2. Cortes histológicos - micrótomo

Os tecidos, devidamente emblocados em parafina (Figura 4), foram seccionados em micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. Na sequência, as lâminas obtidas foram mantidas em estufa a 60°C por 12 horas com o objetivo de remover o excesso de parafina. Os órgãos foram analisados como um todo por meio de cortes seriados de 3 mm de diâmetro.

Figura 4. Cortes emblocados em parafina



Fonte: Delgado, 2017.

4.3.3. Processo de coloração histopatológica

Duas colorações foram realizadas a coloração padrão para a análise histopatológica dos órgãos foi a de hematoxilina & eosina (H&E) e a de picrosirios, específica para colágenos. Os dois processos envolvem a retirada da parafina utilizando xilol, substituição por álcool e posterior reidratação (desparafinização). No caso da coloração de picrosirios cora em solução de *Sirius red*, contracorando com hematoxilina de Harris. Desidratação novamente com etanol absoluto e clarifica-se em xileno. A montagem da lamínula é feita usando resina e lamínula. Na coloração por H&E, após desparafinização os cortes foram desidratados novamente passando pelo xilol, por fim realizou-se, a montagem das lâminas utilizando Permont (R) e lamínulas de vidro.

4.3.4. Análises histopatológicas

Os tecidos foram analisados em objetivas de 10, 20x e 40x a fim de avaliar a presença de resposta inflamatório. A inflamação foi avaliada quanto a presença de infiltrado inflamatório de superfície e do tecido conjuntivo que foi classificado quanto ao tipo em (agudo, misto e crônico) e quanto a

intensidade em (leve, moderado e intenso). Foi analisado também as alterações verificadas no colágeno, a presença de cisto, o aumento da camada espinhosa da epiderme (acantose) e a presença de comedo aberto caracterizando a inflamação presente. As alterações histológicas em cada grupo foram avaliados semiquantitativamente com base numa escala de 3 pontos:

Alteração muito frequente em todos os animais (++++), alteração relativamente comum em todos os animais (+++) alteração rara (++) verificou uma alteração em alguns animais (+) e uma alteração rara/ausente em um grupo (+/-).

5. Análise estatística dos resultados

Os dados dos resultados obtidos foram comparados usando o teste de ANOVA seguida pelo teste de Dunnet. Os testes estatísticos foram realizados com o *software* estatístico PRISMA e considerados estatisticamente significantes valores de $P < 0.05$.

6. Resultados e Discussão

A terapia atual para o tratamento da acne ainda apresenta limitações haja visto a complexidade de fatores envolvidos na doença. Na maioria dos casos, a efetividade do tratamento só pode ser avaliada após 6 a 8 semanas, e geralmente, no início da terapia a doença pode ser agravada. Associado a estes aspectos, o desenvolvimento de cepas *P. acnes* resistentes aos antibióticos atuais tornam o quadro mais complexo, levando à baixa resolubilidade da doença (NEVES et al, 2015). Neste aspecto, a busca de novos fármacos que atuem por mecanismos múltiplos de ação, e que apresentem, por exemplo, associação de efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios parece ser uma alternativa promissora. Neste trabalho, foram avaliados os efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e a capacidade de liberação de óxido nítrico de compostos furoxanos e benzofuroxanos. A apresentação dos resultados e a discussão de cada uma dessas atividades será realizada separadamente, a seguir.

Atividade antimicrobiana

Neste trabalho, através de uma triagem fenotípica contendo 20 moléculas obtidas da biblioteca de moléculas do laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara foi investigado o efeito antimicrobiano contra *P. acnes*. Além disso, a fim de investigar o espectro de ação dos novos compostos, também foi realizado ensaios contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

A atividade antimicrobiana dos compostos foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima, cujo os valores estão expressos na Tabela 1. Os compostos foram avaliados pela técnica de microdiluição em placas. A técnica de microdiluição é uma técnica amplamente utilizada e é extremamente vantajosa, uma vez que se trabalha com quantidades mínimas. Além disso, é uma técnica de baixo custo, simples, rápida e 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, é de alto rendimento, permitindo determinar a CIM dos produtos em estudo que é definida como a menor concentração da substância sob estudo capaz de inibir o crescimento de 90% dos microrganismos (ELOFF et al., 1998).

A resazurina usada na revelação dos ensaios é um indicador de oxidação-redução utilizado para a avaliação do crescimento celular, especialmente em vários ensaios de citotoxicidade. É um corante azul não fluorescente e não tóxico, que se torna rosa e fluorescente quando reduzido à resorufina por oxidoredutases dentro de células viáveis. Por sua vez, a resorufina é reduzida para a hidroresorufina (incolor e não fluorescente) (SARKER et al., 2007). No entanto, só se quantifica a redução da resazurina à resorufina.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos 20 compostos furoxanos e benzofuroxanos avaliados contra as bactérias

Compostos	<i>S.aureus</i> (µg/mL)	<i>S.epidermides</i> (µg/mL)	<i>P. acnes</i> (µg/mL)	<i>E.coli</i> (µg/mL)	<i>P.aeruginosa</i> (µg/mL)
1	>50.0	50.0	50.0	> 50.0	>50.0
2	>50.0	>50.0	25.0	>50.0	>50.0
3	50.0	>50.0	50.0	>50.0	>50.0
4	>50.0	>50.0	50.0	>50.0	>50.0
5	50.0	50.0	>50.0	>50.0	>50.0
6	>50.0	50.0	>50.0	>50.0	>50.0
7	>50.0	50.0	>50.0	>50.0	>50.0
8	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
9	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
10	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
11	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
12	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
13	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
14	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
15	>50.0	>50.0	0.2	>50.0	>50.0
16	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
17	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
18	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
19	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
20	25.0	12.5	>50.0	>50.0	> 50.0
Controles	<0.4	<0.4	0.4	<0.4	<0.4
	(imipenen)	(imipenen)	(cefazolina)	(aztreonam)	(aztreonam)

Os resultados da Tabela 1 expressam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cada cepa bacteriana (Gram-positiva e Gram-negativa)

testada. Em todos os experimentos os controles: positivo, meio de cultura, crescimento microbiano e solventes com e sem o inóculo se apresentaram de maneira adequada e dentro das expectativas. Os resultados de CIM mostraram que dos 20 compostos testados contra as bactérias Gram-positivas e negativas apenas 9 foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos testados.

Os compostos 1,3 e 4 apresentaram um valor de CIM de 50 µg/mL contra o *P. acnes*. Já o composto 2, apresentou valor de CIM de 25 µg/mL. O composto mais ativo, entretanto, foi o [(E)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil)hidrazona)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol-2-óxido] (composto 15) que apresentou o surpreendente valor de CIM de 0.2 µg/mL. O valor de CIM para o composto 15 é inferior ao valor de CIM encontrado para o fármaco controle a cefazolina, cujo valor encontrado foi de 0.4 µg/mL. Esses dados permitem inferir que o composto 15 é um potente protótipo ativo contra *P. acnes*.

Quanto às outras cepas bacterianas, se identificou para *S. aureus* os compostos 3, 5 e 20 com valores de CIM compreendidos entre 25-50 µg/mL. O composto 20 foi o mais ativo com valor de CIM igual a 25 µg/mL. Embora sejam interessantes protótipos, para posterior modificação molecular, ainda apresentam valores muito superiores ao controle imipenem utilizado (CIM < 0.39 µg/mL). No trabalho de Osório e colaboradores (2011), foi avaliada a atividade antimicrobiana de 10 hidrazonas contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25922, e verificou-se que as cepas ativas apresentaram valores de CIM de 62.5 e 15.62 µg/mL, respectivamente para as hidrazonas (E)-N'-2-[(5-nitrofurano-2-il)metileno]-benzohidrazida e a (E)-3, 4,5-trimetoxi-N'-[(5-nitrotiofen-2-il)metileno]-benzohidrazida. Esses resultados são semelhantes ao composto 20 do nosso estudo, que foi ativa contra a mesma cepa na concentração de 25 µg/mL.

