



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Curso de bacharelado em Biomedicina

MODULAÇÃO DE FAGÓCITOS PELA

MELATONINA

THAYSLINE MONIQUE LINHARES

Barra do Garças - MT

2019

THAYSLINE MONIQUE LINHARES

MODULAÇÃO DE FAGÓCITOS PELA MELATONINA

Trabalho de Monografia do curso de Bacharelado em Biomedicina do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Campus Universitário do Araguaia/UFMT, como requisito parcial para obtenção do título de bacharelado em Biomedicina.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Luzía França

Barra do Garças – MT

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

L755m Linhares, Thaysline Monique.
MODULAÇÃO DE FAGÓCITOS PELA MELATONINA /
Thaysline Monique Linhares. -- 2019
50 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Luzia França.
Co-orientadora: Katleyn Polizeli Galvão Silva.
TCC (graduação em Biomedicina) - Universidade Federal
de Mato Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da
Saúde, Barra do Garças, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Enzima superóxido dismutase. 2. Melatonina. 3.
Microemulsão. 4. Radicais Livres. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DO TRABALHO DO CURSO DE BIOMEDICINA

Aos 12 dias do mês de Agosto do ano de 2019, às 08 horas, na sala 130, do Campus Universitário do Araguaia - UFMT na cidade de Barra do Garças, foi realizada a sessão pública de apresentação e defesa do Trabalho de Curso do(a) acadêmico(a) Thaysline Monique Linhares.

A banca foi composta pelos seguintes professores: Prof.(a) (orientador(a)) Dr. Eduardo Luzia França, Prof (a). Dr. Ana Paula Morbio e Bacharel. Carolina Lilibeth Carvalho de Pinho sob a presidência do (a) primeiro (a). O trabalho de curso tem como título "**Modulação de fagócitos pela melatonina**". Após explanação no prazo regulamentar o(a) aluno(a) foi interrogado(a) pelos componentes da banca. Terminada essa etapa, os membros, de forma confidencial avaliaram o(a) aluno(a) e conferiram ao mesmo(a) o resultado aprovado com nota 9,0, proclamado pelo presidente da sessão. Dados por encerrados os trabalhos, lavrou-se a presente Ata, que será assinada pela banca e pelo(a) aluno(a). Havendo requisitos a serem observados, os mesmo seguem registrados em folha anexa.

Barra do Garças, 12 de Agosto de 2019.

ASSINATURAS:

Aluno(a): Thaysline M. Linhares

Banca: [Assinatura]

Carolina Lilibeth Carvalho de Pinho

[Assinatura]

Dedico este trabalho primeiramente a DEUS, por sempre estar ao meu lado me dando forças para seguir a diante e a minha amada FAMÍLIA que acreditam e confiam em mim, tudo é por vocês e para vocês.

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, quero agradecer imensamente a Deus, por ter me dado a oportunidade de estudar em uma faculdade federal, por jamais ter me abandonado nos momentos de crises de ansiedades e angustia, e por sempre ter me dado forças em TODAS as minhas dificuldades, Deus além de pai é misericordioso, nos dias em que eu chorava, que eu achava que não tinha mais solução ele estava ali comigo, e eu sei que estava, pai muito obrigada por todas as minhas derrotas e todas as minhas vitórias até aqui, de todas as lições eu tirei um bom proveito.

A minha doce e amada família, que em todo tempo esteve ao meu lado, mesmo longe (e muito longe). O meu muito obrigada aos meus irmãos Fábio e Thiago, que mesmo com brigas torcemos sempre um pelo outro, vocês são minha fonte de inspiração, eu amo vocês. Aos meus pais, "onde a vida começa e o amor nunca termina", a tão falada Dona Salete, minha mãezinha, eu não tenho nem palavras para lhe agradecer, pela força de todos, sim de todos os dias, pela motivação, pela inspiração, pela paciência, por sempre topar tudo que eu falo e ficar do meu lado, pelas noites mal dormidas que você se levantava dobrava seus joelinhos e orava por mim, e claro pela aquela frase de otimismo "calma, tudo vai dar certo no final". Ao meu querido pai, Senhor Ari, que sempre que eu ligo nos prantos ele sempre me acalma, com todo meu desespero ele diz: "o que está acontecendo? Não fica assim! Logo você vai estar em casa", e acredite isso me da paz na alma, pai obrigada por sempre se preocupar comigo, e sempre acreditar que as coisas vão dar certo. Vocês jamais mediram esforços quando o assunto é estudo. Acredito que vocês (pais e irmãos) são uma espécie de bandeira branca após uma terrível guerra, sempre serão vocês, meu refúgio, minha base, meu equilíbrio, e se hoje eu estou aqui, é graças a vocês e por vocês, a minha vitória é a vitória de vocês também! Eu só tenho a agradecer por ter vocês como família, obrigada, obrigada e obrigada eu amo muito vocês.

Para meu orientador Prof^o Dr. Eduardo Luzia França o meu muito, muito obrigada, que sem ele nada disso estaria acontecendo. Agradeço o senhor desde o dia em que me convidou para fazer parte do seu laboratório até o dia em que confiou no meu projeto e me deu asas para viajar por esse mundo da ciência. E graças a isso hoje eu tenho o prazer de saber o que é realizar um sonho, sonho esse que eu nem sabia que tinha. Obrigada professor, sou sua fã, admiro a sua humildade e honestidade tanto como pessoa quanto profissional.

E já aproveito pra dar um salve para a galera do laboratório de cronoimunologia e materno infantil, agradeço humildemente Mahmi Fujimori e Aron Cotrim pela paciência e por me ensinarem como funcionava o laboratório e todas as práticas iniciais. A Tassiane Moraes por ter me motivado e ter me dado a chance de auxiliá-la nos seus experimentos, me ensinou muito, sinto falta das nossas conversas de todas as sextas a tarde. Agradeço a Marianny Carolina pelo apoio, por me ouvir e por ter uma palavra amiga nas horas difíceis, ao Bruno por ter me ajudado na elaboração das estatísticas e pela parceria de todos os dias, Renata Brito por ter me ensinado tanto durante minha primeira IC, a minha grande amiga Michelly Aline que hoje não tem mais vínculo com o laboratório mas quando ainda fazia parte me ajudou muito, é realmente uma amiga de verdade, sinto sua falta. O pessoal que ajudou não só nos experimentos, mas também nos dias de nervosismos e de muito stress, pessoas essas que eu tenho orgulho de chamar de amigos, minha admiração e gratidão por vocês serão eterna, André Torres, Carolina Lilibeth, Andressa Broch, Isabella Cristina, Cláudia Cristina e Luciana do Carmo. A minha co-orientadora Katleyn Polizeli, por ter tido comprometimento ao me ajudar e mesmo longe tentava se manter presente; a Luana Gabriela que sempre que podia me auxiliava, e a Milena Bigueti que sou grata por ter me levado no laboratório pela primeira vez e que desde então passei a frequentá-lo. Tenho um carinho e um respeito muito grande por todos vocês.

A todos os professores que tive até hoje, em especial meu orientador do

ensino médio, Prof. Dr. Fabrício Ribeiro, que até hoje me auxilia além de ser um excelente profissional e um velho amigo, e a Prof^a. Dr. Ludier Késser, que me ensinou que não existe perguntas bestas, e que além de tudo foi uma das melhores professoras que já tive, e aos demais o meu muito obrigada, vocês são os responsáveis disso tudo.

Por fim aos meus amigos, que sempre estão comigo no dia-a-dia, e faz parecer que a vida universitária não é a chatice que na verdade é. Kelly Chaves (Kelly Key) obrigada por suas palavras amigas, por demonstrar tanto interesse comigo e por ser essa irmãzinha pra mim, eu amo você. Daniel Carvalho (Baby) e Virlanio Alves (Vir), obrigada pela nossa pequena família, por não me deixarem me sentir tão sozinha, Baby obrigada pelas conversas, por me entender e sempre que possível me ajudar, Vir obrigada pelas risadas e conversas jogadas foras, eu amo vocês dois. Ludmila Taverny (Lud) obrigada pela parceria e companheirismo, José Eduardo (Fefo) obrigada pela amizade, pelas risadas, pelas nossas conversas sobre a vida e por sempre me ajudar, Christian Ferreira obrigada pela força presente na frase "Nega vai dá certo", amo vocês. Julya Vetorelo, minha amiga de infância que quando consegue falar comigo sempre diz que tudo vai dar certo e que confia em mim, obrigada, mesmo de longe você tenta se manter presente. Meu amigo André Proença que eu amo tanto, entrou junto comigo na faculdade e sempre seguimos um dando força pro outro, Luiz Henrique (Canhambequi para os íntimos) que eu conheci nem faz tanto tempo, mas já me ajudou tanto que eu nem sei como fazer para te retribuir. Andressa Broch obrigada por não me deixar desistir, pela força, amizade que construímos, e pelas tantas risadas usadas como "escape" ou meio de distração, pelas noites até tarde me ajudando e não medindo forças para isso; E Morgana Barbosa, você é fera, obrigada e obrigada por me ajudar tanto. Para fechar com chave de ouro, Lucas Oliveira (momo), que hoje é com certeza meu irmão de outra mãe, que me ajuda tanto, tanto, que eu precisaria de umas 2 Thaysline para lhe recompensar, eu amo você, obrigada por confiar tanto em mim. Obrigada por

vocês tornarem os dias mais leves, pelas palavras de conforto, pelas risadas, e pelo apoio, eu amo vocês.

Este trabalho é nosso, todos vocês fazem parte desse sonho, e sou eternamente grata por terem vocês nos meus dias. OBRIGADA!

“Porque eu, o Senhor teu Deus, te seguro pela mão direita e te
declaro: Não temas, eu te ajudarei” Isaías 41:13.

RESUMO

A microemulsão é uma solução feita pela junção de duas substâncias que não se misturam, seguido pela adição de um agente emulsificante. É muito utilizada em cosmético, no uso tópico e também em preparações farmacêuticas. A melatonina, conhecida como hormônio regulatório do sono, é sintetizada na glândula pineal, sendo produzida em maior quantidade no período noturno. Possui a capacidade antioxidante que tem finalidade de atuar nos radicais livres, participando do processo de fagocitose gerados pelas células, diminuindo assim o envelhecimento celular. Os fagócitos do sangue periférico humano são responsáveis pela proteção contra agentes infecciosos e também estão associados aos processos de envelhecimento, neste grupo estão inseridos fagócitos mononucleares e polimorfonucleares, sendo os principais os monócitos e os neutrófilos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a modulação de fagócitos com o uso da melatonina incorporado a um sistema microemulsionado. Foi utilizado a caracterização reológica do sistema microemulsionado. Posteriormente avaliou-se o índice de viabilidade celular e fagocitose por microscopia de fluorescência e atividade da SOD (enzima superóxido dismutase) pelo método do NBT (azul de nitrotetrazólio). Conclui-se que a melatonina incorporada a microemulsão obteve maior imunomodulação do que quando comparada com a estimulação somente com a melatonina. E a enzima superóxido dismutase foi potencializada na presença da melatonina, o que corrobora com o seu efeito antioxidante.

