

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n07a1171.1-9>

Avaliação *in vitro* da segurança e eficácia de nutracêutico à base de alecrim para a pele de cães

Hilana dos Santos Sena Brunel^{1*}, Carla Lujan Villaroel², Leticia Nathalia Torres³, Patricia Furtado Malard⁴

¹Diretora Técnica Laboratório BioInnova. Brasília – DF, Brasil.

²Supervisora do Laboratório BioInnova. Brasília – DF, Brasil.

³Técnica do Laboratório BioInnova. Brasília – DF, Brasil.

⁴Gestora Grupo Bio. Brasília – DF, Brasil.

*Autora para correspondência, E-mail: lanasena@gmail.com

Resumo. A pele é a principal barreira contra atritos, patógenos, perda excessiva de água, além de ter importante atuação na termorregulação e possuir receptores que permitem a percepção de dor, tato, temperatura e pressão. Os nutrientes presentes nos alimentos são extremamente necessários para a manutenção da pele e pelos saudáveis e bem cuidados, porém, na maioria das dietas esses nutrientes não são suficientes, por isso a suplementação com nutracêuticos se torna importante. Os nutracêuticos que contém em sua formulação ingredientes naturais vem ganhando espaço, como é o caso do produto analisado no presente estudo, que contém em sua formulação alecrim, semente de abóbora, ômega 3, fosfolipídios de caviar. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação *in vitro* de nutracêutico DERM em células-tronco mesenquimais quanto à alteração da produção das citocinas IL-6 e IL-10 e à segurança do produto em relação à possibilidade de causar mutações em células dos animais que o consomem. A citocina pró-inflamatória IL-6 diminuiu ($P < 0,05$) e a citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou ($P < 0,05$) no sobrenadante celular em relação ao controle quando o produto foi adicionado ao meio de cultura. A avaliação de viabilidade celular das células-tronco mesenquimais pelo ensaio de MTT mostrou que as células tiveram maior atividade mitocondrial com a presença do produto. Já os testes de segurança envolveram análises de mutagenicidade feitas pela avaliação do potencial do produto de reverter a mutação presente em bactérias específicas (Teste de Ames) e análise da capacidade do produto de interagir com o DNA de células e provocar danos a elas (micronúcleos *in vitro*). Os resultados mostraram que DERM não causou reversão da mutação das bactérias, visto que o índice de mutagenicidade (IM) em todas as cepas teve valor abaixo de 2. Já no teste de micronúcleos *in vitro*, a frequência de aparecimento de micronúcleos foi baixa, não sendo diferente do grupo controle ($P > 0,05$), indicando que não há a interação do produto com o DNA capaz de causar danos de mutação. Dessa forma, DERM parece ter capacidade de reduzir o processo inflamatório, sendo um produto seguro para os animais que o consomem.

Palavras-chave: Inflamação, nutracêutico, testes *in vitro*

In vitro evaluation of the safety and efficacy of a rosemary-based nutraceutical for the skin of dogs

Abstract. The skin is the main barrier against friction, pathogens, excessive loss of water and also has an important role in thermoregulation and receptors that allow the perception of pain, touch, temperature and pressure. The nutrients present in food are extremely necessary for the maintenance of healthy of skin and hair, however, in most diets these nutrients are not enough, so supplementation with nutraceuticals becomes important.

Nutraceuticals that contain natural ingredients in their formulation are increasing in the market, as is the case of the product analyzed in the present study, which contains rosemary, pumpkin seed, omega 3 and caviar phospholipids in its formulation. The objective of the present experiment was to evaluate the *in vitro* action of a nutraceutical for skin (DERM) on mesenchymal stem cells regarding the alteration in the production of IL-6 and IL-10 cytokines and the safety of the product in relation to the possibility of causing mutations in cells of animals that consume it. The pro-inflammatory cytokine IL-6 decreased ($P < 0.05$) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 increased ($P < 0.05$) in the cell supernatant compared to the control when the product was added to the culture medium. The evaluation of cell viability of mesenchymal stem cells by the MTT assay showed that the cells had greater mitochondrial activity with the presence of the product. The safety tests involved mutagenicity analyzes by evaluating the potential of the product to reverse the mutation present in specific bacteria (Ames Test) and analysis of the product's ability to interact with the DNA of cells and cause damage to them (*in vitro* micronucleous). The results showed that DERM did not cause reversion of the bacterial mutation, since the mutagenicity index (MI) in all strains had a value below 2. In the *in vitro* micronucleus test, the frequency of appearance of micronuclei was low, not being different from the control group ($P > 0.05$), indicating that there is no interaction of the product with the DNA capable of causing mutation damage. In conclusion, DERM reduced the inflammatory process, being a safe product for the animals that consume it.