Contra *S. epidermidis*, identificou-se como sendo ativos os compostos 1, 5, 6, 7 e 20 com valores de CIM compreendidos entre 12.5-50.0 µg/mL. O composto mais ativo foi o 20 com valor de CIM igual a 12.5 µg/mL. Interessantemente, esse composto também foi o mais ativo contra *S. aureus*, outra espécie Gram-positiva. Esse conjunto de dados sugere o potencial do

composto 20 como protótipo antibacteriano, principalmente contra cepas gram-positivas (exceto *P. acnes*).

Os compostos avaliados não apresentaram atividade contra cepas gram-negativas de *E.coli* e *P. aeruginosa*, e os valores de CIM encontrados para todas as moléculas foi $> 50 \mu\text{g/mL}$.

Os compostos avaliados foram capazes de inibir apenas microrganismos Gram positivos. Especula-se que esta atividade esteja relacionada à estrutura da membrana celular, já que na estrutura da bactéria Gram negativa que não teve atividade, a membrana celular serve de barreira seletiva que controla a passagem de algumas substâncias, uma vez que a parede celular é mais complexa e formada por menos peptidoglicanos (BROWN et al., 2015).

Os derivados furoxânicos são compostos geradores de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) e têm sido amplamente estudados como compostos com propriedades bioativas, principalmente antimicrobianas (JOVENÉ et al., 2013; AMIR et al., 2015). Especificamente, acredita-se que o efeito antimicrobiano ocorra devido à liberação do NO. Este óxido nítrico liberado é capaz de causar danos na membrana celular, quebras e lesões no material genético e aumento do estresse oxidativo na célula fúngica ou bacteriana, podendo promover assim a morte celular (HWANG et al., 1998). A fim de estudar a contribuição do NO na atividade do composto 15 foi realizado um ensaio em que esta molécula foi associada ao PTIO, e incubada com o microrganismo em concentrações equimolares. O PTIO é conhecidamente uma substância com capacidade de sequestrar óxido nítrico do meio. Inicialmente, a hipótese era de que se o mecanismo de ação do composto 15 fosse exclusivamente pela doação de NO, esta atividade seria abolida na presença do PTIO. Entretanto, observa-se que, ao invés de abolir a atividade, houve apenas redução desta, ou seja, para o composto 15 a CIM inicial de $0.2 \mu\text{g/mL}$ passa a ser $0.4 \mu\text{g/mL}$, na presença de PTIO (Tabela 3).

Tabela 3- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do ensaio do *P. acnes* na ausência/presença do PTIO

Compostos	CIM (ug/mL)
Composto 15	0.20
Composto 15 + PTIO	0.40
Cefazolina	0.40

Este resultado demonstra claramente que o NO tem efeito importante no mecanismo de ação contra *P. acnes*, mas o efeito antimicrobiano não deve ser exclusivamente por conta deste mediador. Esses dados são coerentes, haja visto que outros derivados furoxânicos contendo o mesmo grupo fenilsulfonil do composto 15, como por exemplo, compostos 9-14, não apresentaram efeito significativo contra *P. acnes*. O grupo fenilsulfonilfuroxano é conhecido como um potente doador de NO. Esperaria-se que todos os compostos contendo esse grupo fossem ativos contra o *P. acnes*, caso o mecanismo fosse apenas a doação de NO.

Assim, esse conjunto de resultados permite inferir que o mecanismo de ação do composto 15, embora necessite de NO, não é exclusivamente dependente deste mediador. Desta forma, estudos adicionais são necessários para desvendar o mecanismo de ação seletivo deste composto contra *P. acnes*.

Após a determinação do efeito antibacteriano, se pretendeu avaliar a capacidade dos compostos em inibir o crescimento fúngico, especialmente contra espécies de *Candida*. Para tal, os compostos foram testados contra *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e duas cepas de *Candida albicans* (Tabela 3). Devido a problemas relacionados à solubilidade, avaliou-se apenas 13 dos 20 compostos pertencentes à biblioteca inicial. Além da questão da solubilidade, levou-se em consideração o efeito antibacteriano previamente caracterizado, a fim de selecionar os compostos mais promissores.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos 13 compostos analisados para cepas fúngicas (espécies de *Candida*).

Compostos	<i>C.glabrata</i> (µg/mL)	<i>C.albicans</i> ¹ (µg/mL)	<i>C.albicans</i> ² (µg/mL)	<i>C. krusei</i> (µg/mL)	<i>C.parapsilosis</i> (µg/mL)	<i>C.tropicalis</i> (µg/mL)
1	12.5	3.1	12.5	0.8	1.5	6.2
2	>50.0	>50.0	>50.0	25.0	>50.0	>50.0
9	37.5	>50.0	>50.0	50.0	50.0	> 50.0
10	37.5	>50.0	>50.0	50.0	50.0	> 50.0
11	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
12	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
13	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
14	37.5	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
15	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0
17	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
18	>50.0	>50.0	50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
19	>50.0	>50.0	50.0	25.0	>50.0	> 50.0
20	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	>50.0	> 50.0
Anf.B						0.2

¹*Candida albicans* ATCC 64548; ²*Candida albicans* ATCC 900278

Os resultados de CIM da atividade antifúngica dos 13 compostos testados mostraram que 7 deles foram capazes de inibir pelo menos o crescimento de um microrganismo.

Das moléculas avaliadas, o composto 1 que já tinha apresentado atividade antimicrobiana foi capaz de inibir em baixas concentrações o crescimento de todas as cepas fúngicas testadas. A CIM do composto 1 variou de 0.78 – 12.5 µg/mL nas cepas fúngicas, sendo este mais ativo contra *Candida krusei* (CIM = 0.8 µg/mL) e *Candida albicans* (CIM = 3.1

µg/mL). Apesar de ser um interessante protótipo, a labilidade metabólica do grupo aldeído presente nesta estrutura precisa ser estudada.

Contra *C. glabrata* os compostos mais ativos 1, 9, 10 e 14 apresentaram CIM variando entre 12.5 e 37.5 µg/mL. Contra *C. albicans*, as duas cepas avaliadas apresentaram valores de CIM igual ou superior a 50 µg/mL, demonstrando assim, baixo efeito contra essa espécie. Contra *Candida krusei* os compostos mais ativos 1, 2 e 19 apresentaram CIM variando entre 0.8 e 25.0 µg/mL. Os compostos 9 e 10 apresentaram para esta espécie valor de CIM igual a 50.0 µg/mL. Contra *Candida parapsilosis* os compostos mais ativos 1, 9 e 10 apresentaram CIM variando entre 1.5 e 50.0 µg/mL. Finalmente, contra *C. tropicallis* os compostos não foram ativos, a exceção do composto 1.

De maneira geral, para todos os compostos ativos foi observado atividade antifúngica modesta e muito superior ao controle anfotericina B usado, que apresentou CIM de 0.2 µg/mL. Os valores encontrados para anfotericina B estão de acordo com os dados disponíveis na literatura, uma vez que a norma M27 – A2 do CLSI descreve para *Candida spp.* valores de CIMs da anfotericina B variando entre 0.2 a 1.0 µg/mL.

Nossa hipótese preliminar das diferenças na atividade observadas entre as bactérias e a *Candida* seja em razão das diferenças estruturais entre essas células. Neste aspecto, os compostos parecem possuir atividade antibacteriana melhor que a atividade antifúngica. Apesar destes resultados, decidiu-se avaliar a atividade antifúngica contra espécies do gênero *Cryptococcus*. Esta espécie de fungo apresenta em sua estrutura uma cápsula que impede que pequenas quantidades de substâncias, a exemplo dos fármacos, atravessem e exerçam sua atividade. A criptococose é uma micose sistêmica causada por duas espécies do basidiomiceto encapsulado, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, em que a cápsula é constituída essencialmente por polissacarídeos (SEVERO et al., 2009).