Palavras-chaves: Enzima superóxido dismutase, melatonina, microemulsão, radicais livres.

ABSTRACT

Microemulsion is a solution made by joining two unmixed substances, followed by the addition of an emulsifying agent. It is widely used in cosmetics, topical use and also in pharmaceutical preparations. Melatonin, known as the sleep regulatory hormone, is synthesized in the pineal gland and is produced in greater quantities at night. It has the antioxidant capacity that has the purpose of acting on free radicals, participating in the process of phagocytosis generated by cells, thus reducing cell aging. The human peripheral blood phagocytes are responsible for the protection against infectious agents and are also associated with aging processes. Mononuclear and polymorphonuclear phagocytes are inserted in this group, being the main monocytes and neutrophils. The present work aimed to evaluate phagocyte modulation with the use of melatonin incorporated into a microemulsion system. The rheological characterization of the microemulsion system was used. Subsequently, the cell viability index and phagocytosis were evaluated by fluorescence microscopy and SOD (superoxide dismutase enzyme) activity by the NBT (nitrotetrazolium blue) method. It was concluded that melatonin incorporated to microemulsion had higher immunomodulation than when compared to stimulation with melatonin alone. And the enzyme superoxide dismutase was potentiated in the presence of melatonin, which corroborates its antioxidant effect.

Keywords: Superoxide dismutase enzyme, melatonin, microemulsion, free radicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Classificação de Winsor para sistemas microemulsionados.....	16
Figura 02 - Fatores que influenciam e afetam o envelhecimento	19
Figura 03 – Diagrama pseudoternario das 36 amostras de ME's	29
Figura 04 - Sistema microemulsionado de 4 amostras como exemplo, 33: separação de fases; 29: emulsão gel; 23: emulsão líquida; e 8: MEL líquida	29
Figura 05 - Titulações de 18 concentrações na fase de MEL.....	29
Figura 06 - Curva de fluxo dos grupos controle (célula); grupo com MEL e células; com melatonina (M) e células e por fim, grupo com a MEL com a melatonina e com as células.....	31
Figura 07 - Viscosidade dos grupos controle (célula); grupo com MEL e células; com melatonina (M) e células e por fim, grupo com a MEL com a melatonina e com as células.....	32
Figura 08 - Índice de fagocitose dos grupos células com EPEC, microemulsão com células e EPEC, melatonina com células e EPEC, e microemulsão com melatonina células e EPEC).....	35
Figura 09 - Níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) entre grupos com célula e bactéria.....	37
Figura 10 - Níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) entre grupos com bactéria e células + bactérias.....	37
Figura 11 - Níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) entre grupos com células + bactérias e células + bactéria + melatonina.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/O: Água em óleo;
AA-NAT: N-acetil transferase;
ANOVA: Análise de variância;
BTH: Brain Heart Infusion;
CECA: *Escherichia coli* enteroagregativa;
EG: Emulsão gel;
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica;
EHL: Equilíbrio hidrofílico lipofílico;
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva;
EL: Emulsão líquida;
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica;
EROs: Espécies reativas de oxigênio;
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica;
H₂O₂: Peroxido de hidrogênio;
ME: Microemulsão;
MEG: Microemulsão gel;
MEL: Microemulsão líquida;
MN: Mononuclear;
O/A: Óleo em água;
PBMC: Células mononucleares do sangue periférico;
PBS: Solução salina tamponada;
SF: Separação de fases;
SOD: Enzima superóxido dismutase;
SPAN 80: Oletado de sorbitano;
TACC: Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico;
TWEEN 80: Polissorbato 80.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01 - Desenvolvimento do sistema microemulsionado.....	24
Tabela 02 - Valores calculados de porcentagem e EHL resultante da mistura de tensoativos.....	29
Tabela 03 - Viscosidade sanguíneas dos grupos.....	33
Tabela 04 - Viabilidade celular dos grupos.....	34
Tabela 05 – Índice de fagocitose dos grupos	36
Tabela 06 - Correlação entre grupos	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Desenvolvimento do sistema microemulsionado:.....	25
3.2 Caracterização reológica:	25
3.3 Obtenção de amostras de sangue periférico:	26
3.4 Obtenção das células mononucleares do sangue periferico (PBMC):	26
3.5 Preparo da cultura da bactéria <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica:	27
3.6 Viabilidade celular e Ensaio da Fagocitose:	27
3.7 Atividade enzimática da superóxido dismutase:	28
3.8 Análises estatísticas:	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Determinação da mistura de tensoativos:	30
4.2 Desenvolvimento do sistema microemulsionado:.....	30
4.3 Caracterização reológica:	32
4.4 Viabilidade celular:	34
4.5 Índice de Fagocitose:	35
4.6 Atividade enzimática da superóxido dismutase:	37
4.7 Correlação de Pearson para Viscosidade e Fagocitose:	39
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7. ANEXO.....	48

1. INTRODUÇÃO

A microemulsão (ME) é um método muito utilizado na indústria farmacêutica e na produção de cosméticos. Conhecida também como nanoemulsão por ser esfericamente menor que 1400 Å (BHARGAVA et al., 1987; LANGEVIN, 1988). Apresenta gotículas minúsculas e se forma de modo opticamente translúcido (BENITA, 1998). O seu tamanho esfericamente pequeno possibilita que a microemulsão trabalhe como transportador de drogas que apresentam pouca hidrossolubidade (ZHU et al., 2009). O conceito de emulsão pode ser determinada a partir de dois líquidos que não se misturam, como exemplo água e óleo, estabilizados por um conjunto de tensoativos que serão inseridos na interface óleo/água (CONSTANTINIDES et al., 1994; LAWRENCE, 1994; OLIVEIRA et al., 1997), e, se necessário, um co-tensoativo também é utilizado. A ME é ainda definida como um processo termodinamicamente estável, com baixa viscosidade e isotrópico (SOUZA et al., 2017).

Hoar e Schulman (1943) introduzem a ME na literatura como um sistema transparente que era formado a partir de uma junção de óleo e água juntamente com tensoativos e álcool de cadeia média. Entretanto, apenas na década de 1950 Schulman e colaboradores utilizaram então o nome microemulsão formado através de um sistema estável, homogêneo e translucido possuindo um álcool de cadeia curta, água, benzeno e oleato de potássio (SCHULMAN et al., 1959). As ME's são exemplos de interface que apresentam uma superfície retratada pelo meio dispersante onde normalmente esse meio é aquoso e uma segunda região ilustrada pela região interface, ou seja, uma região comunicante entre as partes distintas existentes. Assim, a mesma apresenta características específicas e propriedades físico-químicas diferentes das do meio dispersante, são essas particularidades que possibilitam a ME ser utilizada em produtos farmacêuticos (BENITA, 1998).

Segundo estudos (FORMARIZ, 2005), as ME's são capazes de aumentar a eficácia dos fármacos pois melhoram a sua solubilidade e absorção, diminuindo a dose ministrada e os efeitos colaterais do mesmo. Além do que, esse complexo acaba tanto por aprimorar a absorção desses fármacos devido a presença de tensoativos, quanto intensifica a solubilização de fármacos lipofílicos em água, preservando-os a

fim de evitar a ocorrência de uma hidrólise enzimática (FORMARIZ, 2005).

As ME's possuem vantagens em oposição às formas farmacêuticas orais tradicionais (GRADZIELSKI, 2008; KREILGAARD, 2002) devido a excelente superfície de contato da pele com o veículo do fármaco, o equilíbrio entre as suas fases (aquosa, lipofílica e tensoativo) auxiliam a movimentação do fármaco para o estrato córneo lipofílico (KREILGAARD, 2002; SINTOV et al., 2004). Esse sistema ainda possui outros benefícios para administração oral, onde apresenta uma redução da toxicidade, fácil administração e uma maior capacidade terapêutica (TALEGAONKAR et al., 2008).

O método de ME pode ser classificado em emulsão água em óleo (A/O), que utiliza a água como fase dispersa e a fase oleosa que é a emulsionada. A emulsão óleo em água (O/A) é composta pela difusão do óleo na fase aquosa (PIANOVSKI et al., 2008). É nesta última fase em que as ME's auxiliam a distribuição dos fármacos e forma-se através de gotículas dispersas em água e um tensoativo na interface O/A (ACTIS et al., 1999; CONSTANTINIDES et al., 1994; CONSTANTINIDES, 1996). A emulsão para ser produzida necessita do equilíbrio entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, da temperatura, força iônica, estrutura química e da utilização do co-tensoativo que não é de uso obrigatório (FORMARIZ et al., 2005).

Winsor (1948) estabeleceu quatro tipos de sistemas da ME como mostra na Figura 01, sendo eles: Winsor I que possui equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase oleosa; Winsor II o equilíbrio está entre a fase emulsionada na parte superior e a fase aquosa em excesso; Winsor III nesta por sua vez apresenta o equilíbrio em três fases, sendo assim: óleo na fase superior, emulsão na fase intermediária e a água na fase inferior; por fim Winsor IV, que apresenta o sistema monofásico translúcido.

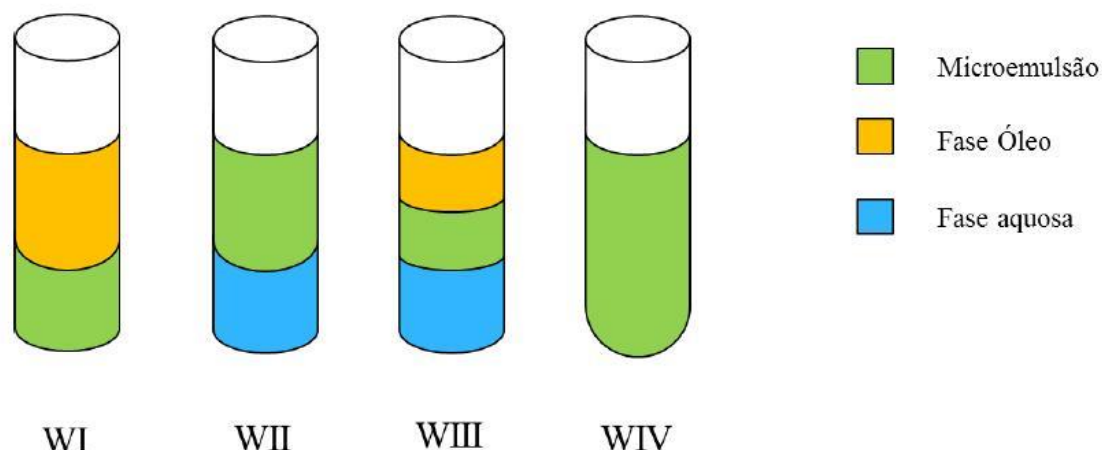


Figura. 01. Classificação de Winsor para sistemas microemulsionados (SILVA, 2015).