Keywords: Inflammation, nutraceutical, *in vitro* testing

Introdução

A pele é o maior órgão do organismo, sendo constituída por três camadas: a epiderme (camada mais externa), a derme (tecido conjuntivo vascular abaixo da epiderme) e a hipoderme. Em decorrência dessa constituição, a pele é a principal barreira contra atritos, patógenos, perda excessiva de água, além de ter importante atuação na termorregulação e possuir receptores que permitem a percepção de dor, tato, temperatura e pressão ([Feitosa, 2014](#); [Martins & Galera, 2011](#)). Devido à essa exposição, a pele pode ser constantemente agredida e prejudicada e, para auxiliar o processo de conservação da sua saúde e reparo dos danos, a alimentação é uma aliada.

Os nutrientes presentes nos alimentos são extremamente necessários para a manutenção da pele e pêlos saudáveis e bem cuidados. As proteínas, vitaminas, e minerais fornecem nutrientes para que a pele permaneça íntegra e conserve as suas propriedades e os pêlos fiquem sedosos e bem cuidados. Todavia, na maioria das dietas esses nutrientes presentes não são suficientes para fornecer todos os compostos necessários para esse fim, e por isso, a suplementação específica se torna tão essencial ([Addor, 2011](#)). Portanto, a manutenção de uma pele saudável e bem cuidada é determinante para a saúde e bem-estar dos cães e pode-se obter essa estrutura incluindo nutracêuticos na alimentação animal ([Zaine et al., 2014](#)).

Nutracêuticos são substâncias de ocorrência natural, que podem apresentar evidente efeito benéfico à saúde ([Alencar & Morais, 2021](#)). Eles vêm ganhando atenção devido aos seus potenciais nutricionais e terapêuticos, que vem sendo reconhecidos nos últimos anos ([Batista & Abud, 2022](#); [Vasconcelos, 2022](#)). Os nutracêuticos que contém em sua formulação ingredientes naturais vem ganhando espaço, como é o caso do produto a ser analisado no presente estudo, que contém em sua formulação alecrim, semente de abóbora, ômega 3, fosfolipídios de caviar.

O alecrim é uma planta da região mediterrânea e pertence à família Lamiaceae ([Baiotto et al., 2020](#)). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm comprovado as propriedades farmacológicas e nutracêuticas do alecrim e de seus compostos químicos, como anti-inflamatórios, antitumorais, antimicrobianos e antioxidantes ([Karadag et al., 2009](#); [Karadağ et al., 2019](#)). A semente de abóbora é um componente que age nos folículos capilares, fazendo os pêlos crescerem de forma saudável e reduzindo o processo de queda excessiva ([Hajhashemi et al., 2019](#)). Já os compostos ômega 3 e fosfolipídios de caviar promovem efeitos antioxidantes, prevenindo a morte celular precoce, fortalecendo e dando maior resistência à pele. O ômega 3 é composto por ácidos graxos (EPA e DHA) e já muito conhecido pelos seus efeitos benéficos na saúde como um todo, sendo um dos nutrientes mais estudados nos últimos anos ([Barlow & Pike, 1991](#); [Bauer, 2016](#); [Gogus & Smith, 2010](#)). O fosfolipídio de caviar é um novo componente que

vem ganhando muito espaço, também devido às suas atividades antioxidantes para a pele, prevenindo os efeitos negativos causados pelo aumento da idade ([Lee et al., 2020](#)). Para avaliar esses efeitos muitos estudos vêm sendo realizados em laboratório, com testes *in vitro*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação *in vitro* de nutracêutico em células-tronco mesenquimais de cães quanto à alteração da produção das citocinas IL-6 e IL-10 e à segurança do produto em relação à possibilidade de causar mutações em células dos animais que o consomem.

Material e métodos

Cultura de células

Células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de tecido adiposo de dois doadores e as células V79 foram obtidas de um banco de células comercial. As células foram cultivadas com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,02% de amicacina (todos da marca Sigma-Aldrich®).