A Tabela 5 mostra os valores de CIM encontrados para os compostos avaliados.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos 13 compostos avaliados contra cepas fúngicas da espécie de *Cryptococcus*

Compostos	<i>C. neoformans</i> (µg/mL)	<i>C.gatti</i> (µg/mL)
1	>50.0	>50.0
2	>50.0	>50.0
9	>50.0	>50.0
10	>50.0	>50.0
11	>50.0	>50.0
12	>50.0	>50.0
13	>50.0	>50.0
14	>50.0	>50.0
15	>50.0	>50.0
17	>50.0	>50.0
18	>50.0	>50.0
19	>50.0	>50.0
20	>50.0	>50.0
fluconazol	65.0	65.0

Quanto à CIM referente dos 13 compostos testados contra as cepas fúngicas de *Cryptococcus neoformans* e *Gatti* verificou-se que nenhum dos compostos testados nos ensaios foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos nas concentrações usadas. Isso talvez seja devido ao fato que, a estrutura da cápsula fúngica possa impedir a entrada desses compostos na célula. Do mesmo modo, o antifúngico fluconazol só foi capaz de inibir o crescimento fúngico na concentração de 65 µg/mL. Experiências com os testes descritos na norma M27 – A3 do CLSI indicam que as CIMs do fluconazol é maior que 65 µg/mL.

Determinação quantitativa de nitrito – Ensaio de liberação de óxido nítrico

O óxido nítrico, sob condições estáveis de temperatura e pressão, encontra-se na forma gasosa. Além disso, devido ao caráter radicalar, apresenta alta reatividade o que dificulta a sua detecção. Quando em solução, rapidamente reage com a água e se oxida a nitratos e nitritos (DUSSE et al., 2003). Assim, a quantificação de nitrito presente no meio é uma maneira indireta de se avaliar a capacidade doadora de óxido nítrico das moléculas obtidas.

Este ensaio foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Sorba e colaboradores (SORBA et al., 1997). Do ponto de vista mecanístico, os íons nitrito formados no meio reagem com a sulfanilamida presente no reagente de Griess, formando diazo compostos, através do acoplamento com o dicloridrato de *N*-naftiletilenodiamina, o que leva a um composto de coloração amarelo-avermelhada que pode ser quantificado por espectrofotometria no ultravioleta no comprimento de onda de 540 nm.

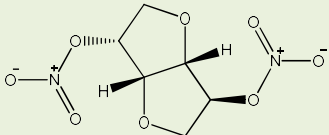
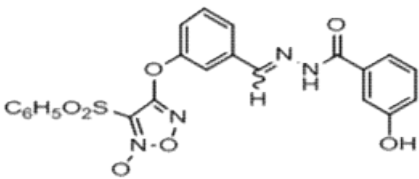
Neste experimento, foi avaliada a capacidade de doação de NO pelo composto [(*E*)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol-2-óxido (composto 15), identificado como sendo o mais ativo no experimento contra *P. acnes*. Nossa hipótese é a de que o efeito antibacteriano contra *P. acnes* seja em parte, devido à capacidade de liberação de NO por parte deste composto. O aumento dos níveis de NO poderiam promover estresse oxidativo, fazendo o composto atuar de maneira semelhante ao peróxido de benzoíla.

O peróxido de benzoíla (PB) é um agente antibacteriano lipofílico, eficaz contra *P. acnes*. No entanto, ele tem um valor alto de concentração inibitória mínima (CIM: 150 µg/mL) (RYU et al, 2015). Friedman e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento do *P. acnes* com PB causa alguns danos para a parede celular e membrana citoplasmática, tais como perda da estrutura da parede celular normal e de agrupamento de componentes lipofílicos da membrana em gotículas. Esta constatação sugere que a atividade bactericida de PB contra *P. acnes* é devido à ruptura direta

da parede celular bacteriana e da membrana citoplasmática por radicais livres gerados a partir do PB.

A Tabela 6 mostra os dados expressos em porcentagem de nitrito para o composto 15 e o controle dinitrato de isossorbida (DNS) em ensaio realizado na presença de cisteína.

Tabela 6. Liberação de óxido nítrico pelo composto [(E)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol-2-óxido] (composto 15) na presença de cisteína (5mM) expresso em porcentagem (n =3).

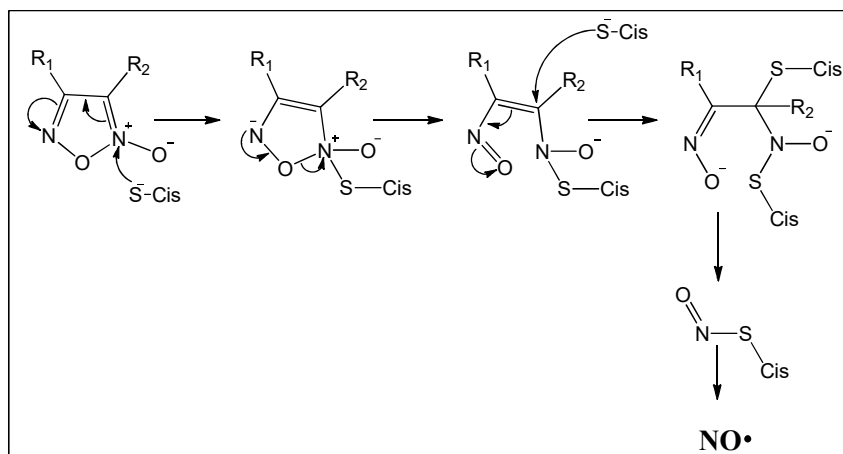
Compostos	% nitrito (mol/mol) $\pm$ desvio padrão
 Dinitrato de isossorbida (DNS)	9.95 $\pm$ 0.8
	20.1 $\pm$ 1.7

As concentrações de nitrito foram determinadas através da curva analítica ($y = 0,0319x + 0,0301$; $R^2 = 0,9962$) usando espectrofotômetro UV/visível na concentração compreendida entre 0.5-80 nmol/L, utilizando o Reagente de Griess. Dos resultados é possível observar que o controle dinitrato de isossorbida (DNS) apresenta capacidade de doação de óxido nítrico de 9.95%; enquanto o derivado furoxânico (composto 15) apresenta 20.1%.

Estes dados confirmam a hipótese de que este derivado furoxânico pode atuar como doador de NO no meio. Ensaios realizados na ausência de cisteína demonstraram que o composto não foi capaz de liberar NO. Dessa forma, o mecanismo de liberação de NO, parece ser dependente de cisteína no meio. De fato, Cerecetto e colaboradores (1999), propuseram que a liberação de óxido nítrico pelos furoxanos acontece a partir do ataque

nucleofílico do enxofre presente no resíduo de cisteína ao átomo de nitrogênio da subunidade *N*-óxido do anel furoxânico, conforme representado na Figura 5 (CERECETTO et al., 1999).

Figura 5. Mecanismo proposto para doação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos.



Fonte: Adaptado de SANTOS, 2009.

Atividade anti-inflamatória: ensaios de viabilidade celular e inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias

Ensaio de viabilidade celular usando macrófagos

A fim de caracterizar o efeito citotóxico do composto 15 foi realizado o ensaio de viabilidade celular usando macrófagos murinos. Esta foi realizada nas seguintes concentrações, em ordem decrescente: 100, 50, 25, 12.5; 6.25; 3.12; 1.56; 0.78; 0.39 e 0.19 e 0.09 µg/mL.