O sistema microemulsionado com sua vantagem de ser um bom distribuidor de fármaco, auxilia na distribuição da melatonina no organismo (ZHU et al., 2009). A melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal, tem sua produção e liberação estimulada através da escuridão (CASADO et al., 2012). A produção desse hormônio nos humanos é decrescente, sendo maior na infância e menor na fase adulta (RUIZ MARTÍNEZ & MORALES HERNANDEZ 2015). Além de sua atividade reguladora do sono se destaca também na regulação humoral, na fisiopatologia da reprodução, impede o crescimento tumoral, possui capacidade imunomoduladora, (MONTILLA et al., 2001; VURAL et al., 2001), ações antioxidantes e anti-inflamatórias associados ao estresse oxidativo e à inflamação (CARRILLO-VICO et al., 2005; REITER et al., 2005).

Além disso, diminui a peroxidação lipídica e a apoptose (REITER et al., 2000; REITER et al., 1998). Pesquisas revelam também que a diminuição da produção de melatonina está ligada ao envelhecimento (RUIZ MARTÍNEZ & MORALES HERNANDEZ 2015). Considera-se então que a melatonina é um hormônio pleiotrópico já que possui várias atuações (HARDELAND et al., 2011).

Estudos mostram que foram encontradas enzimas que produzem melatonina nos ossos, na pele, no intestino, na bile e nas plaquetas (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014). Quando então o organismo entra em contato com a luz, gera a lise da enzima N-acetiltransferase (AA-NAT), resultando em uma rápida diminuição da produção de melatonina. Por sua vez, o revezamento de luz e escuridão é o que regula o relógio biológico de um organismo, agindo através da retina e do trato retiniano-

hipotalâmico em direção ao sistema nervoso central. Logo, a quantidade que tal organismo ficará exposto à escuridão, será proporcional a quantidade de melatonina que será produzida. Já a intensidade da luz, modifica a liberação por meio do relógio circadiano (sincronização da melatonina) (EMET et al., 2016).

O desequilíbrio do sistema circadiano está ligado a casos de síndrome metabólica, como exemplo temos a diabetes e a obesidade (PULIMENO et al., 2013). A melatonina faz seu papel através dos seus receptores que estão presentes em diferentes tecidos periféricos, com isso conserva os ritmos circadianos. Este sistema regula o metabolismo da glicose e funções fisiológicas (SHI et al., 2013; FONKEN & NELSON 2014). Devido a ação antioxidante da melatonina, possui a capacidade de neutralizar radicais livres produzidos pelas células do organismo (RUIZ MARTÍNEZ & MORALES HERNANDES, 2015). Este hormônio também chamado de “hormônio da juventude”, possui vantagens sobre o envelhecimento e em algumas doenças referentes a ele (ZHAO et al., 2008).

Através de estudos *in vitro* (RUIZ MARTÍNEZ & MORALES HERNANDES, 2015), afirmou-se então que a melatonina possui uma ação antioxidante melhor do que a vitamina E. O seu uso tópico resulta em alguns efeitos positivos para o tecido epitelial, como: antirrugas, regenerador cutâneo, e protetor celular relacionados a radiação ionizante (RUIZ MARTÍNEZ & MORALES HERNANDES, 2015).

O envelhecimento é causado por fatores extrínsecos e intrínsecos, é um procedimento que ocorre em função do tempo de vida, atinge todas as células dos seres vivos, resulta na diminuição das atividades metabólicas celulares e as funções dos órgãos e tecidos do organismo. Logo, este procedimento é progressivo, irreversível, além de acometer todos os organismos vivos. O resultado do envelhecimento é dado através da genética de cada pessoa e o meio em que ela vive (MARTÍNEZ & MORALES HERNANDES, 2015).

Segundo Martínez e colaboradores (2015), existem alguns fatores que afetam o envelhecimento da pele, podendo ser intrínsecos, que seriam: novos hormônios, regulação genética, e fatores inflamatórios. E/ou também fatores extrínsecos, como exemplo: radiações UV e ambientes contaminados. Entre os fatores intrínsecos e extrínsecos está a produção de radicais livres, todos os fatores citados influenciam no

envelhecimento cutâneo, como podemos observar na figura 02.



Figura 02 Fatores que influenciam e afetam o envelhecimento (RUIZ MARTÍNEZ & MORALES HERNÁNDEZ, 2015).

Os radicais livres são subprodutos de um metabolismo estável que conduzem a danos oxidativos a biomacromoléculas, “são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica” (BARREIROS et al., 2006) e em caso de excesso, esses subprodutos podem danificar o DNA, as proteínas, os lipídios e os carboidratos (WISEMAN & HALLIWELL, 1996). Segundo pesquisas, é comprovado que os radicais livres afetam o envelhecimento e alguns processos patológicos como a inflamação, doenças cardíacas, entre outras (BABIOR, 2000).

Esses radicais representam qualquer tipo de espécie molecular que possui elétrons desemparelhados em seu orbitário, além disso são elementos instáveis que participam de reações químicas (YANGTHONG et al., 2009). São importantes para o envelhecimento, como são muito reativos, a sua ativação pode causar danos aos tecidos, através da separação das cadeias (CÓRDOVA & NAVAS, 2000).

Diante disso, o organismo apresenta mecanismos eficazes de proteção contra esses radicais, formados por um grupo de enzimas e compostos antioxidantes que conservam essas espécies fortemente reativas em concentrações subtóxicas

(CADENAS, 1989). Antioxidantes são substâncias presentes no organismo humano, que possuem a finalidade de equilibrar as moléculas oxidantes, tendo o objetivo de minimizar ou até mesmo bloquear as reações de oxidação resultantes de radicais livres (MAGALHÃES, 2000).

Quando então acontece um erro nesse equilíbrio, causando uma desarmonia entre os processos de produção e destruição das espécies reativas de oxigênio, inicia-se uma condição em que o ataque oxidativo das biomoléculas possui vantagens, ocorrendo alguns processos fisiológicos e patológicos, como exemplo o envelhecimento cutâneo (HARMAN, 1992).

Com isso, há um interesse na área da cosmetologia para evitar e aliviar o envelhecimento epitelial através de uma procura em pesquisas que evidenciem substâncias com ação antioxidante eficiente, que estão relacionadas nos produtos cosméticos aos compradores (MAGALHÃES, 2000). Tais substâncias que possuem essa ação, podem ser tanto ingeridas na dieta quanto produzidas no próprio organismo, que é o caso da melatonina (BARREIROS et al., 2006).

Há indícios que apontam que o envelhecimento possui uma grande influência na desregulação da resposta imune inata (LIANG et al., 2009). Quanto maior a idade, maior é a vulnerabilidade a infecções, sejam elas causadas através de fungos, bactérias ou vírus (GINALDI et al., 2001). Além de tudo, as pesquisas mostraram que algumas funções dos macrófagos ficaram comprometidas com o aumento da idade, contendo a quimiotaxia, fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e até mesmo a indução de algumas respostas de citocinas (KISSIN et al., 1997; TASAT et al., 2003). Com isso, a modificação das funções dessas células pode representar um importante papel nos métodos de defesa (GARDIZANI et al., 2017).

A fagocitose é um recurso do sistema imunológico inato. No decorrer desse procedimento, os receptores de suas membranas reconhecem uma substância estranha no organismo, um patógeno por exemplo, e então os englobam através de invaginações da membrana citoplasmática, e os deixam em uma vesícula chamada de fagossoma (LAMBETH, 2004; UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Essa vesícula, se une aos lisossomos, dando origem ao fagolisossomo, que tem como objetivo a destruição do microrganismo, onde depois da destruição o mesmo é eliminado da

célula. E nessa fase, acontece a projeção de sinais onde ativam algumas enzimas que possuem capacidade de transformar o oxigênio molecular em EROs, a conversão acontece através da enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MURPHY et al., 2014; PAAPE et al., 2002).

Em seguida, ocorre então a apresentação de antígenos às células do sistema imune, com finalidade de liberar os anticorpos específicos, e também reparar o tecido lesionado (LAMBETH, 2004). Posteriormente, a ativação dos fagócitos depois do mesmo ter reconhecido o agente invasor, proporciona algumas modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas na sua célula (ENANE et al., 1993).

O fagolisossomo possui alguns componentes tóxicos que são espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As EROs são resultantes do sistema NADPH-oxidase, que estão localizadas na membrana fagocitária, e que por sua vez produzem os radicais livres, que quando reagem com outras moléculas podem formar altas quantidades de peróxido e superóxido de hidrogênio (MOR et al., 1987; SEIDER et al., 2010).

Dentre os fagócitos mais importantes estão, os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e monócitos que necessitam identificar o microrganismo através de receptores de membrana (BILLER-TAKANASHI et al., 2013). Após sua ativação liberam citocinas (proteínas que emitem sinais de inflamação) no tecido prejudicado para realizar a migração dos outros fagócitos e proteínas de defesa impedindo que haja a propagação da doença no organismo do indivíduo (BILLER-TAKAHASHI et al., 2013; STUART & EZEKOWITZ, 2005).

Enquanto ocorre a fagocitose, acontece também a formação de ERO, e em consequência a produção de radicais livres resultantes, são essas substâncias que auxiliam na produção de compostos bactericidas para eliminar os microrganismos (BILLER-TAKAHASHI & URBINATI 2014; BILLER-TAKAHASHI et al., 2015).

Quando produzidos, os radicais livres podem interagir com aminoácidos e proteínas dos microrganismos dificultando as ligações bioquímicas, fazendo com que desative a atividade enzimática, modificando o transporte ativo, e assim resultando numa destruição celular (BARREIROS et al., 2006). Logo, os resultados obtidos através da fagocitose (seus produtos e subprodutos) são altamente tóxicos e serão o suporte de um mecanismo de defesa eficiente contra patógenos (VOGT, 1995).