Análises de citocinas

As CTMs foram semeadas em placas de 6 poços (1×10^5 células por poço) com meio de cultura (DMEM com 10% de SFB), e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, iniciou-se o tratamento das células com o meio de cultura contendo 0,25% e 0,5% do produto no meio de cultura, seguido de incubação nas condições previamente descritas por 48 horas. Os poços controles foram mantidos contendo células e meio de cultura sem adição do produto. Após 48 horas de cultura, o meio foi coletado e congelado para quantificar as citocinas IL-6 e IL-10. As análises foram realizadas em poços em triplicata e a dosagem foi calculada automaticamente com base nos padrões do kit. As dosagens de citocinas (pg/mL) foram realizadas pelo método de ELISA sanduíche com kits comerciais (Prepotech mini-ABTS), seguindo a ficha técnica fornecida pelo fabricante. Os padrões e amostras foram distribuídos em placas de 96 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm e a correção em 650 nm.

Ensaio de MTT

Para o ensaio de avaliação de viabilidade celular por MTT, as CTMs foram descongeladas e plaqueadas em garrafas de cultivo de 75 cm², incubadas em estufa de cultivo celular com atmosfera controlada (37°C e 5%CO₂) até atingirem aproximadamente 80% de confluência. As células foram então tripsinizadas com a enzima TryPLE™ (Thermo-fisher), contadas e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/ml de meio de cultivo. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio adicionado de nutracêutico em três concentrações (1%, 5% e 10%), ficando 48 horas em cultivo. Esse procedimento foi realizado em triplicata de poços e de placas. Após as 48 horas, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT, com adição do reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Catalog: Sigma N. M2128) a 0,5 mg/mL, incubação das placas por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. A seguir, foi realizada a diluição dos cristais de formazam com DMSO (dimetil-sufóxido) (Sigma Aldrich®), leitura de absorbância das placas em 570 nm em espectrofotômetro (Modelo DR-200BS Kasuaki) e calculada a viabilidade celular em relação ao controle.

Teste de AMES

Para o teste de AMES, foram utilizadas cinco cepas de *Salmonella typhimurium* (TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535). O produto foi diluído em três concentrações (1%, 5% e 10%) e cultivado juntamente com cada cepa. As suspensões bacterianas com produto foram semeadas em meio de ágar glicose suplementado com histidina e cultivadas por 48 h a 37°C. O número de colônias revertentes foi contado e os números médios foram calculados. O produto seria considerado mutagênico no caso de um aumento de duas vezes no número de colônias revertentes em comparação com o controle (Índice de Mutagenicidade – IM – maior que 2), ou no caso de haver diferença estatística na contagem de colônias e não mutagênico, se nenhum dos critérios foi atendido.

Ensaio de micronúcleos in vitro

Células V79 foram plaqueadas em frascos de cultura contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), incluindo 10% de SFB e 0,02% de amicacina. As células foram sub cultivadas na

concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço em placas de seis poços para realização do experimento e mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO_2 por 24h. Após esse período, foram tratadas com o produto e mantidas em incubadora por três horas. O tratamento com o produto foi então retirado e foi adicionada a citocalasina B por 21 horas. Após esse último tempo de incubação as células foram tripsinizadas e colocadas em tubos de 15 ml para tratamento hipotônico com cloreto de potássio, pingadas em lâmina com pipeta de pasteur. As lâminas foram então fixadas com a solução de metanol e ácido acético para contagem de micronúcleos em microscópio óptico (Nikon). A análise de genotoxicidade foi feita com a utilização da Frequência de Micronúcleos, considerando o n° de células binucleadas com micronúcleos em 500 células BN/lâmina, duas lâminas por cultura: $\text{FMN} = \frac{\text{n}^\circ \text{BN com MN}}{\text{total BN contadas}} \times 100$.

Análise estatística

Os dados de citocinas são apresentados como médias e desvios padrão. A análise de variância unidirecional foi usada para comparar cada grupo com o controle. Os resultados foram considerados significativos em $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas GraphPad Prism versão 7.0.4 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA, “www.graphpad.com”.

Para o Teste de AMES foram calculadas as médias e desvios padrões das contagens de colônias, as quais foram comparadas no programa GraphPad Prism versão 7.0.4 para Windows utilizando-se o teste de Dunnett e os resultados foram considerados significativos em $P < 0,05$.