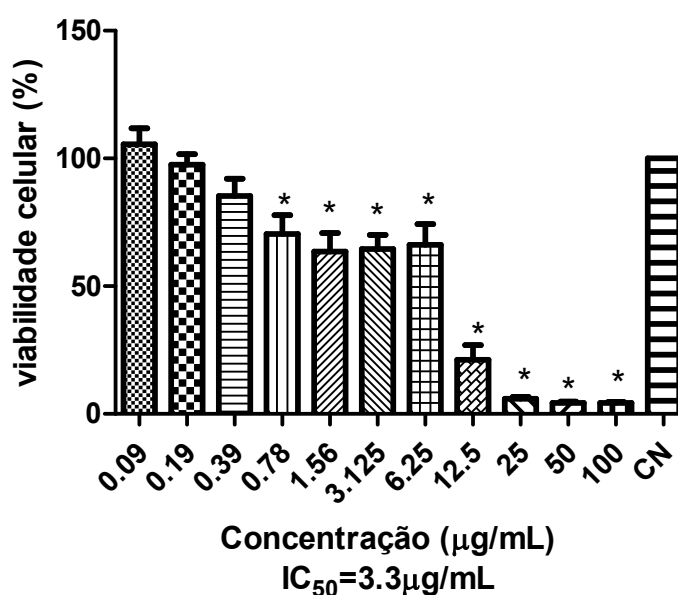
A viabilidade celular é um parâmetro muito importante no desenvolvimento de novos fármacos, e neste ensaio o objetivo foi avaliar a capacidade do composto 15 não causar citotoxicidade em células eucariotas.

Para o experimento, foi usado como revelador o MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromidotetrazolium). O fundamento do ensaio, baseia-se na redução do sal de tetrazolium MTT em formazan, que apresenta coloração diferente e pode assim, ser lido visualmente. Essa reação consiste

na clivagem do MTT que acontece somente nas células vivas e metabolicamente ativas. A quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células presentes em uma população celular homogênea. A reação metabólica é feita por mitocôndrias ativas o que propicia a medição da sobrevivência e proliferação celular (MOSMANN, 1983).

A Figura 6 representa os valores da viabilidade celular de macrófagos tratados com o composto 15 nas concentrações de 0.09 a 100 µg/mL. O controle negativo (CN) utilizado foi o meio de cultura RPMI. Os resultados foram expressos em percentual (%) como média $\pm$ desvio padrão e valores de $p < 0,05^{***}$ expressos como diferentes em relação ao CN.

Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos murinos na presença do composto 15.



Fonte: DELGADO, 2017.

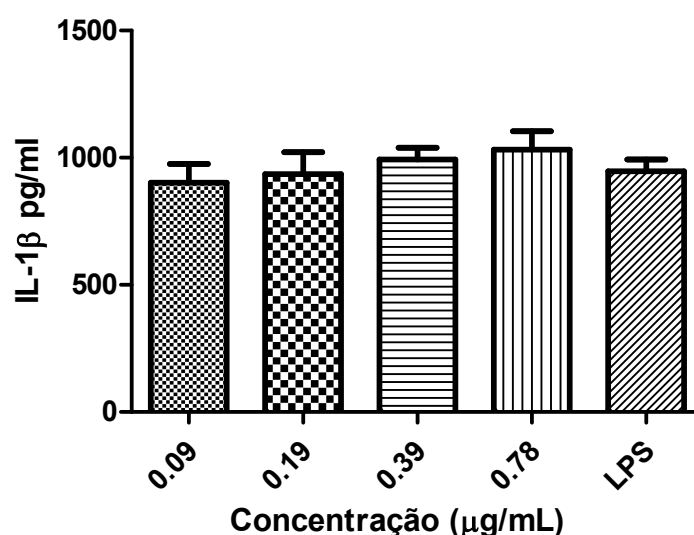
Através da curva dose-resposta foi possível caracterizar o IC₅₀ do composto como sendo 3.3 µg/mL. Na concentração de 0.09 µg/mL, observamos viabilidade de 106%. Viabilidades superiores a 70% foram identificadas nas concentrações 0.09 (106%); 0.19 (97.5%), 0.39 (85.3%) e 0.78 (70.4%) µg/mL. Assim, nos experimentos de dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β , foi limite de viabilidade celular aceitável os valores acima de 70%. O

restante das concentrações, principalmente as que variaram de 1.56 a 100 µg/mL, apresentaram-se tóxicas para as células de macrófagos.

Avaliação de liberação das citocinas IL-1 β e TNF- α

O composto 15 foi avaliado quanto à sua capacidade de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-1 β e TNF- α . Observou-se que o composto 15 não inibiu a produção das citocinas testadas (Figuras 7 e 8).

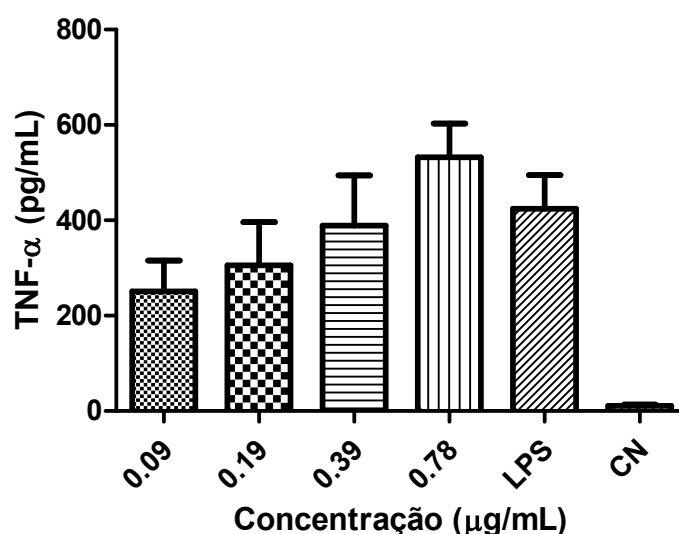
Figura 7. Quantificação de liberação da citocina IL1- β pelo composto 15 nas concentrações de 0.78; 0.39; 0.19 e 0.09 µg/mL. Resultados expressos em pg/mL como média $\pm$ desvio padrão.



Fonte: DELGADO, 2017.

É possível observar na figura 7 que não houve diferença significativa das concentrações testadas em relação ao controle positivo (LPS), logo a substância testada não inibiu a produção da citocina IL1- β .

Figura 8. Quantificação de liberação da citocina TNF- α pelo composto 15 nas concentrações de 0.78; 0.39; 0.19 e 0.09 $\mu\text{g/mL}$. Resultados expressos em pg/mL com média $\pm$ desvio padrão.



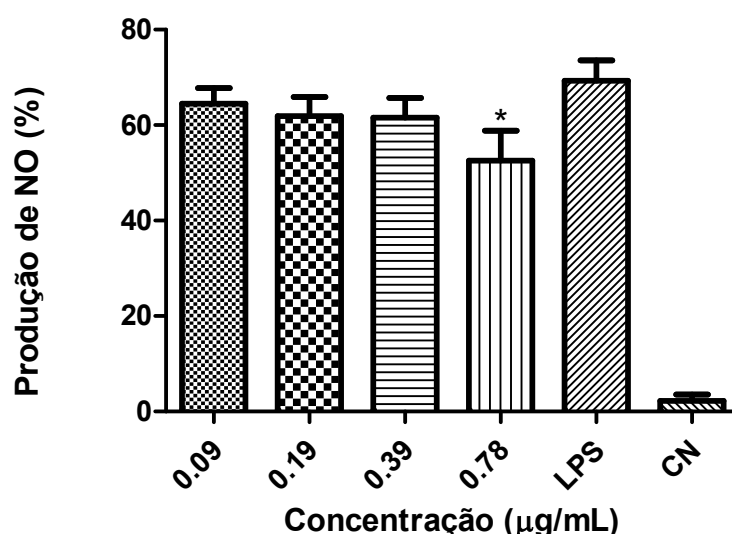
Fonte: DELGADO, 2017.