Um exemplo de patógeno a ser fagocitado é a *Escherichia coli* por possuir um grande destaque para a saúde da população, com isso é uma das bactérias mais pesquisadas no mundo (KUHNERT et al., 2000). A *Escherichia coli* é um constituinte da microbiota intestinal de humanos e de animais. É uma bactéria gram-negativa, possui formato de bacilo, e pertence à família *Enterobacteriaceae* (COURA et al., 2014; KAPER et al., 2004).

Algumas características do fenótipo e do genótipo desta bactéria possibilitam a visualização de cepas patogênicas (COURA et al., 2014). Foram então retratados alguns patógenos que causam diarreia, sendo eles: a enteropatogênica (EPEC), entero-hemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (CECA), enteroinvasiva (EIEC) e por fim difusa-aderente (DAEC) (KAPER et al., 2004).

E. coli é utilizada como critério para verificar se há contaminação de fezes na água e/ou alimentos (OMS, 2011). Para que uma bactéria seja escolhida para essa função deve estar constantemente presente nas fezes dos humanos e de alguns animais, serem facilmente identificadas, não se desenvolverem em águas naturais, estarem presentes em fluídos residenciais e serem obrigatoriamente de origem fecal, porém não há existência de nenhuma bactéria que cumpre todos esses requisitos, mas a *E. coli* é a que chega mais perto (BARRELL et al., 2002).

Visto que ainda não houveram estudos com o uso da melatonina emulsionada na MEL sobre os radicais livres, uma vez que a mesma possui capacidade antioxidante natural do próprio organismo, e age sequestrando esses radicais e retardando o envelhecimento. Caso seja constatado um resultado positivo, poderá ser desenvolvido um produto cuja o propósito será diminuir os sinais anti-idade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a modulação de fagócitos, com o uso da melatonina incorporado a um sistema microemulsionado.

2.2 Objetivos específicos

- Formular um sistema de ME incorporado com a melatonina;
- Caracterizar reologicamente da melatonina adsorvida em um sistema de ME;
- Avaliar a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico com a melatonina adsorvida a um sistema microemulsionado;
- Avaliar a atividade fagocítica de células mononucleares do sangue periférico com a melatonina adsorvida em um sistema de ME;
- Avaliar a atividade antioxidante da melatonina através da enzima superóxido dismutase;
- Avaliar a influencia da viscosidade na fagocitose pela correlação de Pearson.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento do sistema microemulsionado

Os componentes utilizados já possuíam concentrações pré-estabelecidas, em que cada composto variou de 10 a 70%.

Para produzir então as microemulsões (ME) foram utilizados água destilada, como fase aquosa, triglicérides de ácido cáprico/caprílico (Emfael, Betim, Brasil), como fase oleosa, Oletado de sorbitano (Span 80®) (Emfael, Betim, Brasil), como tensoativo, Polissorbato 80 (Tween 80®) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), como tensoativo e 1-butanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) como co-tensoativo (RIBEIRO, 2015). Estes componentes foram utilizados nas seguintes proporções (Tabela 1):

Tabela 01. Desenvolvimento do sistema microemulsionado.

COMPONENTE	VOLUME (mL)	PORCENTAGEM (%)
Água	1,34	14,85
TACC	1,35	14,96
Span 80	2,2	24,39
Tween 80	3,5	38,80
Butanol	0,63	6,68

Após 24 horas a uma temperatura laboratorial (25°C) as amostras foram visualmente classificadas, em microemulsão líquida (MEL), microemulsão gel (MEG), emulsão líquida (EL), emulsão gel (EG) e separação de fases (SF).

3.2 Caracterização reológica

A análise foi realizada pelo Modular Compact Rheometer – MCR 102 (Anton Paar GmbH, Ostfildern, Germany). Nos experimentos executados foram divididos quatro grupos para os testes reológicos, um contendo 600 µL de sangue, 550 µL de sangue com 50 µL a MEL, 550 µL de sangue com 50 µL de melatonina, e o outro

contendo também 550 μL de sangue com 50 μL de melatonina incorporada na MEL, essas amostras foram aplicadas sobre a placa de leitura e retirado o excesso das amostras.

As leituras foram realizadas com controle permanente do gap de medição com suporte TruGap™ em 0,099 mm, célula de medição tipo cone Toolmaster™ CP 50 (ângulo 1°) e controle preciso da temperatura com recurso TReady™, utilizando Software Rheoplus V3.61. Os gráficos reológicos foram todos realizados com o Software Rheoplus. Para as curvas de fluxo e viscosidade os parâmetros estabelecidos foram baseados no controle da tensão de cisalhamento (τ) de 0 a 5 Pa para curva ascendente e de 5 a 0 Pa para a curva descendente. Esses testes foram feitos em temperaturas de 37°C, com um $n= 5$ amostras em cada grupo. Com a obtenção dos dados da curva de fluxo de cada amostra foi possível determinar a área de histerese, que simboliza os níveis de diferença entre a curva ascendente e a descendente.

3.3 Obtenção de amostras de sangue periférico

Foram coletadas 5mL de sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis na faixa etária de 19 a 25 anos de idade. Todos os indivíduos que doaram estavam cientes no momento da coleta mediante termo de consentimento livre e esclarecido de que o sangue seria destinado para fins de pesquisa. O presente trabalho foi aprovado no comitê de ética de acordo com ANEXO I.

3.4 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

A obtenção das PBMC foi realizada por gradiente de densidade utilizando Ficoll Paque Plus® (GE Healthcare). Foi adicionado 3 mL de Ficoll Paque Plus® acrescidos de 5 mL de sangue no tubo falcon® (15mL). As amostras foram centrifugadas por 40 minutos a 1600 rpm. Em seguida, com auxílio de uma pipeta pasteur®, foi realizado a coleta do anel de PBMC. Após essa retirada as células foram lavadas (2x) em solução salina tamponada (PBS). Na sequência, foi realizado a contagem na câmara de Neubauer, e ajustadas a uma concentração de 2×10^6 células/mL.

3.5 Preparo da cultura da bactéria *Escherichia coli* enteropatogênica

Foi utilizada *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sorotipo 0111: H- AL-, eae+ eaf+ bfp+ e conservada a -70 °C. A cultura de estoque foi armazenada em ágar semisólido a temperatura laboratorial e em ausência de luz. Com a utilização dessa cultura de estoque, foram realizados repiques 24 horas antes do ensaio em tubos contendo caldo BHI de 10 mL, e estes foram incubados em estufas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS, e a concentração ajustada para 1×10^7 bactérias por mL, medidas então com o espectrofotômetro (540 nm, DO= 0,1).

3.6 Viabilidade celular e Ensaio da fagocitose

Após o ajuste da concentração celular, foram pipetadas 500 µL de sangue e centrifugadas por uma rotação de 1600 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o material foi descartado somente o sobrenadante e o *pellet* homogeneizado com 200 µL de Acridina Orange, é um corante vital com intuito de avaliar a viabilidade sendo assim colore as células vivas de verde e as mortas de amarelas, permaneceu em contato com a célula por 1 minuto acrescentando 5 mL de PBS. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1600 rpm, para lavagem foi repetida por duas vezes. Após a lavagem das células, acrescentou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi desfeito. Foi pipetado 10 µL de células em uma lâmina, colocou-se então a lamínula e realizou a contagem em microscópio de fluorescência na objetiva de 40X.

A fagocitose foi avaliada através do corante Acridina Orange. Na formação da suspensão das bactérias com as células utilizou-se 250 µL de bactérias e 250 µL células, foram misturados e incubados a 37°C por 30 minutos. As suspensões de bactérias e células foram divididas nos seguintes grupos:

Grupo 1: 250µL de células + 250 µL de EPEC

Grupo 2: 50 µL de MEL + 250µL de células + 250 µL de EPEC

Grupo 3: 50 µL de melatonina + 250µL de células + 250 µL de EPEC

Grupo 4: 50 µL de MEL com melatonina + 250µL de células + 250 µL de EPEC

E então foi adicionado PBS (gelado) nas amostras que foram centrifugadas

duas vezes por 10 minutos. E então foi utilizado 200 uL de acridina para corar as células, durante 1 minuto e em seguida lavado com PBS. Continuamente foram montadas as lâminas para a contagem de *E. coli* com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Nikon®- Eclipse E200). Para a definição do índice de fagocitose foi necessário corar as células para a contagem de 100 bactérias por lâmina. E então para a classificação das bactérias vivas e mortas, são consideradas que as bactérias que possui coloração verde são vivas, e as de coloração laranja são mortas. E para considerar uma fagocitose positiva é necessário que as bactérias estivessem internalizadas nos leucócitos (HONORIO-FRANÇA, 1997).

3.7 Atividade enzimática da superóxido dismutase

A determinação da atividade da SOD foi realizada pelo método de redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) compõe-se na ação da enzima catalisar por meio de transformação o peróxido de hidrogênio e o superóxido de oxigênio. A enzima SOD presente na amostra inibe a redução do NBT pelo ânion superóxido. O ânion superóxido é gerado a partir da autooxidação da hidroxilamina em pH alcalino.

A atividade enzimática da Cu-Zn SOD foi realizada com as suspensões de células MN. Foram pipetados 0,5 mL de cada amostra e colocados em tubos de ensaio (vidro), conforme protocolos produzidos no laboratório. Em seguida adicionou-se 0,5 mL em cada amostra de mistura clorofórmio-etanol (1:1), 0,5 mL da mistura reativa de NBT em conjunto com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1:1.5) e 2,0 mL de tampão carbonato com hidroxilamina, perfazendo ao final uma solução com volume de 3,5 mL. A mistura reativa foi utilizada como branco para calibrar o aparelho. A análise do padrão foi realizado da mesma forma substituindo amostra pela mistura hidro-alcoólica 0,5 mL (1:4), 0,5 mL de mistura clorofórmio-etanol (1:1), 0,5 mL da mistura reativa de NBT e EDTA (1:1.5) e 2,0 mL de tampão carbonato com hidroxilamina.

Todas as amostras foram incubadas em temperatura laboratorial por 15 minutos ao abrigo da luz e após esse período a reação foi paralisada em gelo. A quantidade de enzima foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$SOD = \frac{Abs.Padiao - Abs.Amostra}{Abs.Padiao} \times 100 = \% \text{ de redução do NBT SOD. O resultado}$$

foi expresso unidades internacionais (UI) de SOD (NOVELLI et al., 1993).