Para o ensaio de micronúcleos foi calculada a média da FMN de cada cultura e esses valores foram comparados em programa estatístico GraphPad Prism versão 7.04. Para a comparação dos dados dos controles (DMEM e DMSO), foi realizado o Test T e, para comparar cada grupo com os controles, foi realizado o teste de Dunnett. Os resultados foram considerados significativos em $P < 0,05$.

Resultados

Células-tronco mesenquimais de dois doadores foram cultivadas na presença de diferentes concentrações do nutracêutico. A dosagem das citocinas presentes no sobrenadante foi realizada e a média e o desvio padrão foram calculados conforme apresentado na [Tabela 1](#).

A citocina pró-inflamatória IL-6 diminuiu ($P < 0,05$) e a citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou ($P < 0,05$) no sobrenadante celular em relação ao controle quando o produto foi adicionado ao meio de cultura ([Figura 2](#)).

Tabela 1. Média e desvio padrão das citocinas dosadas no estudo

	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Controle	$1271,667 \pm 157,988$	$595,832 \pm 19,933$
DERM 0,25%	$871,633 \pm 42,660$	$717,072 \pm 25,378$
DERM 0,5%	$459,400 \pm 42,791$	$710,174 \pm 43,151$

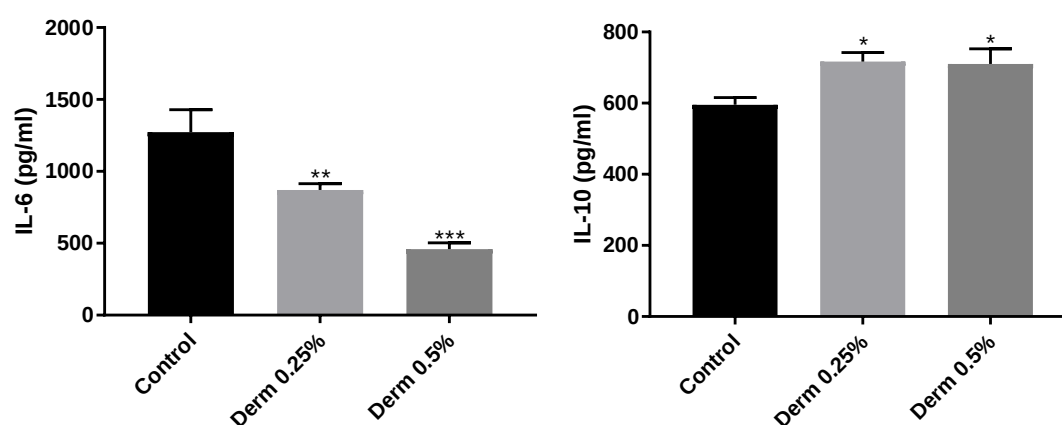


Figura 1. Respostas das citocinas IL-6 e IL-10 ao nutracêutico para a pele (DERM). Dados apresentados por média e desvio padrão * $P < 0,05$; ** $P = 0,0058$; *** $P = 0,0001$.

A avaliação de viabilidade celular das células-tronco mesenquimais pelo ensaio de MTT mostrou que as células tiveram maior atividade mitocondrial com a presença do produto, conforme apresentado na [figura 2](#).

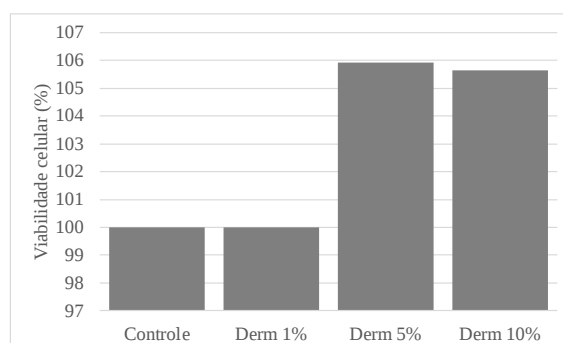


Figura 2. viabilidade das células-tronco mesenquimais no controle (apenas meio de cultivo) e nos grupos tratados com diferentes concentrações do produto (DERM).

Os testes de segurança do produto envolveram a análise de mutagenicidade e genotoxicidade. A análise de mutagenicidade foi feita pela avaliação do potencial do produto de reverter a mutação presente em bactérias específicas, indicando se o produto tem ou não potencial para causar mutações de ponto nos organismos. Os resultados mostraram que NutraDerm não causou reversão da mutação das bactérias, visto que o índice de mutagenicidade (IM) em todas as cepas teve valor abaixo de 2 ([Tabela 2](#)).