Na representação do gráfico (Figura 8), podemos observar que, assim como para a citocina IL1- β , não há diferença significativa das concentrações testadas em relação ao controle positivo (LPS), logo a substância testada também não inibiu a produção da citocina TNF- α . Para as duas citocinas testadas não houve inibição por parte do composto, no entanto, outras citocinas pró-inflamatórias, tais como o IL-8 pode ser estimulado pelo *P. acnes* na resposta imune. Portanto a não inibição destas duas citocinas não é conclusiva quanto à atividade anti-inflamatória do composto testado.

Avaliação do NO quanto a capacidade de inibição

O composto 15 também foi avaliado quanto à capacidade de inibição de liberação de NO por macrófagos (Figura 9).

Figura 9.Quantificação da produção do NO pelo composto 15 nas concentrações de 0.78 a 0. 09 $\mu\text{g/mL}$, expressos em porcentagem de produção de NO.



Fonte: Delgado, 2017.

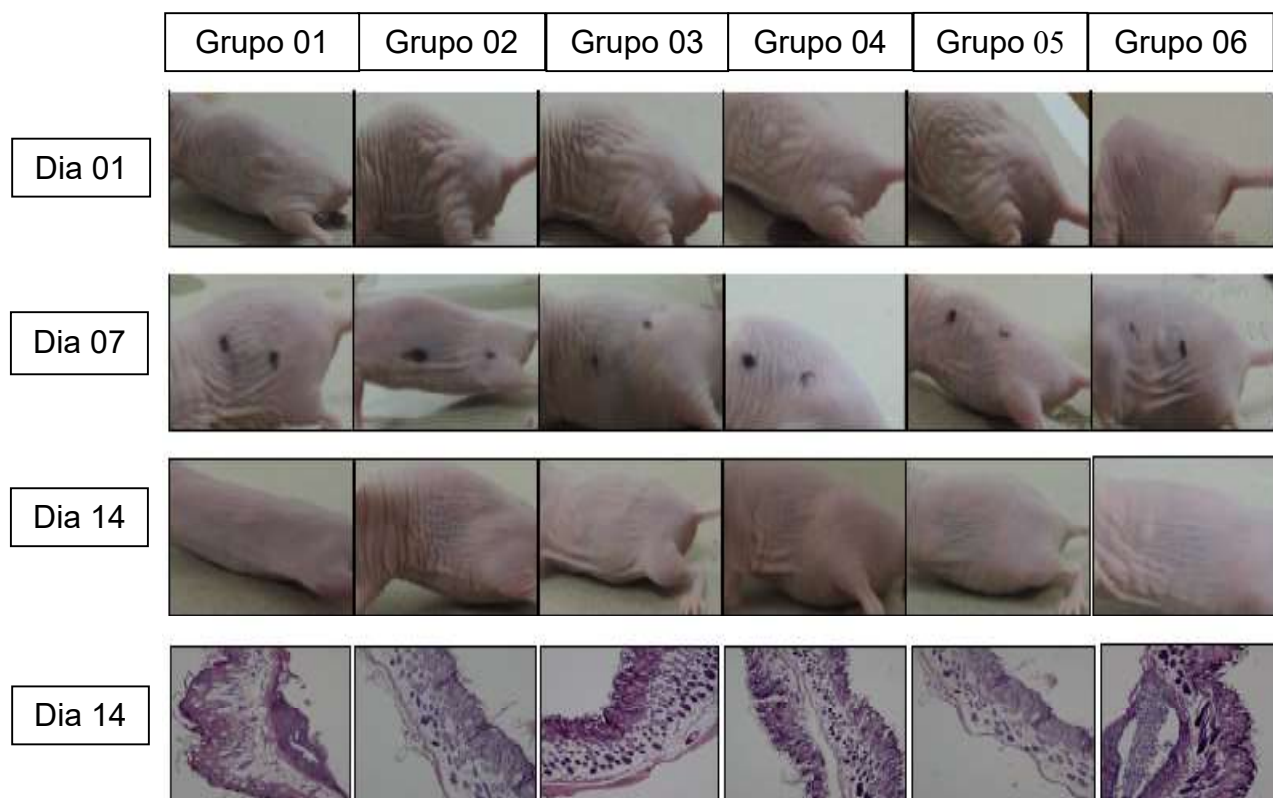
O composto 15 foi capaz de inibir a produção do NO na concentração de 0.78 $\mu\text{g/mL}$. Este efeito pode estar relacionada com uma eventual atividade anti-inflamatória *in vitro* do composto já que a quantidade de NO produzida pode determinar se ele é protetor ou tóxico para as células. As respostas inflamatórias são induzidas, em macrófagos, através do óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que catalisa a conversão da *L*-arginina a *L*-citrulina. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por um longo período de tempo, caracterizando seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou neutrófilos ou ainda outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios (ITOH et. al. 2014).

Lesão inflamatória do ensaio in vivo

No primeiro dia do tratamento macroscopicamente, o tamanho da lesão apresentou-se praticamente idêntico para os diferentes grupos a serem tratados. Esta apresentou diâmetro médio aproximado de 0.50 mm a qual foi medido diariamente. Após 7 dias de tratamento verificou-se que houve uma

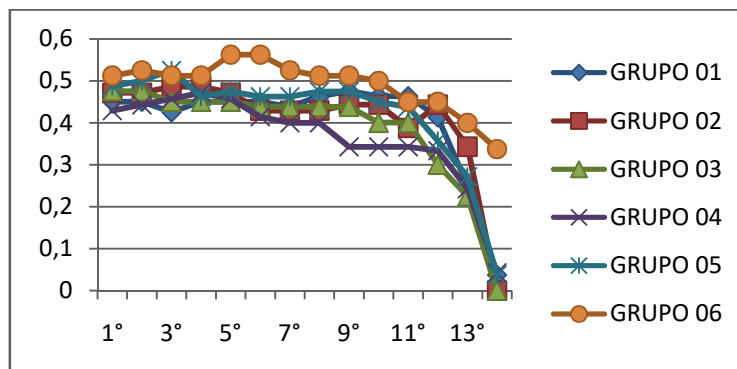
pequena diminuição da lesão em alguns animais e em outros manteve-se os 0.50 mm inicialmente apresentados, os animais do grupo 06 apresentaram uma lesão maior que os demais grupos. No dia 14 (último dia do tratamento) notou-se que a lesão havia cicatrizado/desaparecido em todos os grupos testados exceto no grupo VI em que houve apenas uma redução da lesão ao longo do tratamento. Os dados macroscópicos do acompanhamento das lesões estão apresentados na Figura 10 e 11.

Figura 10. Lesão inflamatória, dados macroscópicos e histológicos dos grupos dos animais.



Fonte: Delgado, 2017

Figura 11. Lesão inflamatória dados macroscópicos



Fonte: Delgado, 2017.

Análise histológica

A análise histológica descritiva dos diferentes grupos de estudo demonstrou que o grupo **6** apresentou maior presença de acantose (hiperplasia epitelial). Macroscopicamente, este grupo apresentou a maior lesão inflamatória. Os grupos **1**, **2** e **4** apresentaram ligeira acantose justaepitelial, enquanto que os demais grupos (**3** e **4**) apresentaram predomínio de epitélio normal. Portanto os 24 casos analisados apresentaram variações da espessura epidérmica ao longo dos fragmentos examinados, sendo registrados: hiperplasia intensa e hiperplasia discreta ou ausente (epiderme com espessura habitual).