3.8 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey). Foi avaliado também a relação entre viscosidade e fagocitose utilizando o teste de correlação de Pearson. Os dados foram analisados no Software Bioestat 5.0 adotando um nível de confiança de 95% e nível significativo de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da mistura de tensoativos

A proporção do co-tensoativo butanol, foi fixada em 10% e já dos tensoativos Spam 80 e Tween 80 obteve-se as suas porcentagens através de cálculos que tinham como finalidade atingir o equilíbrio hidrofílico lipofílico (EHL) resultante da mistura de tensoativos proposto pelo Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico de apenas uma amostra que foi escolhida aleatoriamente (Tabela 2). Assim, a mistura de tensoativos SP/TW/BT foi na fração de 3,5:5,5:1,0 em que resultou no EHL requerido pela fase oleosa:

Tabela 2. Valores calculados de porcentagem e EHL resultante da mistura de tensoativos.

Mistura de Tensoativos	SP (%)	TW (%)	BT (%)	EHL
SP/TW/BT	35	55	10	10,80

SP: Spam 80; TW: Tween 80; BT: butanol; EHL: resultante da mistura de tensoativos.

Pesquisas revelam que um valor de EHL alto, são de características mais hidrofílicas, também permitem um menor crescimento do núcleo e uma diminuição do tamanho final da partícula (HOUSAINDOKHT & POUR, 2012). Valores esses referentes aos observados no presente estudo.

Já são esperados esse tipo de resultado pois o ajuste adequado do EHL possui competência para originar sistemas menor de 100 nm, ocasionando então sistemas com uma maior estabilidade termodinâmica (ABOOFAZELI et al., 2000). Este trabalho teve auxílio dessa técnica onde proporcionou a criação de diagramas com uma grande área de sistemas estáveis.

4.2 Desenvolvimento do sistema microemulsionado

Os diagramas de fases pseudoternário tem o objetivo de classificar os pontos e domínios das regiões das ME's. A junção dos tensoativos SP/TW/BT com o Triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico e a água destilada derivou 36 pontos com

características diferentes sendo esses representados abaixo pelas Figura 3 e 4:

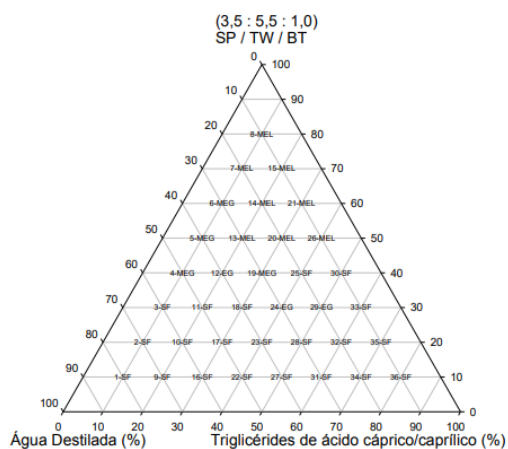


Figura 03. Diagrama Pseudoternário das 36 amostras de ME's (RIBEIRO, 2015).

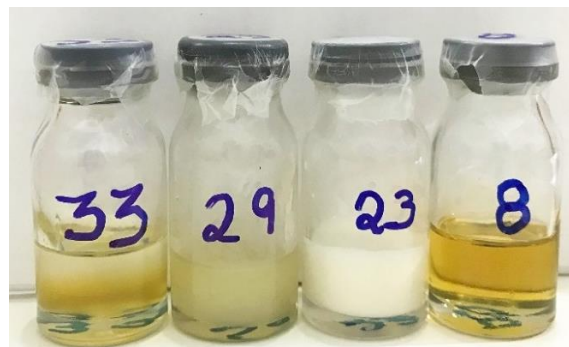


Figura 04. Sistema microemulsionado de 4 amostras como exemplo, 33: separação de fases; 29: emulsão gel; 23: emulsão líquida; e 8: MEL líquida (acervo pessoal).

Os pontos do diagrama pseudoternário selecionados para este trabalho foram na região de MEL e realizado uma nova titulação com 18 novas concentrações (Figura 5). Pesquisando o comportamento das fases observa-se que o sistema de tensoativos produziu grandes faixas de sistemas estáveis. Logo a região que se localiza abaixo de 40% de tensoativo representa uma instabilidade e uma separação de fases. Trabalhos como o de De Melo Cotrim (2016) corroboram com os resultados, apresentando em sua pesquisa resultados parecidos.

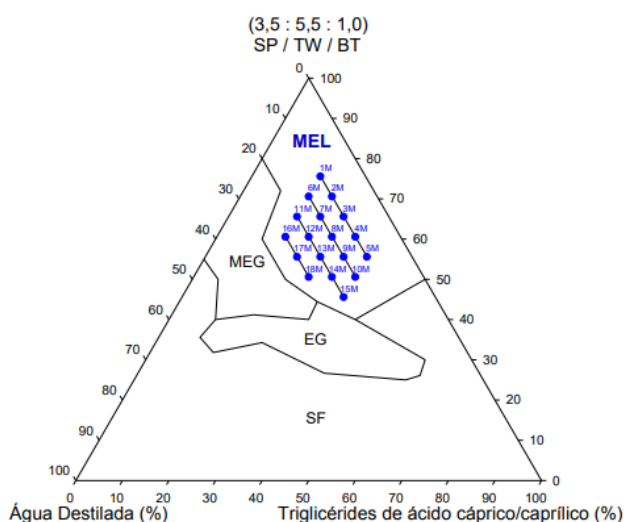


Figura 05. Titulações de 18 concentrações na fase de MEL (RIBEIRO, 2015).

4.3 Caracterização reológica

Foram avaliados quatro grupos, sendo eles: o grupo controle (células sanguíneas), grupo com células e com a microemulsão, grupo com células e melatonina e um quarto grupo que continha célula, melatonina adsorvida a microemulsão. A seguir os quatro grupos serão representados pelo gráfico da curva de fluxo (Figura 04) e da viscosidade (Figura 05). As amostras apresentaram curva de fluxo característica de fluidos não-newtonianos por apresentar uma relação não linear entre a curva ascendente e descendente. (Figura 04).

As propriedades reológicas de microemulsões dependem do tipo, forma, densidade e número de componentes presentes na formulação, bem como as interações entre eles. Assim, mudanças microestruturais são refletidas na reologia da microemulsão (ACHARYA & HARTLEY, 2012).

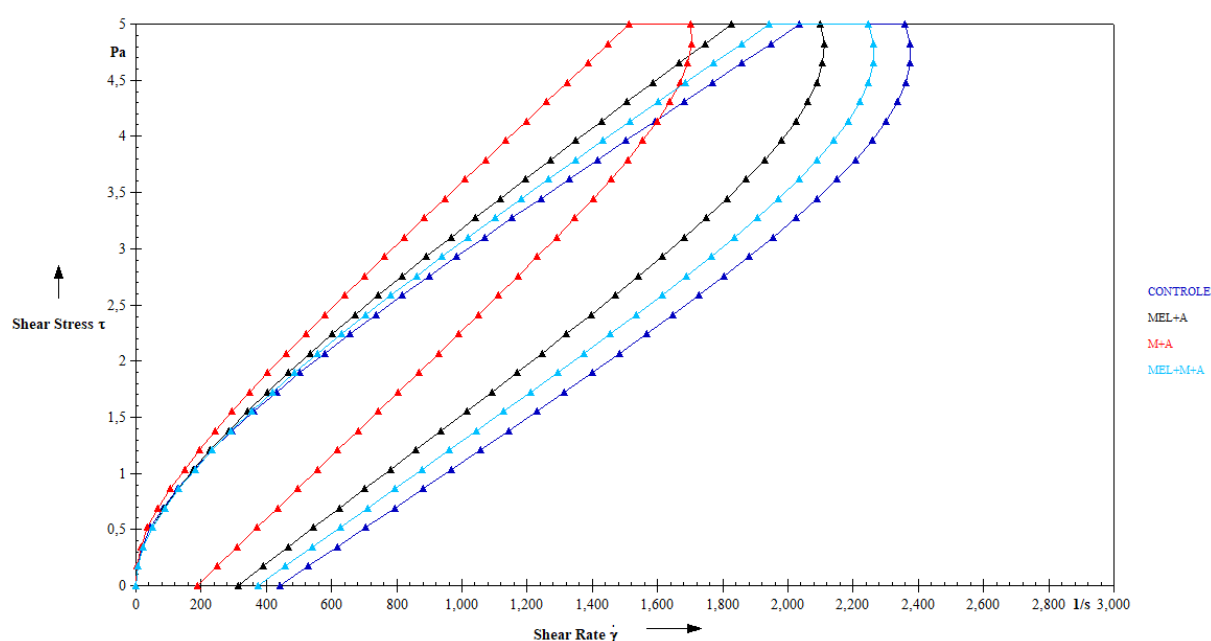


Figura 06. Curva de fluxo dos grupos controle (célula); grupo com MEL e células; com melatonina (M) e células e por fim, grupo com a MEL com a melatonina e com as células (acervo pessoal).

Os grupos ilustrados mostram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$), sendo assim o sangue não perdeu a sua característica de fluido não-Newtoniano. Segundo a pesquisa de Ribeiro (2015), a microemulsão não é capaz de alterar o fluido do sangue, com isso não houve alteração comportamental. A amostra utilizada nesse

trabalho, apresenta características de fluido não-Newtoniano que é possível identificar devido a presença da área de histerese, relacionado com a tensão de cisalhamento aplicada nos fluidos utilizados. O valor da área de histerese entre 0 e ± 1 Pa.s resulta no fluxo newtoniano, e valor menor que -1 Pa.s resulta em fluxo não-newtoniano e valores maiores que +1 Pa.s resultam fluxo não-newtoniano (SCHERER et al., 2016).