Tabela 2. Contagem de colônias revertentes por placa das cinco cepas de *Salmonella Typhimurium* em cada grupo (controle e tratados com 3 diferentes concentrações do produto para a pele) e cálculo do Índice de Mutagenicidade (IM).

Cepa	Tratamento	Concentração (mg/placa)	Número de revertentes por placa (triplicata)			Média	DP	IM
TA 97a	Água Ultrapura	-	139	126	143	136	8,888	0,000
	Reversão	-	157	129	137	141	14,422	1,037
	DERM	1%	156	141	152	149,667	7,767	1,100
	DERM	5%	148	162	149	153	7,810	1,125
	DERM	10%	141	135	168	148	17,578	1,088
TA 98	Água Ultrapura	-	60	54	46	53,333	7,024	0,000
	Reversão	-	58	42	63	54,333	10,970	1,019
	DERM	1%	41	41	52	44,667	6,351	0,838
	DERM	5%	45	49	33	42,333	8,327	0,794
	DERM	10%	33	52	37	40,667	10,017	0,763
TA 1535	Água Ultrapura	-	25	33	30	29,333	4,041	0,000
	Reversão	-	29	22	36	29,000	7,000	0,989
	DERM	1%	32	33	30	31,667	1,528	1,080
	DERM	5%	34	25	23	27,333	5,859	0,932
	DERM	10%	26	36	38	33,333	6,429	1,136
TA100	Água Ultrapura	-	30	24	35	29,667	5,508	0,000
	Reversão	-	26	33	27	28,667	3,786	0,966
	DERM	1%	26	22	33	27,000	5,568	0,910
	DERM	5%	24	26	35	28,333	5,859	0,955
	DERM	10%	13	38	27	26,000	12,530	0,876
TA102	Água Ultrapura	-	486	310	407	401,000	88,153	0,000
	Reversão	-	530	506	471	502,333	29,670	1,253
	DERM	1%	554	514	417	495,000	70,449	1,234
	DERM	5%	554	558	548	553,333	5,033	1,380
	DERM	10%	537	474	544	518,333	38,553	1,293

Ainda, não houve diferença na contagem de colônias entre os grupos tratados e controle ([Figura 3](#)).

O teste de genotoxicidade realizado, micronúcleos *in vitro*, avaliou a capacidade do produto de interagir com o DNA de células e provocar danos a elas. A frequência de aparecimento de micronúcleos

foi baixa, não sendo diferente do grupo controle ($P > 0,05$), indicando que não há a interação do produto com o DNA capaz de causar danos de genotoxicidade (Figura 4).

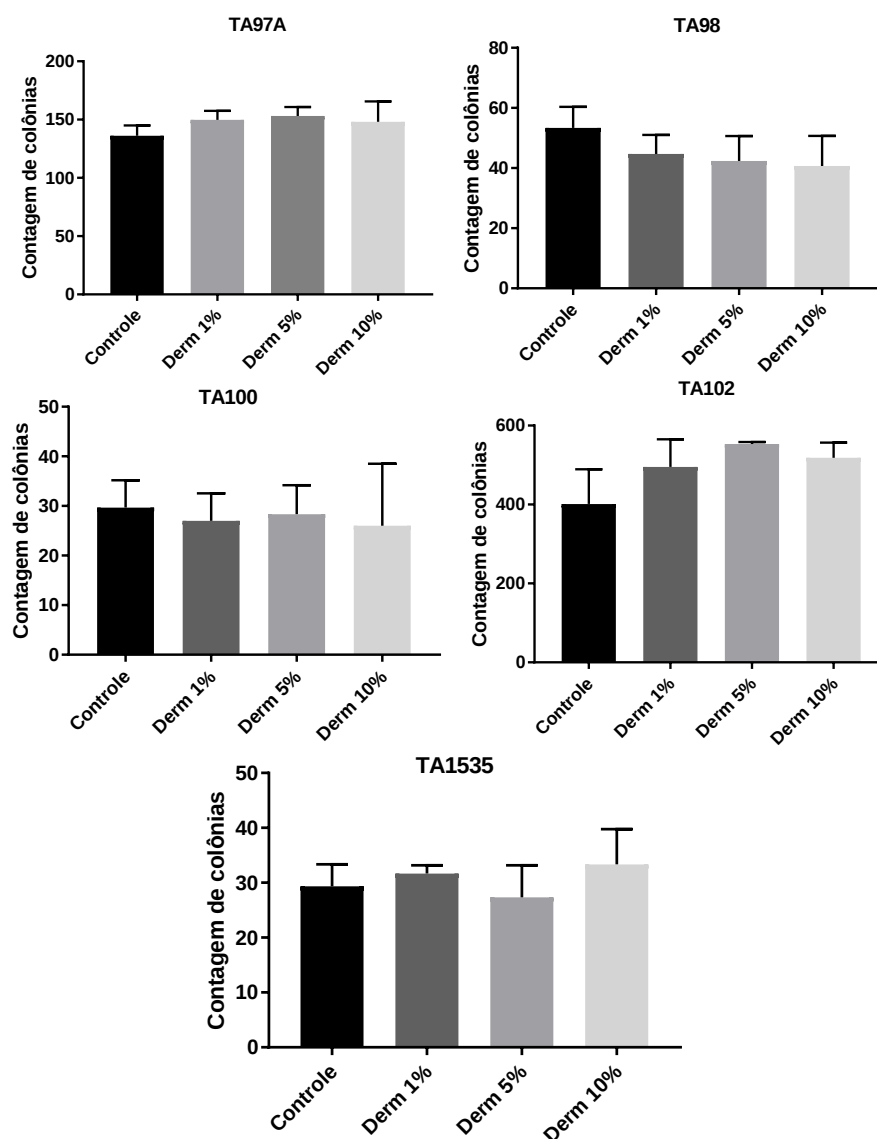


Figura 3. Contagem de colônias nas 5 cepas de *Salmonella Typhimurium* nos grupos controle e tratados com o produto para a pele de cães (DERM). Os resultados não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$).

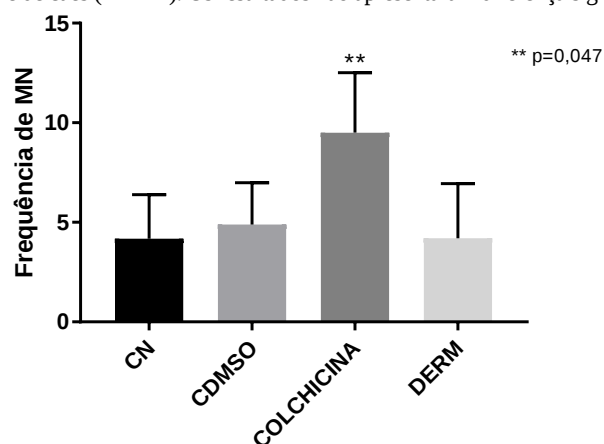


Figura 4. frequência de micronúcleos presentes nas células. CN: controle negativo; CDMSO: controle com solvente, DMSO. Colchicina: controle positivo, produto sabidamente genotóxico; DERM: produto testado.

Discussão

O presente estudo visou avaliar os efeitos *in vitro* de um nutracêutico comercial utilizado para melhora da qualidade da pele de cães. O produto possui em sua composição ingredientes naturais, como o alecrim. Devido à possível ação anti-inflamatória desse componente, pesquisas são realizadas para analisar o efeito que esse composto natural causa na migração de células imunes ([Silva et al., 2015](#)), a sua competência em controlar a síntese de citocinas pró-inflamatórias (aquelas que estimulam a inflamação e indicam que o local está inflamado), óxido nítrico, fatores de crescimento e prostaglandina ([Yu et al., 2013](#)).

Em um estudo, a atividade anti-inflamatória do extrato de alecrim foi avaliada utilizando cultivo celular. Foram feitos dois grupos de tratamento: células tratadas com extrato de alecrim e com agente inflamatório (lipopolissacarídeo – LPS) e sem LPS. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante celular foi coletado para ser feita a análise de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), que indicam há inflamação em decorrência do seu aumento. Ao se comparar o grupo tratado somente com LPS e o tratado com LPS e alecrim, foi observado uma inibição significativa na produção das citocinas pelo alecrim ([Oliveira et al., 2017](#)), indicando alto potencial anti-inflamatório. Em nosso estudo, análise semelhante foi realizada, utilizando-se células-tronco mesenquimais e o produto nutracêutico que contém alecrim em sua composição. Da mesma forma, observamos que as citocinas mediadoras da inflamação (IL-6 e IL-10) foram moduladas, com a diminuição da citocina pró-inflamatória (IL-6) e aumento da anti-inflamatória (IL-10). Em decorrência da cascata de produção e sinalização via citocinas, a pele inflamada apresenta altas concentrações de interleucina 6 (IL-6) ([Johnson et al., 2020](#)). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, cujas atividades estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos B e T, aumentam a produção de anticorpos, ativam células T, estimulam precursores hematopoiéticos a se diferenciarem, influenciam a capacidade proliferativa de células não linfoides e ativam a resposta proteica de fase aguda ([Kishimoto, 1989](#)). Essa citocina está relacionada à alta produção de colágeno na pele, que pode causar espessamento da mesma ([Sato et al., 2001](#)). Já a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, tem a capacidade de suprimir a síntese de citocinas pró-inflamatórias em monócitos/macrófagos. A IL-10 também tem a capacidade de estimular as células B a produzir IgG, IgA e IgM, além de desempenhar um papel importante na manutenção do equilíbrio entre os processos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, e acredita-se que distúrbios na produção de IL-10 contribuam para a patogênese de inúmeras condições inflamatórias da pele ([Weiss et al., 2004](#)). Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que o produto pode realmente ter efeito positivo para animais com problemas de pele pela possível redução da inflamação via citocinas.

Entre os outros componentes do produto testado, está o colágeno, responsável por manter a integridade arquitetônica da pele e garantir o seu bom funcionamento como barreira de proteção ([Theocharidis & Connelly, 2019](#)), a semente de abóbora, a qual possui diversos efeitos nutracêuticos, em decorrência da sua composição, repleta de ácidos graxos, carotenoides e proteínas ([Lestari & Meiyanto, 2018](#)). Sabidamente o ômega 3 possui efeitos antioxidantes e até anti-inflamatórios, agindo no organismo como um todo, prevenindo diversas afecções, inclusive de pele. Já o fosfolípido de caviar, é um novo componente que vem ganhando muito espaço também devido às suas atividades antioxidantes para a pele, prevenindo os efeitos negativos causados pelo aumento da idade ([Lee et al., 2020](#)). Todos esses compostos combinados ao alecrim podem ter influenciado a resposta celular frente ao produto testado, como pode ser observado no aumento da viabilidade celular no ensaio de MTT, demonstrando que o produto apresentou potencial para aumentar a atividade das mitocôndrias nas células-tronco mesenquimais testadas.

Já os ensaios de segurança realizados *in vitro*, tanto Teste de Ames quanto o micronúcleo *in vitro* demonstraram que o produto não tem potencial para causar mutações de ponto ou genotoxicidade em células. Esses ensaios são comumente utilizados para se testar a segurança de produtos para consumo humano ([Omoruyi & Pohjanvirta, 2014](#)), sendo uma inovação a utilização deles para testar produtos veterinários. Esses testes são importantes, visto que os nutracêuticos de forma geral não precisam de comprovação de segurança, porém, apesar as agências oficiais darem garantias em relação à segurança, faltam dados para fundamentar essas garantias ([Craig, 2021](#)).

Considerações finais

O produto testado tem ingredientes naturais em sua composição. O alecrim combinado aos demais compostos causou diminuição do perfil inflamatório *in vitro*, além de apresentar segurança nos testes realizados. Dessa forma, o produto parece ter capacidade de reduzir a inflamação de forma segura para os animais que o consomem. Sugere-se a realização de testes *in vivo* para avaliar o comportamento do produto no organismo animal para termos uma comprovação final de sua eficácia.

Agradecimentos

As autoras agradecem à empresa Champion Saúde Animal pelo fornecimento do produto Nutrancell Derm para a realização dos experimentos.

Referências bibliográficas

- Addor, F. A. S. (2011). Abordagem nutricional do envelhecimento cutâneo: correlação entre os efeitos em fibroblastos e os resultados clínicos. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 3(1), 12–16.
- Alencar, B. B. M., & Moraes, Y. J. (2021). Nutracêuticos e seus benefícios para a saúde do utente: revisão integrativa da literatura. *Research, Society and Development*, 10(12), e484101220396–e484101220396. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20396>.
- Baiotto, C. S., Tremêa, G. T. F., & Colet, C. F. (2020). Propriedades farmacológicas atribuídas ao *Rosmarinus Officinalis*: uma revisão da literatura. *Salão Do Conhecimento*, 6(6).
- Barlow, S., & Pike, I. H. (1991). Humans and animals benefit from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Feedstuffs*, 63(19), 18–26.
- Batista, N. R. A., & Abud, A. K. S. (2022). Prospecção tecnológica do setor de nutracêuticos no Brasil e no mundo. *Cadernos de Prospecção*, 15(1), 178–195. <https://doi.org/10.9771/cp.v15i1.43817>.
- Bauer, J. E. (2016). The essential nature of dietary omega-3 fatty acids in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 249(11), 1267–1272.
- Craig, J. M. (2021). Additives in pet food: are they safe? *Journal of Small Animal Practice*, 62(8), 624–635.
- Feitosa, F. L. F. (2014). *Semiologia veterinária: A arte do diagnóstico*. Grupo Gen-Editora Roca Ltda.
- Gogus, U., & Smith, C. (2010). n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 417–436.
- Hajhashemi, V., Rajabi, P., & Mardani, M. (2019). Beneficial effects of pumpkin seed oil as a topical hair growth promoting agent in a mice model. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(6), 499–504.
- Johnson, B. Z., Stevenson, A. W., Prêle, C. M., Fear, M. W., & Wood, F. M. (2020). The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*, 8(5), 101.
- Karadağ, A. E., Demirci, B., Çaşkur, A., Demirci, F., Okur, M. E., Orak, D., Sipahi, H., & Başer, K. H. C. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. *South African Journal of Botany*, 125, 214–220.
- Karadağ, A., Özcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood*, 74(1), 1–10.
- Lee, K.-E., Nho, Y.-H., Yun, S. K., Park, S.-M., Kang, S., & Yeo, H. (2020). Caviar extract and its constituent DHA inhibits UVB-Irradiated skin aging by inducing adiponectin production. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3383.
- Lestari, B., & Meiyanto, E. (2018). A review: the emerging nutraceutical potential of pumpkin seeds. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 9(2), 92–101.
- Martins, B. C., & Galera, P. D. (2011). Semiologia oftálmica em cães e gatos–Revisão de literatura. *Medvep–Revista Científica de Medicina Veterinária*, 9(31), 612–620.

- Oliveira, J. R., Jesus, D., Figueira, L. W., Oliveira, F. E., Soares, C. P., Camargo, S. E. A., Jorge, A. O. C., & Oliveira, L. D. (2017). Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L.(rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*, 242(6), 625–634.
- Omoruyi, I. M., & Pohjanvirta, R. (2014). Genotoxicity of processed food items and ready-to-eat snacks in Finland. *Food Chemistry*, 162, 206–214.
- Sato, S., Hasegawa, M., & Takehara, K. (2001). Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*, 27(2), 140–146.
- Silva, A. M. O., Machado, I. D., Santin, J. R., Melo, I. L. P., Pedrosa, G. V., Genovese, M. I., Farsky, S. H. P., & Mancini-Filho, J. (2015). Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytotherapy Research*, 29(1), 125–133. <https://doi.org/10.1002/ptr.5238>.
- Theocharidis, G., & Connelly, J. T. (2019). Minor collagens of the skin with not so minor functions. *Journal of Anatomy*, 235(2), 418–429.
- Vasconcelos, E. S. S. (2022). *A utilização de nutracêuticos e nutricosméticos para aplicação estética e saúde da pele: uma revisão*. Universidade Federal de Campina Grande.
- Weiss, E., Mamelak, A. J., La Morgia, S., Wang, B., Feliciani, C., Tulli, A., & Sauder, D. N. (2004). The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(5), 657–675.
- Yu, M.-H., Choi, J.-H., Chae, I.-G., Im, H.-G., Yang, S.-A., More, K., Lee, I.-S., & Lee, J. (2013). Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*, 136(2), 1047–1054. <https://doi.org/2013/01/15/2013>.
- Zaine, L., Monti, M., Vasconcellos, R. S., & Carciofi, A. C. (2014). Nutracêuticos imunomoduladores com potencial uso clínico para cães e gatos. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 2513–2529.

Histórico do artigo:**Recebido:** 3 de junho de 2022**Aprovado:** 22 de junho de 2022**Disponível online:** 14 de julho de 2022**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.