Para a análise do tipo de infiltrado inflamatório justaepitelial (epitélio de superfície) observamos que o grupo **1** demonstrou infiltrados inflamatórios mistos e crônicos. O grupo **4** apresentou para a maioria dos animais infiltrados inflamatórios crônicos e um animal com a presença de infiltrado misto, enquanto os demais grupos (**2**, **3**, **5** e **6**) demonstraram infiltrados crônicos (epitélio normal). Na mesma análise, entretanto considerando a intensidade do infiltrado inflamatório justaepitelial (epitélio de superfície) observamos que os grupos **3** e **4** demonstraram predomínio de infiltrado inflamatório leve (epitélio normal). O grupo **5** apresentou os animais com infiltrado leve e moderado. Já os grupos **1**, **2** e **6** apresentaram predomínio de infiltrado inflamatório moderado.

Para os grupos **4** e **6** a maioria dos animais apresentaram cisto inflamatório (histo-comedo, acne). Os grupos **1**, **2** e **3** apresentaram esporádicos achados com cisto inflamatório. Já o grupo **5** não demonstrou presença de cisto, bem como a ausência de infiltrados inflamatórios no tecido conjuntivo.

Quando analisamos o tipo de infiltrado inflamatório presente no interior do cisto inflamatório (tecido conjuntivo), foi possível verificar que os grupos **1**, **3** e **4** apresentaram infiltrado inflamatório misto, enquanto os grupos **2** e **6** predominantemente crônico. Em todos os cistos, a intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada como intensa.

Para a análise da presença de comedo aberto, verificamos que o grupo **6** apresentou maior frequência, seguido dos grupos **5** e **1**, respectivamente. Já os grupos **2** e **4** apresentaram baixa frequência. O grupo **3** não apresentou comedo aberto. Quanto à análise de colágeno nos tecidos analisado os grupos **6**, **1**, **2** apresentaram maior frequência, seguido dos grupos **3**, **4** e **5**, respectivamente ($6 > 1 = 2 > 3 > 4 > 5$).

Quadro 9. Análise de Colágeno

Quantificação subjetiva – Análise de colágeno (coloração: Picrosirius red)				
Grupo 01	+++	++	++	++
Grupo 02	++	+++	++	++
Grupo 03	++	++	++	++
Grupo 04	++	++	+	++
Grupo 05	++	+	+	++
Grupo 06	++	++	+++	+++

(+) colágeno normal, (++) colágeno alterado (aumentado), (+++) colágeno muito alterado.

Na análise de infiltrados inflamatórios, todos os grupos infectados expressaram-se de maneira crônica e leve (tipo/intensidade), sendo estatisticamente não significante em relação ao grupo controle negativo, o qual apresentou infiltrado inflamatório misto e a intensidade intensa em todos os grupos.

Quadro 11. Infiltrado inflamatório justaepitelial

Infiltrado inflamatório justaepitelial (Epitélio de superfície)								
		(Tipo)			(Intensidade)			Comedo aberto
	Acantose	Agudo	Misto	Crônico	Leve	Moderado	Intenso	
GRUPO 01	++	-/+	++	++	-/+	++++	-/+	++
GRUPO 02	++	-/+	-/+	++++	+	+++	-/+	+
GRUPO 03	+	-/+	-/+	++++	+++ +	-/+	-/+	+/-
GRUPO 04	+	-/+	+	+++	+++	+	-/+	+
GRUPO 05	++	-/+	-/+	++++	++	++	-/+	++
GRUPO 06	++++	-/+	-/+	++++	+	+++	-/+	++++

Quadro 12. Presença de cisto inflamatório

Cisto inflamatório (tecido conjuntivo)							
		Infiltrado Inflamatório (tipo)			Infiltrado (Intensidade)		
	Presença (cisto)	Agudo	Misto	Crônico	Leve	Moderado	Intenso
GRUPO 01	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+
GRUPO 02	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+
GRUPO 03	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+
GRUPO 04	++	+/-	++	+/-	+/-	+	+/-
GRUPO 05	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
GRUPO 06	+++	+/-	+	++	+/-	++	+

Atualmente vários modelos de animais têm sido utilizados para a pesquisa de lesões induzidas pelo *P. acnes*. Entre os modelos tem-se preferência àqueles animais sem pelos. A ausência de pêlos facilita ainda o estudo das lesões cutâneas. As espécies de camundongos Rhino embora sem pêlos normalmente não são indicadas para estudo do tipo uma vez que apresentam algumas limitações como à falta de colonização bacteriana e inflamação (ARAUJO, 2014). No trabalho de Lee et. al., 2015, comparou-se animais que foram induzidos a acne com animais tratados com a luz vermelha e um outro grupo tratados com a luz infravermelha, ao final do experimento se observou que quanto a presença da inflamação os camundongos tratados com a luz vermelha apresentaram inflamação leve, enquanto que os tratados com a luz infravermelha apresentaram uma inflamação moderada e os não tratados a inflamação foi proeminente. Quanto à presença de cistos todos apresentaram um grau moderado. Neste trabalho verificamos que em relação ao controle negativo (animais tratados com o creme base - Grupo 01) e o restante dos grupos não houve diferenças estatísticas. Quanto ao tipo de infiltrado inflamatório justaepitelial os grupos 03 (creme com 5% do composto ativo) e 04 (gel da J&J) apresentaram o tipo crônico em todos os animais. A intensidade foi leve o que é característica de um epitélio normal, estes dois grupos tiveram estas características semelhantes. O grupo 03 não apresentou comedo e o 04 apareceu em alguns animais, o colágeno apresentou-se aumentado no grupo 03 e no 4 em quase todos os animais estava muito aumentado. No grupo controle negativo o tipo de infiltrado inflamatório justaepitelial foi crônico e misto em metade dos animais respectivamente a intensidade foi moderada, metade dos animais apresentaram comedo aberto e o colágeno estava aumentado em quase todos os animais do grupo, embora os dados do infiltrado justaepitelial quanto ao tipo em metade dos animais e intensidade serem diferentes, estatisticamente não teve diferença entre os diferentes grupos analisados.

7. Conclusão

A busca por novos agentes antimicrobianos vem sendo explorada dia após dia na comunidade científica, uma vez que muito dos microrganismos têm se tornando resistentes à ação dos antibióticos, o que dificulta a eliminação/controle dos microrganismos. A pesquisa por novos antibióticos cada vez mais potentes, capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos é tarefa dos pesquisadores nesta luta constante contra a resistência microbiana que hoje é tido como um fenômeno mundial. Assim neste trabalho, verificamos que o composto (E)-4-(3-((2-(3-hidroxibenzoil) hidrazona) metil) fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1, 2,5-oxadiazol 2-óxido (composto 15) pode vir a ser um potente antimicrobiano eficaz no tratamento da acne vulgar, uma vez que foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo na concentração de 0.2 µg/mL. Este efeito antimicrobiano verificado parece estar relacionado em partes à capacidade desses compostos em aumentar as espécies radiculares, causando assim, aumento do estresse oxidativo no microrganismo. No ensaio de viabilidade celular, verificou-se que a substância mostrou-se tóxica em praticamente quase todas as concentrações testadas. A citotoxicidade foi baixa em concentrações muito pequenas, sendo que a concentração em que se verificou a melhor porcentagem de viabilidade celular foi de 106% na concentração de 0.09 µg/mL. O composto 15 não se mostrou capaz de inibir duas das citocinas pró-inflamatórias (IL1-β e a TNF-α), no entanto mostrou-se capaz de inibir a produção do NO na concentração de 0.78 µg/mL. O ensaio *in vivo* realizada em camundongos balb/c nudes não foi capaz de provocar o mesmo efeito que foi verificado *in vitro*, não havendo diferença significativa entre os camundongos infectados com o microrganismo do *P. acnes* e os tratados com formulações comerciais ou ainda as formulações preparadas no laboratório.

Esse conjunto de resultados sugerem que o composto 15 pode ser um promissor protótipo antimicrobiano considerando o valor de 0.2 µg/mL de CIM podendo ser útil no tratamento da acne vulgar.