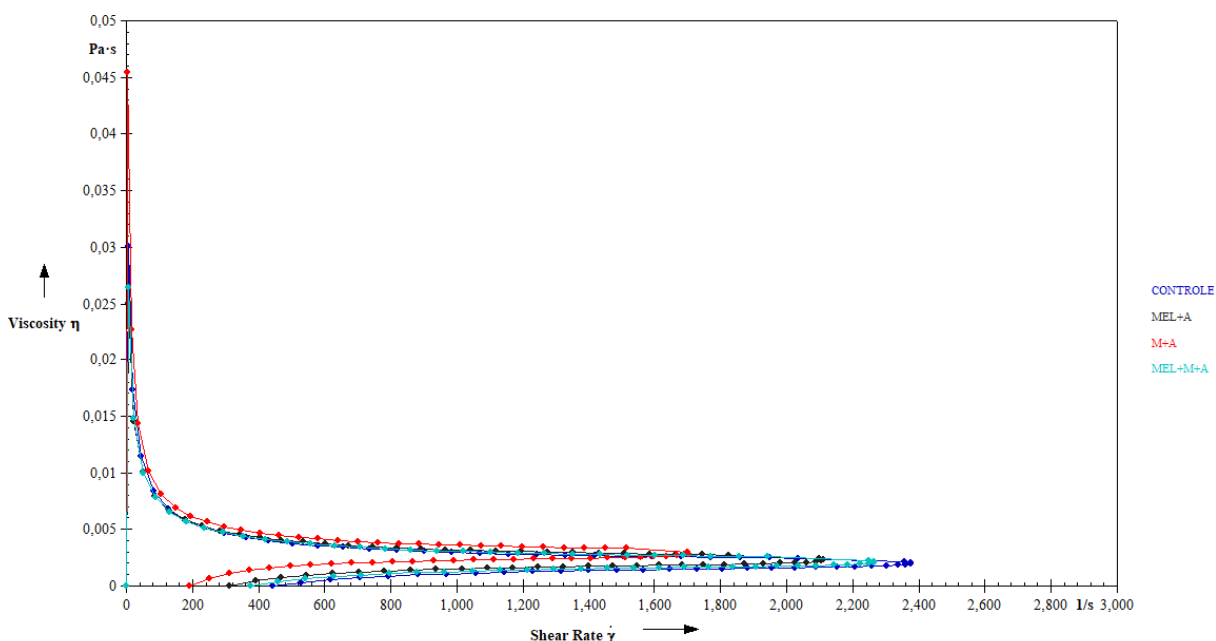


Figura 07. Viscosidade dos grupos controle (célula); grupo com MEL e células; com melatonina (M) células e por fim, grupo com a MEL com a melatonina e com as células (acervo pessoal).

O gráfico acima (Fig. 05) demonstra a viscosidade do fluido, em que o grupo que apresenta apenas a melatonina aumentou a viscosidade da amostra ($p < 0,05$), já o grupo que contém a MEL com ou sem a melatonina possui a capacidade de corrigir o efeito negativo que a melatonina sozinha causa. Trabalhos realizados comprovam a influência da viscosidade quando adicionado a MEL mostrando que a mesma não altera a viscosidade do fluido (ROJAS et al., 2009; ACHARYA & HARTLEY, 2012).

Através do teste estatístico foi comprovado que o grupo que apresenta apenas a melatonina altera a viscosidade do sangue, e prova também que a ME consegue melhorar esse efeito (Tabela 3).

Tabela 3 – Viscosidade sanguínea.

GRUPOS:	VALOR DA VISCOSIDADE (Pa.s):	VALOR DE p:
Células x MEL/Células	$3,2.10^{-3} \pm 2,1.10^{-4}$	0,3501
Células x M/Células	$3,9.10^{-3} \pm 9,3.10^{-4}$	0,0015
Células x MEL/M/Células	$3,2.10^{-3} \pm 1,5.10^{-4}$	0,9633
MEL/Células x M/Células	$4,0.10^{-3} \pm 8,9.10^{-4}$	0,0038
MEL/Células x MEL/M/Células	$3,2.10^{-3} \pm 2,4.10^{-4}$	0,4425
M/Células x MEL/M/Células	$3,9.10^{-3} \pm 9,4.10^{-4}$	0,0019

Média e desvio padrão da viscosidade e análises estatísticas dos grupos comparando, células e MEL com células; células e melatonina com células; células e melatonina emulsionada a MEL com células; MEL com células e melatonina com células; MEL com células e melatonina emulsionada a MEL com células; melatonina com células e melatonina emulsionada a MEL com células.

4.4 Viabilidade

O índice de viabilidade celular encontra na Tabela 4, em que foram analisados os ensaios de viabilidade por cerca de 30 minutos tanto do grupo controle quanto dos grupos experimentais, foi evidenciado que todos os grupos apresentaram viabilidade celular superior a 98%.

Tabela 4- Viabilidade celular.

GRUPOS	VIABILIDADE CELULAR (%)
Controle	99,2±0,83
Mel + C	99±1
M + C	98,8±1,30
Mel + M + C	99,8±0,44

Os dados representam a média $\pm$ o desvio padrão (DP) e análises estatísticas, $p=0,4040$ dos grupos controle (célula); grupo com MEL e células; com melatonina (M) e células e por fim, grupo com a MEL com a melatonina e com as células.

Gómez-Gallego (2015) contribui para os valores estatísticos de viabilidade, obtiveram uma viabilidade celular $\geq 90\%$ nos grupos que contem a MEL.

4.5 Índice de Fagocitose

A Figura 06 ilustra a fagocitose dos quatro grupos. Observa-se que o grupo incumbado com os estímulos (MEL, M E MEL+M) apresentaram maior índice de fagocitose em relação ao grupo controle, isso se repete no grupo que apresenta apenas a melatonina. A fagocitose foi superior quando adicionada a melatonina a microemulsão.

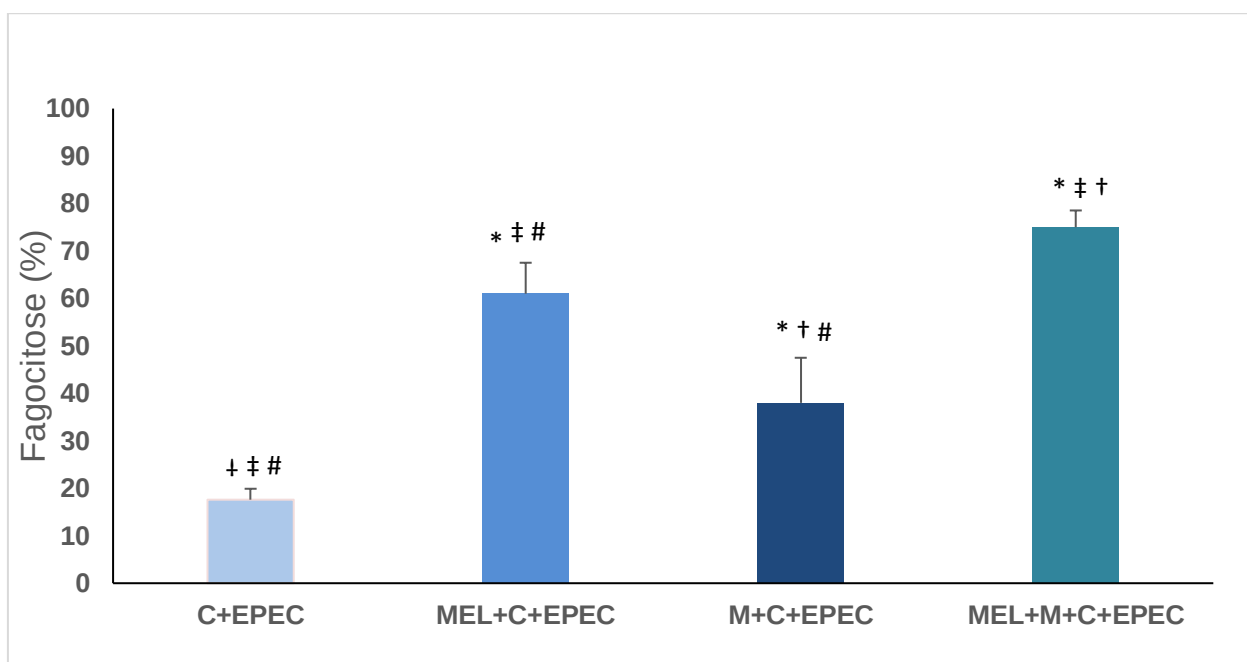


Figura 08. Índice de fagocitose dos grupos células com EPEC, microemulsão com células e EPEC, melatonina com células e EPEC, e microemulsão com melatonina células e EPEC (acervo pessoal).

* Diferenças com relação ao grupo CONTROLE + EPEC;

† Diferenças com relação ao grupo MEL + C + EPEC;

‡ Diferenças com relação ao grupo M + C + EPEC;

Diferenças com relação ao grupo MEL + M + C + EPEC;

No presente trabalho, os grupos com a MEL apresentam maior índice de fagocitose quando comparadas ao grupo incubado apenas com melatonina, mas o grupo com a melatonina incorporado a MEL se sobressaiu em relação a todos os demais. No grupo controle (células) o índice de fagocitose foi de $17,6 \pm 2,3\%$, no grupo com a microemulsão foi de $61 \pm 6,5\%$, no grupo com a melatonina $38 \pm 9,5\%$ e no grupo com a microemulsão e a melatonina $75 \pm 3,5\%$. Nos estudos de Ribeiro (2015) o grupo com a MEL também teve um maior aumento no índice de fagocitose

A tabela 5 apresenta e compara os índices de fagocitose entre os grupos incubados com aos diferentes estímulos a diferença estatística realizado através do teste de Tukey entre os grupos da fagocitose, em que mostra que todas as amostras se diferenciaram.

Tabela 5- Índice de fagocitose.

GRUPOS:	INDICE DE FAGOCITOSE (%):	VALOR DE p:
Célula x MEL/Célula	39,3±23,22	<0,001
Célula x M/Célula	27,8±12,59	<0,001
Célula x MEL/M/Célula	46,3±30,38	<0,001
MEL/Célula x M/Célula	49,5±14,37	0,002
MEL/Célula x MEL/M/Célula	68±8,88	0,002
M/Célula x MEL/M/Célula	56,5±20,65	<0,001

Média e desvio padrão e análises estatísticas da fagocitose dos grupos dos grupos controle (célula) relacionado com o MEL e células; células com melatonina (M) e células; célula com MEL, melatonina e células; MEL e células relacionados com melatonina e células; MEL e células com MEL, melatonina e células; melatonina com células e MEL com melatonina e células.

4.6 Atividade enzimática da superóxido dismutase

Observa-se que a bactéria apresentou maior concentração da SOD em relação aos fagócitos. Isso mostra que a EPEC apresenta um bom sistema de defesa antioxidante, antes mesmo de ser atacada pelas células MN, Figura 07.

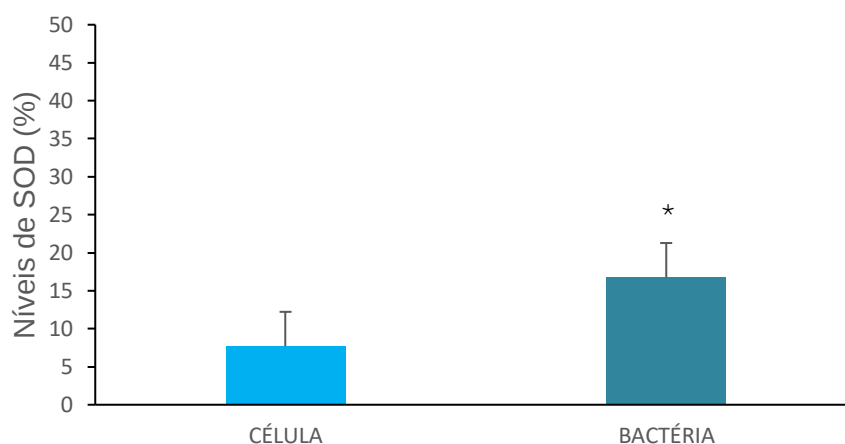


Figura 09. Níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) entre grupos com célula e bactéria (acervo pessoal)

* $p=0,0310$.

Na presença dos fagócitos a EPEC reduz significativamente ($p<0,05$) sua defesa antioxidante, caracterizada pela redução dos níveis da SOD, Figura 08.

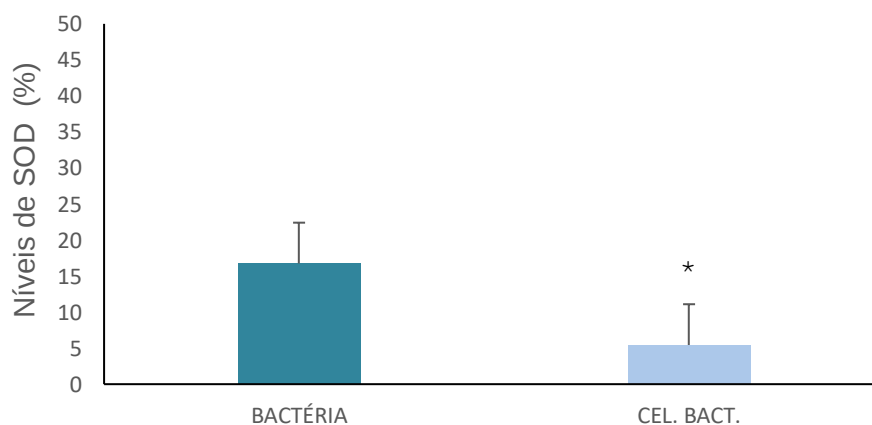


Figura 10. Níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) entre grupos com bactéria e células + bactérias (acervo pessoal).

* $p=0,0015$.

A melatonina proporcionou um aumento na concentração da SOD. Dessa forma, pode ser que o efeito antioxidante da melatonina foi somado ao efeito antioxidante da SOD, Figura 09.

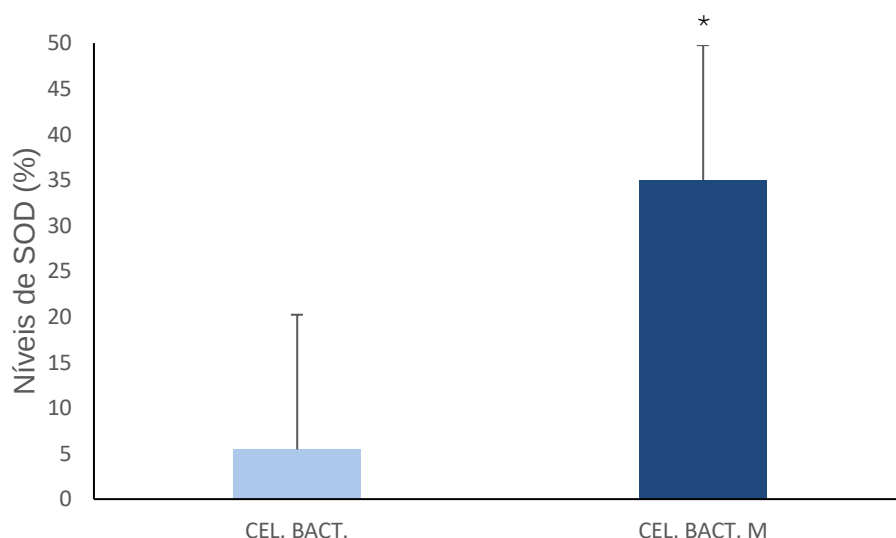


Figura 11. Níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) entre grupos com células + bactérias e células + bactéria + melatonina (acervo pessoal).

*p=0,0272

Apesar desse radical possuir alguns efeitos ruins, ele apresenta uma fundamental importância para as células imunológicas, na sua ausência o organismo fica vulnerável a infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. Esse radical é produzido *in vivo* durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos, através de fagócitos ou linfócitos e fibroblastos (BARREIROS & DAVID, 2006). A SOD é um dos mais poderosos antioxidantes enzimáticos intracelulares capaz de eliminar a superprodução de ERO's e repara danos celulares (CARVALHO, 2012; KURUTAS, 2016). Trabalhos realizados como Rosa (2010), intensificam resultados positivos sobre o uso da melatonina relacionados a SOD, em que mostra que a atividade da SOD teve um aumento de 57% nos ratos que foram tratados com a melatonina comparando com grupos de ratos que não receberam.

4.7 Correlação entre Viscosidade e Fagocitose

Na Tabela 6 foi comparado os valores estatísticos de fagocitose e de viscosidade. Porém seu efeito será positivo ou negativo dependendo do paciente, se for um paciente saudável provavelmente terá um efeito negativo podendo ocasionar até uma parada cardíaca, já em pacientes com hemorragias por exemplo, neste caso uma maior viscosidade ajudaria a diminuir o fluxo sanguíneo.

Tabela 6- Correlação entre grupos

	CÉLULA	MEL + C	M + C	MEL + M + C
VALOR DE r	0,1461	-0,441	0,5839	-0,8561
VALOR DE p	$1,39 \times 10^{-7}$	$2,85 \times 10^{-8}$	$2,04 \times 10^{-5}$	$4,31 \times 10^{-11}$

Correlação entre viscosidade e fagocitose dos grupos controle (célula); grupo com MEL e células; com melatonina (M) e células e por fim, grupo com a MEL com a melatonina e com as células.

Os grupos ilustrados acima apresentam relação linear entre as amostras e mostram a correlação da fagocitose com a viscosidade. O grupo controle e o grupo com apenas a melatonina apresentaram uma correlação diretamente proporcional, já o grupo com a MEL e com a melatonina adsorvida ao sistema microemulsionado teve efeito inversamente proporcional.

A análise de correlação de Pearson mede o grau entre duas variáveis, que mede a afinidade das mesmas, os valores mais próximos de 1 ou -1 são consideráveis uma correlação forte onde 1 ilustra uma correlação positiva e -1 negativa. Logo os valores que estão mais próximos de 0 apresenta a correlação fraca. Na Tabela 6, os resultados obtidos revelam que o grupo que apresenta a MEL+ Melatonina + C possui uma correlação mais forte que as demais, indicando que a viscosidade influencia na fagocitose.

5. CONCLUSÃO

- A caracterização reológica mostrou que a melatonina incorporada na microemulsão não alterou a curva de fluxo.
- Houve aumento da viscosidade induzido pela melatonina livre, porem quando incorporada a microemulsão ocorre a redução da viscosidade para valores dentro do normal.
- A viabilidade celular foi superior a 98% em todos os grupos.
- Houve aumento no índice de fagocitose em todos os grupos incubados com estímulo, sendo superior no grupo em que a melatonina adsorvida a microemulsão.
- A melatonina comprovou seu efeito antioxidante proporcionando um aumento da atividade da SOD.
- A correlação de Pearson mostrou uma correlação forte e inversamente proporcional entre a fagocitose e viscosidade do grupo contendo microemulsão líquida melatonina e célula

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D. J.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated phospholipid microemulsions: I. Total intensity light scattering. **AAPS Pharm SciTech**, v. 2, n. 2, p. 27, 2000.

ACHARYA, D. P.; HARTLEY, P. G. Progresso na caracterização de microemulsões. Opinião atual em **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 274-280, 2012.

ACTIS, G. C.; VOLPES, R.; RIZZETTO, M. Oral microemulsion cyclosporin to reduce steroids rapidly in chronic active ulcerative colitis. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 905-908, 1999.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and molecular life sciences**. v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**. v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**. v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BARRELL, R. et al. The Microbiology of Drinking Water-Water Quality and Public Health-Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. United Kingdom: **Environment Agency**, 2002.

BENITA, S. ed., Submicron emulsion in drug targeting and delivery, **Harwood Academic: Amsterdam**, 1998.

BHARGAVA, H. N; NARURKAR, A; LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**. V. 11, n. 3, p 46-54, 1987.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**. v. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. et al. The immune system is limited by oxidative stress: dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 47, n. 1, p. 360-367, 2015.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.

CADENAS, Enrique. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual review of biochemistry**. v. 58, n. 1, p. 79-110, 1989.

CARRILLO-VICO, A. et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 189-200, 2005.

CARVALHO, L. F. P. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com endometriose pélvica. 138f. **Tese (Doutorado em Medicina)** - Universidade Federal de São Paulo, Programa de Obstetrícia e Ginecologia, São Paulo, 2012.

CASADO, C. S., et al. Efecto protector de la melatonina y del tratamiento tópico con la mezcla eutéctica de lidocaína y prilocaína em um modelo de isquemia reperfusion en el colgaio cutáneo microvascularizado en ratas. **Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana**, v38, n. 3, p. 195-206, 2012

CONSTANTINIDES, P. P., et al. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. **Pharmaceutical research**. v. 11, n. 10, p. 1385-1390, 1994.

CONSTANTINIDES, P. P., et al. Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids/salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. **Pharmaceutical research**, v. 13, n. 2, p. 210-215, 1996.

CÓRDOVA, A.; NAVAS, F. J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 6, n. 5, p. 204-208, 2000.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de Escherichia coli causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.

DE MELO COTRIM, A. C.; HONORIO-FRANCA, A. C.; LUZIA FRANÇA, E.. Rheology analysis can be added in thermal stability test for design microemulsion materials. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 6, n. 2, 2016.

EMET, M. et al. A review of melatonin, its receptors and drugs. **The Eurasian journal of medicine**. v. 48, n. 2, p. 135, 2016.

ENANE, N. A. et al. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. **Immunology**. v. 80, n. 1, p. 68, 1993.

FERNANDES, R. T. S. Ação de agentes imunomoduladores em células mononucleares de colostro em co-cultura com células de tumor de mama. 2018. 135f. **Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste)**- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.

FONKEN, L. K.; NELSON, R. J. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. **Endocrine reviews**. v. 35, n. 4, p. 648-670, 2014.

FORMARIZ, T. P., et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

GARDIZANI, T. P. et al. Phagocytosis and nitric oxide production by peritoneal adherent cells in response to Candida albicans in aging: a collaboration to elucidate the pathogenesis of denture stomatitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 3, p. 265-273, 2017.

GINALDI, L. et al. Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes and Infection**. v. 3, n. 10, p. 851-857, 2001.

GÓMEZ-GALLEGO, D. M.; ESPINAL-CORREA, C. E.; OSSA-GIRALDO, A. C.; Evaluation in vitro of the cytotoxicity and genotoxicity of silica nanoparticle aggregates synthesized by the sol-gel method. **Biotecnologia Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 1201-1206, 2015.

GRADZIELSKI, M. Desenvolvimentos recentes na caracterização de microemulsões. **Opinião atual em Colloid & Interface Science**. v. 13, n. 4, p. 263-269, 2008.

HARDELAND, R. et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in neurobiology**. v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research/DNAging**, v. 275, n. 3-6, p. 257-266, 1992.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**. v. 152, n. 3847, p. 102, 1943.

HONORIO-FRANÇA, A. C. et al. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic Escherichia coli opsonized with colostral IgA. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 46, n. 1, p. 59-66, 1997.

HOUSAINDOKHT, M. R.; POUR, A. N. Study the effect of HLB of surfactant on particle size distribution of hematite nanoparticles prepared via the reverse microemulsion. **Solid State Sciences**, v. 14, n. 5, p. 622-625, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. LT. Pathogenic escherichia coli. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123, 2004.

KISSIN, E. et al. Age-related decline in murine macrophage production of nitric oxide. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 4, p. 1004-1007, 1997.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Rev. v. 54, n. 1, p. 77-98, 2002.

KUHNERT, Pe; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 2015.

LAMBETH, J. David. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, n. 3, p. 181, 2004.

LANGEVIN, D. Microemulsions. **Accounts of Chemical Research**. v. 21, n. 7, p. 255-260, julho. 1988.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**. v. 19, n. 3, p. 257-269, 1994.

LIANG, W. et al. Tea consumption and ischemic stroke risk: a case-control study in southern China. **Stroke**. v. 40, n. 7, p. 2480-2485, 2009.

MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. **Cosmetologia: com questões de avaliação**. Rio de Janeiro: Rubio. p.33- 42, 61-145. 2000.

MONTILLA, P. et al. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. **Journal of Pineal Research**. v. 31, n. 2, p. 138-144, 2001.

MOR, N.; GOREN, M. B. Discrepancy in assessment of phagosome-lysosome fusion with two lysosomal markers in murine macrophages infected with *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 55, n. 7, p. 1663-1667, 1987.

MOURA, E. C. M., et al. Evaluation of anticorrosive effectiveness of thiosemicarbazones solubilized in a microemulsion system. **Química Nova**. v. 36, n. 1, p. 59-62, 2013.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2014. 823p.

NOVELLI, E. L. et al. High dietary carbohydrate and pancreatic lesion. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas**, v. 26, n. 1, p. 31-36, 1993.

OLIVEIRA, A. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**. v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CHAIMOVICH, H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide-based microemulsions on the rate of decomposition of the β -lactam antibiotic cephaclo. **Journal of pharmaceutical sciences**. v. 86, n. 5, p. 616-620, 1997.

PAAPE, M. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PIANOVSKI, A. R. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. 2008. 11f. Monografia (Bacharel em farmácia). Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2008.

PULIMENO, P. et al. Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells. **Diabetologia**. v. 56, n. 3, p. 497-507, 2013.

REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of biomedical Science**. v. 7, n. 6, p. 444-458, 2000.

REITER, R. J. et al. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging: relation to melatonin. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 854, n. 1, p. 410-424, 1998.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MALDONADO, M. D. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. **Journal of pineal research**. v. 39, n. 2, p. 215-216, 2005.

RIBEIRO, E. B. et al. Microemulsions with levamisole delivery systems as novel immunomodulating agents with potential for amebiasis therapies. **Science of**

Advanced Materials, v. 7, n. 1, p. 15-27, 2015.

ROJAS, O. et al. Structural studies of ionic liquid-modified microemulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 333, n. 2, p. 782-790, 2009.

ROSA, D. P. et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 72-78, 2010.

RUIZ MARTÍNEZ, M.; MORALES HERNÁNDEZ, M. Aproximación al tratamiento del envejecimiento cutáneo. **Ars Pharmaceutica**. v. 56, n. 4, p. 183-191, 2015.

SCHERER, E. F., et al. Cytokine modulation of human blood viscosity from vivax malaria patients. **Acta tropica**, v. 158, p. 139-147, 2016.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The Journal of physical chemistry**. v. 63, n. 10, p. 1677-1680, 1959.

SCHWUGER, M. J.; STICKDORN, K.; SCHOMAECKER, R. Microemulsions in technical processes. **Chemical reviews**. v. 95, n. 4, p. 849-864, 1995.

SEIDER, K. et al. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010.

SHARMA, M. K. e SHAH D. O. Introduction to Macro- and Microemulsions. **Macro – and Microemulsions Theory and Applications**. v. 272, n. 1, p 1-18, março. 1985.

SHI, S. et al. Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. **Current Biology**. v. 23, n. 5, p. 372-381, 2013.

SILVA, D. N. N. Tratamento de cascalho de perfuração utilizando sistemas microemulsionados. 64f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2015.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

SOUZA, F. M. Desenvolvimento de microemulsão contendo minoxidil para o tratamento da alopecia. 2017. 99 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 539-550, 2005.

TALEGAONKAR, S. et al. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**. v. 2, n. 3, p. 238-257, 2008.

TASAT, D. R. et al. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. **Aging cell**, v. 2, n. 3, p. 159-164, 2003.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 825-852, 2002.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 93-105, 1995.

VURAL, H. et al. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. **Journal of pineal research**. v. 31, n. 3, p. 193-198, 2001.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Guidelines for Drinking-water Quality**. 4. ed. Geneva, 2011.

WINSOR, P. A. Hydrotrophy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 376-398, 1948.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**. v. 313, n. Pt 1, p. 17, 1996.

YANGTHONG, M.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; PHROMKUNTHONG, W. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. **Plant foods for human nutrition**. v. 64, n. 3, p. 218-223, 2009.

ZHAO, F.; LIU, Z. Q.; WU, D. Antioxidative effect of melatonin on DNA and erythrocytes against free-radical-induced oxidation. **Chemistry and physics of lipids**. v. 151, n. 2, p. 77-84, 2008.

ZHU, W., et al. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. **International journal of pharmaceutics**. v. 378, n. 1-2, p. 152-158, 2009.

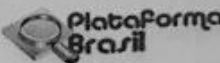
7. ANEXO

UFMT - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - CAMPUS DO ARAGUAIA									
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP									
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: EFEITOS DA OBESIDADE E DIABETE NA RELAÇÃO MATERNO-FETAL: REPERCUSSÕES NEUROIMUNOENDÓCRINAS. Pesquisador: Adenilda Cristina Honorio França Área Temática: Versão: 2 CAAE: 87435318.2.0000.5587 Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso Patrocinador Principal: Financiamento Próprio									
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 2.619.235 Apresentação do Projeto: O projeto está bem apresentado e possui data de início para 01/06/2018. Objetivo da Pesquisa: O objetivo primário do presente projeto é "Avaliar parâmetros imunológicos e hormonais, bem como os efeitos de colostrina, resistina e da melatonina sobre a atividade funcional de fagócitos presentes em sangue materno, sangue de cordão e colostro de mães obesas complicadas por diabetes". Também apresenta como Objetivo Secundário: "Avaliar no sangue e colostro de mães obesas e diabéticas a concentração de: Resistina, Colostrina e melatonina; Citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, TNF, IFN-, TGF-); Quimiocinas (MCP-1, IL-8) Superóxido dismutase (SOD)- Avaliar a atividade funcional de fagócitos do sangue e do colostro de mães obesas e diabéticas na presença de resistina, colostrina e melatonina sobre a: Viabilidade celular Liberação de ânion superóxido; Liberação de cálcio intracelular Apoptose e Necrose".									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="padding: 5px;">Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-CCS</td><td style="padding: 5px;">CEP: 78.698-000</td></tr><tr><td style="padding: 5px;">Bairro: Campus do Araguaia</td><td style="padding: 5px;">Município: PONTAL DO ARAGUAIA</td></tr><tr><td style="padding: 5px;">UF: MT</td><td style="padding: 5px;">E-mail: professoramaryaugusta@gmail.com</td></tr><tr><td style="padding: 5px;">Telefone: (66)3402-1121</td><td></td></tr></table>		Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-CCS	CEP: 78.698-000	Bairro: Campus do Araguaia	Município: PONTAL DO ARAGUAIA	UF: MT	E-mail: professoramaryaugusta@gmail.com	Telefone: (66)3402-1121	
Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-CCS	CEP: 78.698-000								
Bairro: Campus do Araguaia	Município: PONTAL DO ARAGUAIA								
UF: MT	E-mail: professoramaryaugusta@gmail.com								
Telefone: (66)3402-1121									

Página 01 de 02



UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO -
CAMPUS DO ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 2.619.235

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são definidos pelos pesquisadores como "mínimos" e estão apresentados no TCLE. Quanto aos benefícios, são relatados que: "As principais contribuições científicas da proposta é que visa elucidar o entendimento dos fatores neuroimunoendócrino presentes no sangue e leite materno de mães obesas e diabéticas com vistas a melhoria da qualidade de vida de mães obesas e diabéticas".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifico que a temática estudada nesse projeto é de grande importância, visto que a obesidade e diabetes constituem patologias de grande frequência nos dias atuais e a relação destas com a gestação ainda precisa ser estudada. Iniciativas que busquem a prevenção de agravos durante o período da gestação devem ser incentivadas para contribuir com o enfrentamento desses problemas de saúde pública.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), citando os objetivos, riscos e benefícios da presente pesquisa.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou favorável a aprovação do presente projeto e submeto meu parecer ao colegiado do Comitê de Ética local.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070539.pdf	20/04/2018 14:16:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_R.docx	20/04/2018 14:16:17	Adenilda Cristina Honório França	Aceito

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS
Bairro: Campus do Araguaia CEP: 78.896-000
UF: MT Município: PONTAL DO ARAGUAIA
Telefone: (68)3402-1121 E-mail: professoramariyaugusta@gmail.com

Assinatura

UFMT - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO -
CAMPUS DO ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 2.519.235

Justificativa de Ausência	TCLE_R.docx	20/04/2018 14:16:17	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP_2018.doc	20/04/2018 14:15:57	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	11/04/2018 09:27:22	Adenilda Cristina Honório França	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTAL DO ARAGUAIA, 25 de Abril de 2018

Assinado por:

Marly Augusta Lopes de Magalhães
(Coordenador)

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS
Bairro: Campus do Araguaia CEP: 78.698-000
UF: MT Município: PONTAL DO ARAGUAIA
Telefone: (66)3402-1121 E-mail: professoramarlyaugusta@gmail.com