Referências

AMIR, M.; WASSEM, A. M.; SANA, T.; SOMAKALA, K. Furoxan derivatives as nitric oxide donors and their therapeutic potential. **International Research Journal of Pharmmacy**, v. 6, n. 9, p.585-599, 2015.

ARAUJO, V. C. P. **Camundongos *Hairless* como modelo experimental da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tratamento de lesões cutâneas com a fração polar da extração sequencial de *Selaginella sellowii* em camundongos BALB/c**. 2014. 68 f.Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2014.

BARBOSA, V.; SCHEIFFER, G.F.C.; CARDOZO, A.G.L.PIETRUCHINSKI, E; SANTOS, C. Z; SILVEIRA, D.; BERTOCCO, A.R.P. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.169-173, 2014.

BEYLOT, C.; AUFFRET, N.; POLI, F.; CLAUDEL, J-P.; LECCIA, M-T.; GUIDICE, P.D.; DRENO, B. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, p. 271-278, 2014.

BOTROS, P. A.; TSAI, G.; PUJALTE, G.G.A. Evaluation and Management of Acne. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v.42, p.465-471, 2015.

BRITO, M.F.M.; SANT'ANNA, I.P.; GALINDO, J.C.S.; ROSENDO, L.H.P.M.; SANTOS, J.B.S. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.3, p. 331-337, 2010.

BROWN, L.; WOLF, J. M.; ROSALES-PRADOS, R.; CASADEVALL, A. fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p.620-630, 2015.

CAPDEVILA, E. F. Tratamiento de la acné juvenil. **Formación continuada en dermatología (PIEL)**, v. 29, n. 6, p. 375- 381,2014.

CAO, B.J.; REITH, M.E. Nitric oxide scavenger carboxy-PTIO potentiates the inhibition of dopamine uptake by nitric oxide donors. **European Journal of Pharmacology**,v. 448, n. 1, p. 27- 30, 2002.

CERECETTO, H.; MAIO, R. Di; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure – activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1941–1950, 1999.

CHUGUNOVA, E.; AKYLBEKOV, N.; SHAKIROVA, L.; DOBRYNIN, A.; SYAKAEV, V.; LATYPOV, S.;BUKHAROV, S.BURILOV,A. Synthesis of hybrids of benzofuroxan and N-, S-containing sterically hindered phenols derivatives.Tautomerism. **Tetrahedron**, v.72, p.6415-6420, 2016.

CUNDELL, A. M. Microbial ecology of the human skin. **Microbial Ecology**, p. 1- 8, 2016.

DELOST, G. R.; DELOST, M.E.; ARMILE, J.; LLOYD, J. *Staphylococcus aureus* carriage rates and antibiotic resistance patterns in patients with acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**,v. 74, n. 4,p.673-768, 2015.

DIPIRO, J.T; TALBERT, R.L.; YEE, G.C.; MATZKE, G.R.; WELLS, B.G.; POSEY, L. M. **Pharmacotherapy**: a path physiologic approach.7th ed. New York: McGraw Hill, 2008. p. 1595.

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

DUTRA, L. A.; ALMEIDA, L. PASSALACQUA, T. G. REIS, J. S.; TORRES, F. A. E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M. CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R. GRAMINHA, M. A. S.; SANTOS, J. L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **American Society for Microbiology Journals**, v.58, n.8, p.4837-4847, 2014.

EDMONDS-WILSON, S. L.; NURINOVA, N. I.; ZAPKA, C. A. ; FIERER, N.; WILSON, M. Review of human hand microbiome research. **Journal of Dermatological Science**, v. 80, p. 3-12, 2015.

EICHENFIELD, L. F.; KRAKOWSKI, A. C.; PIGGOTT, C.; ROSSO, J.; BALDWIN, H.; FRIEDLANDER, S. F.; LEVY, M.; LUCKY, A.; MANCINI, A. J.; ORLOW, S. J.; YAN, A. C. VAUX, K. K.; WEBSTER, G. ZAENGLEIN, A. L. THIBOUTOT, D. M. Evidence-based recommendations for the diagnosis and treatment of pediatric acne. **American Academy Pediatrics**, v.131, supl 3, p.163 -189, 2013.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica** v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FEELISCH, M.; SCHONAFINGER, K.; NOACK, E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 1149–1157, 1992.

FIGUEIREDO, A.; MASSA, A.; PICOTO, A.; SOARES A. P.; BASTO A. S.; LOPES, C.; RESENDE, C.; REBELO C.; BRANDÃO, F. M.; PINTO, G. M.; OLIVERA, H. S.; SELORES, M.; GONÇALO, M.; BELLO, R. T. Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte I: Epidemiologia, etiopatogenia, clínica, classificação, impacto

psicossocial, mitos e realidades, diagnóstico diferencial e estudos complementares. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v.27, p.59-65, 2011.

FIGUEIREDO, A.; MASSA, A.; PICOTO, A.; SOARES, A. P.; BASTO A. S.; LOPES, C. RESENDE, C.; REBELO C.; BRANDÃO, F. M.; PINTO, G.M.; OLIVERA, H. S.; SELORES, M.; GONÇALO, M.; BELLO, R. T. Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte II: Tratamento tópico, sistémico e cirúrgico, tratamento da acne na grávida, algoritmo terapêutico. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v.27, p.66-76, 2011.

FRIDMAN, A. J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D. O.; CHAMPER, J. QUIN, M.; PIROUZ, A.; BLECHER- PAZ, K.; LIU, P.T.; MODLIN, R. L; KIM, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, p. 1231–1239, 2012.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. Genetics and molecular biology branch, national human Genome Research Institute, National Institutes of Health. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, n.4, p. 244-253, 2011.

GOLNICK, H. P.; ZOUBOULIS, C. C. Not all acne is Acne Vulgaris. **Deutsche Ärzteblatt International**, v.111, p. 301-312, 2014.

GUIMARÃES, D. O; SILVA, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HANDOG, E. B; DATUIN, M. S. L.; SINGZON, I. A. Chemical peels for Acne and Acne scars in Asians: Evidence based review. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v.5, n.4, p. 239-246, 2012.

HARPER, J. C. Use of oral contraceptives for management of acne vulgaris practical considerations in real world practice. **Dermatology Clinics**, v.34, p. 159-165, 2016.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybridfuroxanyl N-acyl hydrazine derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 64–74, 2013.

HWANG, K.J.; PARK, Y.C.; KIM, H.J.; LEE, J.H. Synthesis and antifungal activities of furoxan derivatives designed as novel fungicide. **Bioscience Biochemistry and Biochemistry**, v. 62, n.9, p.1693-1697, 1998.

ITOH,T.;TSUCHIDA,A.;MURAMATSU,Y.;NINOMIYA,M.;ANDO,M.;TSUKAMASA,Y.; KOKETSU,M.Antimicrobial and anti-inflammatory properties of nostocionone isolated from *Nostoc commune* Vauch and its derivatives against *Propionibacterium acnes*.**Anaerobe.**, n. 27, p.56 - 63, 2014.

JOVENÉ, C.; CHUGUNOVA, A. E; GOUMONT, R. The properties and the use of substituted benzofuroxans in pharmaceutical and medicinal chemistry: a comprehensive review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**,v.13, n. 8, p.1089-1136, 2013.

JORGE, S. D.; PALACE-BERL, F.; MASUNARI, A.; CECHINEL, I. A; PASQUALO, K.F.M.; TAVARES, L. C. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. **Bioorganic& Medicinal Chemistry**,v.19, p. 5031-5038, 2011.

KAO, A.P.; CONNELLY, J.T.; BARBER,A.H. 3D nanomechanical evaluations of dermal structures in skin. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 57, p.14 – 23, 2016.

KEYAL, U.; BHATTA, A. K.; WANG, X. L. Photodynamic therapy for the treatment of different severity of acne: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 191–199, 2016.

KOSMADAKI, M.; KATSAMBAS, A.Topical treatments for acne. **Clinics in Dermatology**. n.35, p.173-178, 2017.

LEVIN, J. The relationship of proper skin cleansing to pathophysiology, clinical benefits, and the concomitant use of prescription topical therapies in patients with AcneVulgaris. **Dermatology Clinics**, v. 34, p. 133-145, 2016.

LIU, X.; LU,Z.;LEWIS, R.; CARRÉ, M.J.;MATCHER,S.J.Feasibility of using optical coherence tomography to study the influence of skin structure on finger friction. **Tribology International**,v.63, p. 34-44, 2013.

LYNN, D. D.; UMARI, T.; DUNNiCK, C.A.; DELLAVALLE, R. P. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. **Adolescent Health, Medicine and Therapeutics**, v.7, p.13-25, 2016.

M27-A2.**Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard**. 2nd ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.

M27-A3. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard**. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

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

NAGLER, A.R.; MILAM, E.C.; ORLOW, S. J. The use of oral antibiotics before isotretinoin therapy in patients with acne. **The American Academy of Dermatology**, v.74, p.273-279, 2016.

NEVES,J. R.; FRANCESCONI, F.; COSTA, A.; RIBEIRO, B. M.; FOLLADOR, I.; ALMEIDA, L. M. C.Propionibacterium acnes e a resistência bacteriana.**Surgical & Cosmetic Dermatology**,n.7, v.3, Supl. 1, p.27-38, 2015.

NGUYEN,F.;STAROSTA,A.L.; ARENZ, S.; SOHMEN,D., DÖNHÖFER, A.;WILSON, D.N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms.**Biological Chemistry**, v.395, n.5, p. 559-575, 2014.

OKAMOTO, K.; IKEDA, F.; KANAYAMA, S.; NAKAJIMA, A.; MATSUMOTO, T.; ISCHII, R.; UMEHARA, M.; GOTOH, N.; HAYASHI, K.;MATSUMOTO, S.; KAWASHIMA, M. In vitro antimicrobial activity of benzoyl peroxide against *Propionibacterium acnes* assessed by a novel susceptibility testing method.**Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n.6, p.426-429, 2016.

OSÓRIO, T. M. **Atividade antimicrobiana de chalconas e hidrazonas frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina**, 2011.107 f.Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

OTEO, J.; ARACIL, M. B. Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular:*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, B-lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas .**Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.33, n.2, p. 27-33, 2015.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PRETSCH,A.; NAGL, M.; SCHWENDINGER, K.; KREISEDER, B.WIEDERSTEIN, M.; PRETSCH, A.; GENOV, M.; HOLLAUS, R.; ZINSSMEISTER, D.; DEBBAB, A.; HUNDSBERGER, H.; EGER, A.; PROKSCH, P.; WIESNER, C. Antimicrobial and Anti-Inflammatory activities of endophytic fungi *talarmyces wortmannii* extracts against Acne-inducing bacteria. **PLoS ONE**,v. 9, n. 6,p.1-12,2014.

ROCHA, E. A. L. S. S. **Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de extratos**

vegetais do semiárido brasileiro contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. 2012. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia).Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

RYU, S.; HAN, H.M.; SONG, P.I., ARMSTRONG, C. A.; PARCK, Y. Suppression of *Propionibacterium acnes* infection and the associated inflammatory response by the antimicrobial peptide P5 in mice. **Journal PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p.1-20, 2015.

SALOMÃO, J.D.; PALACE-BERL, A.; MASUNARI, A.; CECHINEL, M.I. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 5031–5038, 2011.

SANTOS, J.L. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos à fármacos para o tratamento dos sintomas da Anemia Falciforme.** 2009. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.

SARKER, S.A.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v.42,n.4, p.321–324, 2007.

SCHIEFER, I.T.; VANDEVREDE, L.; FA', M.; ARANCIO, O.; THATCHER, G.R. Furoxans (1,2,5-oxadiazole-N-oxides) as novel NO mimetic neuroprotective and precognitive agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 3076-87, 2012.

SEVERO, B. C., GAZZONI, A.F., SEVERO, L. C. Capítulo 3 - Criptococose pulmonar. **Jornal Brasileiro de pneumologia**. v.35, n.11. São Paulo, 2009.

SILVA, A.M. F.; COSTA F.P.; MOREIRA, M. Acne vulgar: diagnóstico e manejo pelo médico de família e comunidade. **Revista Brasileira Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n.30, p.54-63, 2014.

SORBA, G.; MEDANA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; DI STILO, A.; GALLI, U.; GASCO, A. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 463-469, 1997.

TANGHETTI, E. A. The role of inflammation in the pathology of acne. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v.6, n.9, p. 27-35, 2013.

TEIXEIRA, S. F.; AZEVEDO, R. A.; SALOMON, M. A. C.; SALOMÃO, J. D.; LEVY, D.; BYDLOWSKI, S. P.; RODRIGUES, C. P.; PIZZO, C. R.; BARBUTO, A. M. ; FERREIRA, A. K. Synergistic anti-tumor effects of the combination of a benzofuroxan derivate and sorafenib on NCI-H460 human large cell lung carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.68, p.1015-1022, 2014.

THYSSEN, J.P.; KEZIC, S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 4, p. 792-799, 2014.

TSAL, H-H.; LEE, W-R.; WANG, P-H.; CHENG, K-T.; CHEN, Y-C, SHEN, S-C. Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2 protein expression via ROS-dependent NF- κ B and AP-1 activation in macrophages. **Journal of Dermathological Science**, v.69, n.2, p.122-131, 2013.

TUCHAYI, S. M.; MAKRANTONAKI, E.; GANCEVICIENE, R.; DESSINIOTI, C.; FELDMAN, S. R.; ZOUBOULIS, C.C. Acne Vulgaris. **Disease primers**, v.1, p.1-20, 2015.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats., **P&T Journal for managed care and Hospital Formulary Management**, v.40, n. 4, p. 277-283, 2015.

WALSH, T. R.; EFTHIMIOU, J.; DRÉNO, B. Systematic review of antibiotic resistance in acne: an increasing topical and oral threat. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16, n.3, p. 23-33, 2016.

WILLIAMS, H.C.; DELLACALLE, R.P.; GARNER S. Acne vulgaris. **The Lancet Psychiatry**, v. 379, p. 361-372, 2012.

ZOUBOULIS, C. C.; BETTOLI, V. Management of severe acne. **British Journal of Dermatology**, v. 172, p. 27-36, 2014.

ZOU, Z.; LAN, X.; QIAN, H.; HUANG, W.; LI, Y. Synthesis and evaluation of furoxan-based nitric oxide-releasing derivatives of tetrahydroisoquinoline as anticancer and multidrug resistance reversal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 19, p. 5934–5938, 2011.

ZUCHETO, G.; BRANDÃO, M.; TASQUETTO, A.; ALVES, M. Acne e seus tratamentos: uma revisão bibliográfica. SEPE -XV Simpósio de Ensino Pesquisa e Extensão. p. 1-10, 2011.

Anexo I

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos como alternativa para o tratamento da Acne Vulgar", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 20/2016, sob a responsabilidade de Ivone Leila Lima Delgado e Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 15 de setembro de 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro de 2016
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss
Nº de animais	12
Peso/Idade	25 g 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	CEMIB - Unicamp

Araraquara, 15 de setembro de 2016.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI Coordenador da CEUA

Anexo II

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos como alternativa para o tratamento da acne vulgar", registrada como Protocolo CEUA/FCF/CAR: 51/2016, sob a responsabilidade do Prof.Dr.Jean Leandro dos Santos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino)- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 04 de janeiro de 2017.

Finalidade	()Ensino(X)Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Julho de 2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/C
Nº de animais	20
Peso/Idade	25 g-6 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Centro de Bioterismo da USP -São Paulo/SP

Araraquara, 04 de janeiro de 2017.



Prof.Dr.CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA