

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARINA PEREIRA ROCHA

PADRONIZAÇÃO QUÍMICO-BIOLÓGICA DE EXTRATO DE *Echinodorus  
macrophyllus* E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA  
COM POTENCIAL ANTIARTRÍTICO

BELO HORIZONTE  
2023

**MARINA PEREIRA ROCHA**

**PADRONIZAÇÃO QUÍMICO-BIOLÓGICA DE EXTRATO DE *Echinodorus  
macrophyllus* E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA  
COM POTENCIAL ANTIARTRÍTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG.

Co-orientadora: Prof. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana, FAFAR, UFMG.

**BELO HORIZONTE**

**2023**

R672p Rocha, Marina Pereira.  
Padronização químico-biológica de extrato de *Echinodorus macroplyllus* e desenvolvimento de formulação anti-inflamatória com potencial antiartrítico [recurso eletrônico] / Marina Pereira Rocha. – 2023.

1 recurso eletrônico (241 f. : il.) : pdf

Orientador: Fernão Castro Braga.

Coorientadora: Priscilla Rodrigues Valadares Campana.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. *Echinodorus* – Teses. 2. Plantas aquáticas – Teses. 3. Marcadores biológicos – Teses. 4. Artrite – Teses. 5. Medicamentos – Pesquisas – Teses I. Braga, Fernão Castro. II. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. III. Alves, Ricardo José. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.7227

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

*"PADRONIZAÇÃO QUÍMICO-BIOLÓGICA DE EXTRATO DE ECHINODORUS MACROPHYLLUS E  
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA COM POTENCIAL ANTIARTRÍTICO"*

**MARINA PEREIRA ROCHA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof.Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa.Dra. Damaris Silveira  
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Ruben Dario Sinisterra Millán  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Fernão Castro Braga - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 11 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Damaris Silveira, Usuária Externa**, em 14/08/2023, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernão Castro Braga, Professor do Magistério Superior**, em 14/08/2023, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helder Ferreira Teixeira, Usuário Externo**, em 14/08/2023, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ruben Dario Sinisterra Millan, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2023, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 16/08/2023, às 18:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2486082** e o código CRC **EFCA6B5E**.

*Aos meus pais, meu doce marido e minha  
amada grande e pequena família, pelo  
apoio incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por tudo que me concede.

Aos meus pais, minha amada grande e pequena família, meus divertidos amigos e ao meu querido marido, pelo apoio, incentivo, motivação e companhia. Vocês iluminam a minha vida e fazem tudo mais leve e divertido. Amo vocês!

Ao meu orientador, Prof. Fernão, pela paciência, apoio, incentivo e confiança a mim depositada. Agradeço por todo aprendizado nesses anos, não só científico, mas, também de como ser professora e profissional. Aprendi com ele a ter uma visão crítica e científica da literatura, a desenvolver a didática, e também a sempre tentar todas as oportunidades, por mais difícil que pareçam. Todo o sucesso dessa tese é consequência de anos de trabalho desenvolvido de forma brilhante por ele, e que tive a honra de fazer parte.

À Prof.<sup>a</sup> Priscilla Campana, minha grande inspiração, por todo apoio, incentivo e sabedoria em me guiar na minha trajetória acadêmica. Especialmente, agradeço por me incentivar por 10 anos a dar o melhor de mim. Muitas vezes, quando eu pensei que não ia dar conta de conciliar tudo, você me mostrou que dá para ser esposa, mãe de dois lindos, professora, cientista, filha, irmã e amiga com muito brilhantismo. E, isso me mostra diariamente que eu realmente posso mais. Muito obrigada por tudo.

À Dra. Cláudia Gontijo, a minha grande incentivadora, e responsável por mais esse objetivo alcançado em minha carreira acadêmica.

À Prof.<sup>a</sup> Maria das Graças Lins Brandão por abrir a porta das plantas medicinais para mim em 2012, e por me mostrar o que é trabalhar com amor e dedicação. Agradeço também pela contribuição na doação da espécie vegetal para esse trabalho.

Aos professores Mauro, Flávio e Danielle, e os alunos do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG pela colaboração e contribuição na realização dos ensaios *in vivo* desse trabalho. Em especial, agradeço ao doutorando Fernando, por não me deixar surtar no PCR quantitativo, à doutora Carla, por me ajudar com os

camundongos neonatos e aos doutorandos Brenda e Peter por me ajudarem nos desafios experimentais.

Ao Prof. João Batista que me ensinou com leveza o mundo molecular aplicado às plantas medicinais.

As professoras Elaine Leite e Mônica Oliveira por todo apoio, parceria e orientação no desenvolvimento farmacotécnico.

Às minhas alunas de iniciação científica, Laura e Lyandra, por todo apoio e parceria.

Às amigas da Funed, que sempre guardo no coração com grande carinho por todos esses anos de convivência e colaboração. Agradeço também pelo espaço para realização dos experimentos de atividade antioxidante desse trabalho.

À UNA, onde sou professora, que me acompanhou na graduação, e durante todo o doutorado. Agradeço as minhas coordenadoras Maria Arlete Pires, Lívia Avelar e Ana Bretas, pelo apoio, incentivo e compreensão na jornada docente conjunta com a realização do doutorado. Vocês são um exemplo de liderança com leveza, amizade e brilhantismo. E, também aos meus alunos, que me inspiram a ser melhor diariamente.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica: Maria Beatriz, Alessandra, Gabriela, Juliana, Weronica, Luciana, Raquel, José Hugo, Diego, Alisson, Rosângela, Wellerson, Larissa, Maria Fernanda, Laura, Janikelly, Kátia, Patrícia, Tarciana e Prof. Rodrigo, pelas valiosas contribuições, pela amizade e por proporcionarem momentos tão agradáveis. Em especial agradeço aqueles que optaram por realmente fazer parte da minha vida.

A todos os meus professores, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço a todos que me ajudaram e contribuíram com êxito para os resultados obtidos. Acredito, que só se faz ciência com colaboração, e este trabalho é fruto desta crença.

*“Os benefícios da ciência não são para os  
cientistas, e sim para humanidade”.*

Louis Pasteur

## RESUMO

As espécies *Echinodorus macrophyllus* e *Echinodorus grandiflorus* são denominadas popularmente de chapéu-de-couro e utilizadas tradicionalmente no Brasil para tratar reumatismo e artrites. O presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico-biológico de folhas de *E. macrophyllus* visando desenvolver um extrato padronizado e formulação com atividade antiartrítica. Inicialmente foram obtidas as drogas vegetais (DV) folhas de *E. macrophyllus* de fonte comercial (lotes DV1 e DV2) e de material de referência (DVMus), bem como um lote comercial de *E. grandiflorus* (EG). Foram realizadas análises moleculares e fitogenéticas de DVMus empregando os marcadores *matK* MG1/MG15, *leafy* (Flint2 F1/R1), 5S-NTS (PI/PII), ITS (5S/ER) e *psbA-trnH* (*trnH2/psbA*). Não foi possível identificar DVMus inequivocamente em nível de espécie empregando os marcadores supracitados e as sequências depositadas no GenBank. Procedeu-se à comparação de DV1, DV2, DVMus e EG pela análise de teores de marcadores químicos (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, ácido chicórico, swertisina, ácido cafeoil-feruloil-tartárico e ácido diferuloil-tartárico) e atividades biológicas *in vitro* (anti-inflamatória e antioxidante), sendo os dados obtidos submetidos à análise de componente principal (PCA). Os resultados de PCA não possibilitaram diferenciar as amostras analisadas de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*. Foram realizados ensaios extrativos com DV2 para desenvolver o extrato padronizado de *E. macrophyllus* empregando os métodos de percolação, maceração dinâmica e maceração estática, com os solventes EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50%. Os extratos obtidos por percolação apresentaram maior rendimento, especialmente EtOH 70% e EtOH 50%, além de maiores teores dos marcadores químicos quantificados. Avaliou-se a atividade dos extratos supracitados sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células THP-1 estimuladas por LPS. Os extratos EtOH 70% e EtOH 50%, obtidos por percolação, induziram maior redução da liberação de TNF e IL-1 $\beta$ . Os extratos preparados por percolação foram avaliados em modelo murino agudo de artrite induzida por antígeno (AIA). Os extratos, administrados por via oral, reduziram a migração de células inflamatórias totais, neutrófilos e monócitos para a cavidade intra-articular, sendo a maior atividade observada para os extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50%. Na sequência, os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% foram ensaiados em modelo murino de AIA crônico. Ambos reduziram a migração de células inflamatórias totais, neutrófilos e monócitos para a cavidade intra-articular, além das concentrações de IL-1 $\beta$  e CXCL1 no tecido periarticular. Adicionalmente, a análise histopatológica da cartilagem articular indicou diminuição da perda de proteoglicanos. O mecanismo da ação anti-inflamatória dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% foi avaliado *in vitro* em cultura primária de condrócitos murinos estimulados com LPS. Os extratos reduziram a liberação de IL-6 e a expressão de metaloproteinases do tipo 3, mecanismo associado à redução da degradação de proteoglicanos e da inflamação observada no modelo de AIA crônico. A partir desses resultados, selecionou-se os extratos EtOH 70% e EtOH 50% para desenvolvimento farmacotécnico. Os extratos foram preparados por percolação, sendo o etanol evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotatório. A água restante foi eliminada por secagem em *spray dryer* em condições otimizadas, com adição de 25% m/m de Aerosil®. O extrato EtOH 50% seco apresentou maior solubilidade em água e fluidez do pó, sendo selecionado para desenvolvimento farmacotécnico. A formulação foi obtida pela adição de 10% m/m de celulose microcristalina ao extrato EtOH 50% seco padronizado. A formulação resultante apresentou umidade, tamanho e uniformidade de partícula e fluxo de pó adequados para veiculação por via oral em cápsulas, bem como teores de marcadores químicos equivalentes àqueles do extrato de origem. A formulação foi avaliada em modelo de AIA agudo e induziu resposta anti-inflamatória similar ao extrato original. Em conclusão, diferentes drogas vegetais de *E. macrophyllus* apresentaram similaridades na composição química e atividade anti-inflamatória *in vitro*. Os extratos EtOH 70% e EtOH 50% foram os mais ativos em modelos murinos de artrite induzida por antígeno e em cultura de condrócitos, destacando-se a redução da resposta inflamatória e a diminuição da perda de proteoglicanos. A formulação do extrato EtOH 50% com adição de 25% m/m de Aerosil® e 10% m/m de celulose microcristalina apresentou parâmetros farmacotécnicos adequados para veiculação em cápsulas.

**Palavras chaves:** *Echinodorus macrophyllus*; análises moleculares; quantificação de marcadores químicos; artrite induzida por antígeno; desenvolvimento farmacotécnico.

## ABSTRACT

The species *Echinodorus macrophyllus* and *Echinodorus grandiflorus* are commonly referred to as "chapéu-de-couro" (leather hat) and have a long-standing traditional use in Brazil for treating rheumatism and arthritis. This study aimed to conduct both chemical and biological analyses of *E. macrophyllus* leaves to establish a standardized extract and a formulation with antiarthritic activity. The leaves of *E. macrophyllus* were obtained from commercial sources (lots DV1 and DV2) and also from a reference material (DVMus). Additionally, a commercial batch of *E. grandiflorus* (EG) leaves was included in the study. Molecular and phylogenetic analyses of DVMus were performed using the markers matK MG1/MG15, leafy (Flint2 F1/R1), 5S-NTS (PI/PII), ITS (5S/ER), and psbA-trnH (trnH2/psbA). However, it was not possible to unequivocally identify DVMus at the species level using the aforementioned markers and the sequences deposited in GenBank. A comparison of DV1, DV2, DVMus, and EG was carried out through the analysis of chemical markers contents (*cis*- and *trans*-aconitic acids, homoorientin, chicoric acid, swertisin, caffeoyl-feruloyl-tartaric acid, and di-feruloyl-tartaric acid) and *in vitro* biological activities (anti-inflammatory and antioxidant). The obtained data were subjected to principal component analysis (PCA) and the results did not allow differentiation between the analyzed samples of *E. macrophyllus* and *E. grandiflorus*. To develop the standardized extract of *E. macrophyllus*, extractive tests were carried out with DV2 using the methods of percolation, dynamic maceration, and static maceration, employing the solvents 96°GL EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH and 50% EtOH. The extracts obtained by percolation showed higher yields, especially the 70% EtOH and 50% EtOH extracts, in addition to higher levels of chemical markers. The activity of the above mentioned extracts on the release of pro-inflammatory cytokines in THP-1 cells stimulated by LPS was evaluated. The 70% EtOH and 50% EtOH extracts, obtained by percolation, induced a greater reduction in TNF and IL-1 $\beta$  release. All extracts prepared by percolation were evaluated in an acute murine model of antigen-induced arthritis (AIA). The extracts, administered orally, reduced the migration of total inflammatory cells, neutrophils, and monocytes to the intra-articular cavity, with the highest activity observed for the 96°GL EtOH, 70% EtOH, and 50% EtOH extracts. In the sequence, the 96°GL EtOH and 70% EtOH extracts were evaluated in a murine model of chronic AIA. Both extracts reduced the migration of total inflammatory cells, neutrophils, and monocytes to the intra-articular cavity, in addition to the concentrations of IL-1 $\beta$  and CXCL1 in the periarticular tissue. Additionally, the histopathological analysis of the articular cartilage indicated a decrease in the loss of proteoglycans. The mechanism of anti-inflammatory action of the 70% EtOH and 50% EtOH extracts was evaluated *in vitro* in primary culture of murine chondrocytes stimulated with LPS. The extracts reduced the release of IL-6 and the expression of type 3 metalloproteinases, justifying the reduction in proteoglycan degradation and in the inflammatory process observed in the chronic AIA model. Based on these results, the 70% EtOH and 50% EtOH extracts were selected for pharmacotechnical development. The extracts were prepared by percolation and the ethanol was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator. The remaining water was eliminated by drying under optimized conditions in a spray dryer, with the addition of 25% w/w of Aerosil®. The 50% EtOH extract showed better solubility in water and fluidity of the powder and, therefore, it was selected to develop the formulation. The formulation was obtained by adding 10% w/w of microcrystalline cellulose to the standardized dried 50% EtOH extract. The resulting formulation exhibited suitable moisture content, particle size, particle uniformity, and powder flow for encapsulation. Additionally, the formulation's chemical markers contents were equivalent to those found in the original extract. The obtained formulation was evaluated in an acute AIA model and induced an anti-inflammatory response similar to the original extract. In conclusion, different plant drugs from *E. macrophyllus* showed similarities in the chemical composition and *in vitro* anti-inflammatory activity. The 70% EtOH and 50% EtOH extracts were the most active in murine models of antigen-induced arthritis and in chondrocyte culture. They demonstrated a significant reduction in inflammatory response and a decrease in proteoglycan loss. The formulation of the 50% EtOH extract with the addition of 25% w/w Aerosil® and 10% w/w microcrystalline cellulose showed appropriate pharmacotechnical parameters for encapsulation.

**Keywords:** *Echinodorus macrophyllus*; molecular analysis; quantification of chemical markers; antigen-induced arthritis; pharmacotechnical development.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eventos celulares associados à resposta inflamatória. Liberação de citocinas por macrófagos ativados pela fagocitose de microrganismos, responsáveis pela translocação de leucócitos para o sítio injuriado através da alteração de permeabilidade do endotélio vascular.....36
- Figura 2:** Ciclo temporal, em dias, dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória e requisitos para resolução, representando o papel que mediadores moleculares específicos desempenham nesses eventos. Em (A) tem-se o início da resposta inflamatória, com a liberação de mediadores pró-inflamatórios que iniciam e aumentam a fase aguda da resposta. Esta resposta é contrabalançada por sinais anti-inflamatórios endógenos que servem para moderar a gravidade e limitar a duração da fase inicial. À medida que a inflamação progride, certos “sinais de parada” evitam o tráfego adicional de leucócitos para o tecido. Esses sinais de parada incluem a liberação de lipoxinas, resolvinas e de algumas prostaglandinas que promovem o recrutamento de monócitos e sua diferenciação em macrófagos com função fagocitária, que removem os estímulos nocivos e os produtos de lesão tecidual. Esse conjunto sequencial de respostas leva à resolução completa e à restauração do tecido. Em (B) é representado o cronificação do processo inflamatório devido à falha no processo resolutivo.....38
- Figura 3.** Vias de ativação envolvendo MAPK e JAK-STAT. (A) Via de sinalização MAPK ativada por citocinas pró inflamatórias. (B) Via de sinalização JAK-STAT ativada pela citocina IL-6.....43
- Figura 4.** Articulação de paciente saudável (A) e com artrite reumatoide (B). Em (B) é possível observar a formação do *pannus*, caracterizado pela presença de várias células imunes e sinoviais ativadas, além dos processos de erosão da cartilagem desencadeados após a resposta inflamatória.....46
- Figura 5:** Fotografia de partes áreas de exemplar de *E. macrophyllus* cultivado no Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) da UFMG.....51
- Figura 6.** Delineamento experimental para o ensaio de AIA crônico indicando as imunizações, desafios e tratamentos realizados no experimento.....88
- Figura 7.** Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS para os extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e

DVMus) e de *E. grandiflorus* (EG). (A) Detecção por DAD. (B) Detecção por ESI-MS no modo scan.....106

**Figura 8.** Picos correspondentes aos marcadores químicos identificados e caracterizados nos extratos EtOH 70% de folhas de *Echinodorus macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e de *Echinodorus grandiflorus* a partir de análises por UPLC-DAD-ESI-MS. Pico 1 e 2: ácidos *cis*- e *trans*- aconítico. Pico 3: ácido fertárico. Pico 4: homoorientina. Pico 5: swertisina. Pico 6: isovitexina. Pico 7: swertiajaponina. Pico 8: ácido chicório. Pico 9: ácido cafeoil-feruloil-tartárico. Pico 10: ácido diferuloil-tartárico. (A) Cromatograma registrado no DAD; (B) cromatograma registrado no modo scan com ionização ESI-.....108

**Figura 9.** Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) nas condições cromatográficas A, B e C. Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*-aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.....113

**Figura 10.** Cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, para o extrato EtOH 90% de *E. macrophyllus* (DV2) nas condições cromatográficas B (A) e C (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*-aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.....114

**Figura 11.** Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD, para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) na condição experimental C. Extrato EtOH 70% (A) e extrato EtOH 70% com adição de homoorientina (0,5 mg/mL) (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.8.2. Pico 3: homoorientina. Detecção em 350 nm.....115

**Figura 12.** Cromatograma obtido por UPLC-DAD, para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) na condição experimental desenvolvida (C). Condições experimentais: vide item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*- aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.....116

**Figura 13.** Avaliação da seletividade a partir da análise dos ângulos de pureza e limiar de pureza dos cromatogramas obtidos por UPLC-DAD para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) na condição experimental desenvolvida (C). Condições

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| experimentais: vide item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido <i>cis</i> - e <i>trans</i> - aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 118 |
| <b>Figura 14.</b> Curvas analíticas (A, $n = 9$ ) com a distribuição dos resíduos (B), coeficiente de determinação e equação das retas obtidas para os marcadores químicos definidos, obtidos no Excel® e Prisma.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 121 |
| <b>Figura 15.</b> Influência da temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e porcentagem de ácido fórmico na fase móvel na robustez do método cromatográfico para quantificação de marcadores químicos no extrato EtOH 70% de folhas de <i>E. macrophyllus</i> (média, $n = 6$ ). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si após análise de variância seguida pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 127 |
| <b>Figura 16.</b> Análise dos produtos de PCR purificados das amplificações de DNA para os primers ITS4/5 (A), ITS ER/EF (B), matK ER/EF (C), matK MG1/MG15 (D), leafy Flint2 F1/R1 (E), psbA/trnH2 (F) e o marcador de massa molecular (P).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 136 |
| <b>Figura 17.</b> Consenso de maioria de 50% da análise Bayesiana da matriz combinada <i>ITS</i> , <i>5S-NTS</i> , <i>LEAFY matK-trnK</i> e <i>psbA-trnH</i> . Os números próximos aos nós representam as probabilidades posteriores (PP) da análise bayesiana e as porcentagens <i>bootstrap</i> (BP) da análise de parcimônia, respectivamente. Os principais clados discutidos no texto são indicados pelas letras de A a F. A amostra sequenciada de <i>E. macrophyllus</i> está destacada em negrito e por uma seta. Os nomes genéricos de todas as espécies de <i>Echinodorus</i> estão abreviados.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 140 |
| <b>Figura 18.</b> Inibição da liberação de TNF em células THP-1 estimuladas com LPS induzida pelos extratos de folhas de <i>E. macrophyllus</i> preparados com drogas vegetais distintas (DV1, DV2 e DVMus) e <i>E. grandiflorus</i> (EG). Os dados representam a média $\pm$ DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. * Indica a diferença significativa com o grupo controle de células tratadas com o solvente DMSO e estimuladas com LPS (C-) (** $p < 0,01$ , **** $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , #### $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). Ut: células não tratadas; D: células + LPS (1 ng/mL/poço); C-: solvente DMSO + LPS (controle); Dx: dexametasona (0,2 $\mu$ M); Et: extrato etanólico 96°GL; 90: extrato hidroetanólico a 90%; 70: extrato hidroetanólico a 70%; 50: extrato hidroetanólico a 50%..... | 144 |
| <b>Figura 19.</b> <i>Biplot</i> fornecido pelo modelo de PCA construído para <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> com base na composição química quantitativa e atividade biológica <i>in vitro</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |

dos extratos. Triângulos vermelhos representam *loadings* / amostras e quadrados azuis representam *scores* / variáveis.....149

**Figura 20.** O mesmo *biplot* PCA da Figura 19 mostrando agrupamentos de variáveis.

Triângulos vermelhos representam pontuações e quadrados azuis representam cargas. (B) *Heatmap* de teores de marcadores químicos e atividade biológica. CATA, ácidos *cis*- e *trans*-aconítico; HOMO, homoorientina; SWER, swertisina; CHIA, ácido chicórico; CATA, ácido cafeoil-feruloil-tartárico; TNF 1, 2 e 3 (inibição da liberação de TNF); Bcar, peroxidação lipídica no ensaio de co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico; e DPPH, ensaio de captação de radicais DPPH.....150

**Figura 21:** Teores de marcadores químicos (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, swertisina, ácido chicórico, ácido cafeoil-feruloil-ácido tartárico e ácido diferuloil-ácido tartárico) quantificados em extratos obtidos nos ensaios extrativos com *E. macrophyllus* (DV1) empregando diferentes solventes e métodos extrativos. A quantificação do teor de marcadores químicos foi realizada em triplicata e os resultados obtidos foram analisados por ANOVA comparando-se todos os extratos de todos os grupos por *one way*, utilizando o teste de Dunnett como pós-teste para comparação múltipla. Nível de significância do teste estatístico foi  $p < 0,05$ . Para os valores de teores dos marcadores químicos, letras diferentes (a, b, c, d e e) dentro das colunas indicam diferenças significativas entre os teores quantificados. E: extrato etanólico 96°GL; E90: extrato hidroetanólico a 90%; E70: extrato hidroetanólico a 70%; E50: extrato hidroetanólico a 50%. ME: maceração estática; MD: maceração dinâmica; PE: percolação.....155

**Figura 22.** Atividade inibitória da liberação de TNF e IL-1 $\beta$  em células THP-1 estimuladas com LPS induzida por extratos de folhas *E. macrophyllus* (DV1), preparados por percolação, maceração dinâmica e maceração estática. Os dados representam a média  $\pm$  DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. \*Indica a diferença significativa com o grupo controle de células tratadas com o solvente DMSO e estimuladas com LPS (C-) (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  ####,  $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). Ut: células não tratadas; LPS: células +LPS; D: solvente DMSO + LPS (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); Et: extrato etanólico 96°GL; 90: extrato hidroetanólico a 90%; 70: extrato hidroetanólico a 70%; 50: extrato hidroetanólico a 50%.....158

**Figura 23.** Atividade anti-inflamatória de extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de folhas *E. macrophyllus* (DV1) em modelo de AIA agudo. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). Para o extrato EtOH 50% (300 mg/kg,  $n = 4$ ). (A) células totais EtOH 96°GL e EtOH 90%; (B) poliformonucleares EtOH 96°GL e EtOH 90%; (C) mononucleares EtOH 96°GL e EtOH 90%; (D) células totais EtOH 70% e EtOH 50%; (E) polimorfonucleares EtOH 70% e EtOH 50%; (F) mononucleares EtOH 70% e EtOH 50%. \*Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: células não tratadas; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 90%: extrato hidroetanólico a 90%; EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico a 50%.....161

**Figura 24.** Atividade anti-inflamatória de extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% de folhas *E. macrophyllus* (DV1) nas doses de 30 e 100 mg/kg em modelo de AIA agudo. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). (A) células totais; (B) poliformonucleares e (C) mononucleares no lavado articular. \*Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados e tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 70%: extrato hidroetanólico 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico 50%.....163

**Figura 25.** Atividade anti-inflamatória dos extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% (30 e 300 mg/kg) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2) em modelo de AIA crônico. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). Número de células na cavidade intra-articular: (A) células totais; (B) neutrófilos; (C) monócitos no lavado articular. Concentrações de IL-1 $\beta$  e (D) e CXCL-1 (E) no tecido periarticular. \* Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados e tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%.....167

**Figura 26.** Scores da análise histológica, com coloração por HE, das articulações fêmur-tibial coletadas no ensaio de AIA crônico realizado com os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% (300 mg/kg) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2). (A) Infiltrado celular; (B) sinóvia; (C) reabsorção óssea e (D) score infiltrado total. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). \* Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados e tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%.....168

**Figura 27.** Análise histológica, com coloração por azul de toluidina para avaliação de perda de proteoglicanos, das articulações fêmur-tibial coletadas no ensaio de AIA crônico realizado com os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% (300 mg/kg) de folhas de *E. macrophyllus*. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). \* Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). (A) PBS, animais não desafiados e tratados com veículo; (B) mBSA, grupo desafiado; (C) Dx, grupo tratado com dexametasona (5 mg/kg); (D) EtOH, grupo tratado com extrato etanólico 96°GL; (E) E70%, grupo tratado com extrato hidroetanólico a 70%; (F) perda percentual de proteoglicanos. As imagens representam os campos histológicos (40x) de todos os tratamentos realizado com 6 animais, sendo apenas um animal representado na figura.....172

**Figura 28.** Viabilidade celular em cultura de condrócitos murinos dos extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2) avaliada pelos métodos de LDH e MTT. Os dados representam a média  $\pm$  DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  ####,  $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). C-: células não tratadas; Dm: solvente DMSO + células; Dx: dexametasona (0,2  $\mu\text{M}$ ); EtOH: extrato etanólico 96°GL; 50: extrato hidroetanólico a 50%; 70: extrato hidroetanólico a 70%.....173

**Figura 29.** Curvas de quantificação obtidas para os primers MMP3 (A), MMP13 (B) e COL2A1 (C). Condições experimentais vide item 4.14.3.3.....175

**Figura 30.** Atividade dos extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% (50  $\mu\text{g/mL}$ ) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2) em cultura de condrócitos murinos estimulados com LPS. Os dados representam a média  $\pm$  DP de duplicatas biológicas cada uma delas

com triplicatas experimentais. (A) Citotoxicidade dos extratos determinada pelo ensaio do LDH; (B) concentração (pg/mL) de IL-6 liberada no meio após estímulo com LPS; (C) expressão da enzima metaloproteinases do tipo 3 (MMP3) determinada por qPCR.

\*Indica a diferença significativa com o grupo células com estímulo de LPS e tratamento com o solvente DMSO (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ ,

## $p < 0,01$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). ut: células sem tratamento e estímulo; Cel+LPS: células + LPS; DMSO: solvente DMSO (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); Et: extrato etanólico 96°GL; 50%: extrato hidroetanólico a 50%; 70%: extrato hidroetanólico a 70%.....176

**Figura 31.** Liófilo obtido após a secagem do extrato EtOH 50% + 2,5% sacarose (crioprotetor) por liofilização.....178

**Figura 32.** Extrato EtOH 70% seco pelo método de *spray dryer*. As setas indicam as partículas do pó não homogêneas da solução extrativa antes do processo de secagem e após a secagem na obtenção do pó.....180

**Figura 33.** Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato EtOH 70% seco pelo método de liofilização (A) e por atomização em *spray dryer* (B). Condições experimentais: vide item 4.8.2.....181

**Figura 34.** Extratos secos EtOH 70% e EtOH 50% de *E. macrophyllus* obtidos pela secagem por *spray dryer* sem adição de adjuvante (A) com adição de Aerosil®, 12,5% (B), 25,0% (C) e 35% (D).....183

**Figura 35** Solubilidade em água dos extratos EtOH 50% (A) e EtOH 70% (B) obtidos por *spray dryer* com adição de diferentes concentrações de Aerosil®. #Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett).

A)12,5%: extrato EtOH 50% com 12,5% de Aerosil®; 25%: extrato EtOH 50% com 25% de Aerosil®; 35%: extrato EtOH 50% com 35% de Aerosil®. B) 12,5%: extrato EtOH 70% com 12,5% de Aerosil®; 25%: extrato EtOH 70% com 25% de Aerosil®; 35%: extrato EtOH 70% com 35% de Aerosil®.....187

**Figura 36.** Determinação do tamanho de partícula por DLS, expresso em média de tamanho, dos extratos EtOH 50% e EtOH 70%. (A) Extrato EtOH 50% sem adição de Aerosil®; extratos EtOH 50% preparados com adição de Aerosil® nas concentrações (m/m) de 12,5% (B), 25% (C) e 35% (D). (E) Extrato EtOH 70% sem adição de Aerosil®; extratos EtOH 70% preparados com adição de Aerosil® nas concentrações (m/m) de 12,5% (F), 25% (G) e 35% (H).....188

**Figura 37.** Microfotografias obtidas por MEV com ampliação de 5000× para os extratos secos de folhas de *E. macrophyllus* contendo Aerosil®. (A) Extrato EtOH 50% + 12,5% m/m de Aerosil®. (B) EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil®. (C) EtOH 50% + 35% m/m de Aerosil®. (D) EtOH 70% + 12,5% m/m de Aerosil®. (E) EtOH 70% + 25% m/m de Aerosil®. (E) EtOH 70% + 35% m/m de Aerosil®. Condições experimentais vide item 4.15.2.4.....190

**Figura 38.** Cromatogramas registrados por UPLC-DAD para os extratos EtOH 50% (A) e EtOH 70% (B) de *E. macrophyllus* preparados sem adição de Aerosil® (azul) e com adição de 12,5% (verde) e 25% (vermelho) de Aerosil®. Análise média das áreas dos picos ( $n = 3$ ) referentes aos marcadores químicos nos extratos EtOH 50% (C) e EtOH 70% (D) com e sem a adição do Aerosil®. Condições experimentais: vide item 4.8.2. O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, pós-teste de Dunnett. 0: sem a adição de Aerosil®; 12,5: extrato com a adição de 12,5% de Aerosil®; 25: extrato com a adição de 25% de Aerosil®.....191

**Figura 39.** Aspecto macroscópico do lote do extrato padronizado obtido de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% contendo 25% de Aerosil®).....194

**Figura 40.** Teores de marcadores químicos no lote da formulação do extrato EtOH 50% padronizado de *E. macrophyllus*. Comparação entre o teor do extrato EtOH 50% e do lote da formulação ( $n = 3$ ). Condições experimentais: vide item 4.8.2. #Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). ACT: ácidos *cis*- e *trans*-aconítico; HOM: homoorientina; SWE: swertisina; CHI: ácido chicórico; CAF: ácido cafeoil-feruloil-tartárico; DIF: ácido diferuloil-tartático.....198

**Figura 41.** Atividade anti-inflamatória do lote da formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de folhas contendo 25% m/m de Aerosil® + 10% m/m de celulose) em modelo de AIA agudo. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). Número de células na cavidade intra-articular: (A) células totais; (B) neutrófilos; (C) monócitos. Concentrações de IL-1 $\beta$  e (D) e CXCL-1 (E) no tecido periarticular. \*Indica a diferença significativa com o grupo de animais estimulados e tratados com o veículo (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não tratados; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg);

30: extrato EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil® a 30 mg/kg; 300: extrato EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil® a 300 mg/kg.....199

**Figura 42.** Histologia do tecido periarticular (40x) de animais tratados com a formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de folhas contendo 25% m/m de Aerosil® + 10% m/m de celulose) em modelo de AIA agudo, com coloração por HE. (A) controle; (B) desafiado; (C) dexametasona 5 mg/kg; (D) formulação a 30 mg/kg; (E) formulação a 300 mg/kg. As setas indicam as células inflamatórias.....201

**Figura 43.** Perfil de infiltrado celular inflamatório no modelo de AIA agudo após tratamento com a formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de folhas de *E. macrophyllus* contendo 25% m/m de Aerosil® e 10% m/m de celulose). C: controle; D: desafiado; Dx: dexametasona 5mg/kg; E30: formulação 30 mg/kg; E300: formulação 300 mg/kg.....201

**Figura 44.** Análise do perfil inflamatório total, inflamação na sinóvia, parâmetros inflamatórios teciduais e de reabsorção óssea após administração da formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de partes áreas contendo 25% m/m de Aerosil® e 10% m/m de celulose) em modelo de AIA agudo. \* Indica diferença dos tratamentos entre os grupos controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). C: controle; D: desafiado; Dx: dexametasona 5 mg/kg; E30: formulação 30 mg/kg; E300: formulação 300 mg/kg.....202

**Figura 45:** Sequência do desenvolvimento racional do extrato padronizado e formulação com *E. macrophyllus* e principais resultados obtidos neste trabalho, com vista ao desenvolvimento futuro de fitoterápico antiartrítico.....204

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Citocinas inflamatórias e suas funções.....                                                                                                                                          | 41  |
| <b>Tabela 2:</b> Espécies vegetais com potencial antiartrítico.....                                                                                                                                   | 58  |
| <b>Tabela 3:</b> Rendimentos extrativos obtidos para os extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de DV1, DV2 e DVMus preparados por sonicação.....                                          | 66  |
| <b>Tabela 4:</b> Condição de eluição utilizada para análise dos extratos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.....                                                                                                  | 67  |
| <b>Tabela 5:</b> Condições espectroscópicas definidas para a análise dos extratos.....                                                                                                                | 67  |
| <b>Tabela 6:</b> Primers usados no PCR e sequenciamento.....                                                                                                                                          | 69  |
| <b>Tabela 7:</b> Números de acesso no GenBank e dados de <i>voucher</i> dos terminais utilizados nas análises filogenéticas de <i>Echinodorus</i> .....                                               | 71  |
| <b>Tabela 8:</b> Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação de marcadores químicos de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> ..... | 75  |
| <b>Tabela 9:</b> Gradiente de eluição desenvolvido para quantificar marcadores químicos em extratos de <i>E. macrophyllus</i> por UPLC-DAD.....                                                       | 76  |
| <b>Tabela 10:</b> Correspondência entre os volumes e as massas de SQR adicionadas ao extrato EtOH 70% de <i>E. macrophyllus</i> para ensaio de recuperação.....                                       | 80  |
| <b>Tabela 11:</b> Propriedades de fluxo e relação com ângulo de repouso e razão de Hausner.....                                                                                                       | 100 |
| <b>Tabela 12:</b> Condições padronizadas para secagem do extrato por <i>spray dryer</i> para obtenção do lote do extrato padronizado.....                                                             | 101 |
| <b>Tabela 13:</b> Constituintes caracterizados nos extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> , a partir de análises por UPLC-DAD-ESI-MS.....    | 109 |
| <b>Tabela 14:</b> Resultados do teste de adequabilidade do sistema para os marcadores químicos de <i>E. macrophyllus</i> .....                                                                        | 117 |
| <b>Tabela 15:</b> Análise dos tempos de retenção, ângulo de pureza e limiar de pureza para determinação da seletividade.....                                                                          | 119 |
| <b>Tabela 16:</b> Concentração injetada, áreas médias ( $n = 3$ ) e desvio padrão relativo das áreas dos marcadores químicos nas curvas analíticas, em três dias de análise.....                      | 120 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 17.</b> Análise de regressão linear para a quantificação de marcadores químicos definidos de <i>E. macrophyllus</i> e testes estatísticos para avaliar o modelo de regressão.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 123 |
| <b>Tabela 18.</b> Limites de detecção e quantificação dos marcadores químicos definidos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 124 |
| <b>Tabela 19.</b> Teores percentuais e DPR de marcadores químicos no extrato EtOH 70% de <i>E. macrophyllus</i> para determinação da precisão intradia do método.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 124 |
| <b>Tabela 20.</b> Teores percentuais e DPR de marcadores químicos no extrato EtOH 70% de <i>E. macrophyllus</i> para determinação da precisão interdia do método.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 125 |
| <b>Tabela 21.</b> Valores de recuperação dos ácidos <i>cis</i> - e <i>trans</i> - aconíticos, homoorientina, swertisina e ácido chicórico no extrato EtOH 70% de <i>E. macrophyllus</i> (média, n = 3).....                                                                                                                                                                                                                                         | 126 |
| <b>Tabela 22.</b> Rendimentos extrativos e teores (média ± DP de triplicatas) de marcadores químicos em extratos de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 132 |
| <b>Tabela 23.</b> Amplificações realizadas com o DNA extraído de DVMus para os primers analisados, rendimentos e imagens de PCR dos produtos resultantes das amplificações. (P) Marcador de massa molecular (100 pb Ludwig).....                                                                                                                                                                                                                    | 134 |
| <b>Tabela 24.</b> Melhores correspondências entre as sequências de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (MHNJB) e aquelas do banco de dados GenBank usando <i>Blastn</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 139 |
| <b>Tabela 25.</b> Caracterização dos marcadores utilizados nas análises filogenéticas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 139 |
| <b>Tabela 26.</b> Distâncias médias dentro e entre os principais clados recuperados na análise filogenética. As distâncias médias dentro dos grupos são destacadas em negrito.....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 140 |
| <b>Tabela 27.</b> Distâncias médias aos pares para cada marcador dentro dos principais clados recuperados na análise filogenética.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 140 |
| <b>Tabela 28.</b> Atividade antioxidante de extratos de <i>E. macrophyllus</i> (DV1, DV2 e DVMus) e <i>E. grandiflorus</i> (EG) avaliada <i>in vitro</i> nos modelos de captura dos radicais DPPH e co-oxidação β-caroteno/ácido linoleico e efeito de extratos selecionados sobre ROS produzidas por células THP-1 estimuladas por LPS.....                                                                                                        | 145 |
| <b>Tabela 29.</b> Rendimentos e massas dos extratos secos obtidas nos ensaios extrativos realizados com <i>E. macrophyllus</i> (DV1). Os ensaios extrativos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram analisados por ANOVA comparando-se todos os extratos de todos os grupos por <i>one way</i> , com posterior teste de Dunnett para comparação múltipla. Nível de significância do teste estatístico foi $p < 0,05$ . Para os |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| valores obtidos de massa e rendimento extrativo, letras diferentes (a, b e c) representam as diferenças significativas.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 153 |
| <b>Tabela 30.</b> Rendimento extrativo dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% secos por <i>spray-dryer</i> , com e sem a adição de Aerosil® como adjuvante. O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, após a utilização do pós-teste de Dunnett.....                                                        | 176 |
| <b>Tabela 31.</b> Umidade dos extratos EtOH 50% e EtOH 70% secos por <i>spray-dryer</i> com adição de diferentes concentrações de Aerosil®, determinado por Karl Fisher ( $n=3$ ). O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, após a utilização do pós-teste de Dunnett.....                           | 184 |
| <b>Tabela 32</b> Solubilidade em água dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% com a adição de Aerosil® realizados em triplicata. EtOH 50%: extrato hidroetanólico a 50%. EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%. ®. O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, após a utilização do pós-teste de Dunnett..... | 186 |
| <b>Tabela 33.</b> Formulação do extrato seco do lote piloto (EtOH 50% + 25% de Aerosil®) com adição de celulose microcristalina.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 196 |

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                        |                                           |
|------------------------|-------------------------------------------|
| <b>µg</b>              | Microgramas                               |
| <b>µL</b>              | Microlitros                               |
| <b>ACN</b>             | Acetonitrila                              |
| <b>ACP</b>             | Anticorpos antiproteínas modificadas      |
| <b>AIA</b>             | Artrite induzida por antígeno             |
| <b>AIES</b>            | Anti-inflamatórios esteroidais            |
| <b>AINES</b>           | Anti-inflamatórios não esteroidais        |
| <b>AMPA</b>            | Anticorpos antiproteínas modificadas      |
| <b>ANOVA</b>           | Análise de variância                      |
| <b>ANTICCP</b>         | Antipeptídeos citrulinados cíclicos       |
| <b>ANVISA</b>          | Agência Nacional de Vigilância Sanitária  |
| <b>AO</b>              | Osteoartrite                              |
| <b>APCs</b>            | Células apresentadoras de antígeno        |
| <b>AR</b>              | Artrite reumatoide                        |
| <b>BDNF</b>            | Fator neutrófico derivado do cérebro      |
| <b>BHCB</b>            | Departamento de Botânica da UFMG          |
| <b>BI</b>              | Inferência Bayesiana                      |
| <b>BM</b>              | Medula óssea                              |
| <b>BPS</b>             | Banco de Preços em Saúde                  |
| <b>BSA</b>             | Albumina sérica bovina                    |
| <b>CCD</b>             | Cromatografia em camada delgada           |
| <b>CCL2</b>            | Quimiocina atrativa de monócitos          |
| <b>CCL5</b>            | Quimiocina RANTES                         |
| <b>CEUA</b>            | Comissão de ética no uso de animais       |
| <b>CE<sub>50</sub></b> | Concentração efetiva de 50%               |
| <b>CFA</b>             | Adjuvante completo de Freud               |
| <b>CHIKV</b>           | Vírus Chikungunya                         |
| <b>CI<sub>50</sub></b> | Concentração inibitória de 50%            |
| <b>CLAE</b>            | Cromatografia líquida de alta eficiência  |
| <b>CLUE</b>            | Cromatografia líquida de ultra eficiência |
| <b>COL2A1</b>          | Colágeno 2A1                              |
| <b>COX-2</b>           | Ciclooxigenase do tipo 2                  |

|                           |                                                                                                         |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CTAB</b>               | Brometo de cetiltrimetilamônio 2x                                                                       |
| <b>CXCL1</b>              | Quimiocina atrativa de neutrófilos 1                                                                    |
| <b>CXCL2</b>              | Quimiocina atrativa de neutrófilos 2                                                                    |
| <b>DA</b>                 | Densidade aparente                                                                                      |
| <b>DAD</b>                | Arranjo de diodos                                                                                       |
| <b>DAMPs</b>              | Padrões moleculares associados a lesão                                                                  |
| <b>DC</b>                 | Densidade compactada                                                                                    |
| <b>DLS</b>                | Espalhamento dinâmico da luz                                                                            |
| <b>DMSO</b>               | Dimetilsulfóxido                                                                                        |
| <b>DNA</b>                | Ácido desoxirribonucleico                                                                               |
| <b>DP</b>                 | Desvio padrão                                                                                           |
| <b>DPPH</b>               | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil                                                                            |
| <b>DPR</b>                | Desvio padrão relativo                                                                                  |
| <b>DV1</b>                | Lote 1 de droga vegetal de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>                                    |
| <b>DV2</b>                | Lote 2 de droga vegetal de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i>                                    |
| <b>DVMus</b>              | Droga vegetal de folhas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> oriundo do Museu de História Natural da UFMG |
| <b>EDTA</b>               | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                                                      |
| <b>EG</b>                 | <i>Echinodorus grandiflorus</i>                                                                         |
| <b>ELISA</b>              | Ensaio de imunoabsorção enzimática                                                                      |
| <b>EM-TQD</b>             | Espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo                                                |
| <b>EMA</b>                | Agência Europeia de Medicamentos (                                                                      |
| <b>ESI</b>                | Ionização por electrospray Z-spray                                                                      |
| <b>EtOAc</b>              | Acetato de etila                                                                                        |
| <b>FDA</b>                | <i>Food and Drug Administration</i>                                                                     |
| <b>FR</b>                 | Fator reumatoide                                                                                        |
| <b>G-CSF</b>              | Fator estimulador de colônias granulocitárias                                                           |
| <b>GM-CSF</b>             | Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófago                                                  |
| <b>HE</b>                 | Hematoxilina-eosina                                                                                     |
| <b>HLA</b>                | Antígeno leucocitário humano                                                                            |
| <b>hLRTs</b>              | Testes de razão de verossimilhança hierárquica                                                          |
| <b>H<sub>2</sub>DCFDA</b> | 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato                                                             |
| <b>ICB</b>                | Instituto de Ciências Biológicas da UFMG                                                                |
| <b>IFA</b>                | Adjuvante incompleto de Freud                                                                           |

|                                                  |                                                |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>IFN<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b> | Receptor de interferon $\alpha$ / $\beta$      |
| <b>IFN<math>\gamma</math></b>                    | Receptor de interferon $\gamma$                |
| <b>I<math>\kappa</math>B</b>                     | Proteínas inibidoras da família $\kappa$ B     |
| <b>IKK</b>                                       | Complexo I $\kappa$ B quinase                  |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>                    | Interleucina 1 $\beta$                         |
| <b>ITS</b>                                       | Espaçador transcrito interno                   |
| <b>JAK</b>                                       | Janus quinases                                 |
| <b>k</b>                                         | Fator de retenção                              |
| <b>KF</b>                                        | Karl Fischer                                   |
| <b>Kg</b>                                        | Kilograma                                      |
| <b>LD</b>                                        | Limite de detecção                             |
| <b>LDH</b>                                       | Lactato desidrogenase                          |
| <b>LPS</b>                                       | Lipopolissacarídeo bacteriano                  |
| <b>LQ</b>                                        | Limite de quantificação                        |
| <b>LTB4</b>                                      | Leucotrieno tipo 4                             |
| <b>m/z</b>                                       | Razão massa/carga                              |
| <b>MAPK</b>                                      | Proteína quinase ativada por mitógeno          |
| <b>MAPKK</b>                                     | Proteína quinase quinase ativada por mitógeno  |
| <b>MAPKs</b>                                     | Proteínas quinases ativadas por mitógenos      |
| <b>MATk</b>                                      | Gene cloroplasto maturase K                    |
| <b>mBSA</b>                                      | Albumina sérica bovina metilada                |
| <b>MD</b>                                        | Maceração dinâmica                             |
| <b>ME</b>                                        | Maceração estática                             |
| <b>MeOH</b>                                      | Metanol                                        |
| <b>MEV</b>                                       | Microscopia de varredura eletrônica            |
| <b>mg</b>                                        | Miligramas                                     |
| <b>mL</b>                                        | Mililitros                                     |
| <b>MMP</b>                                       | Metaloproteinases de matriz                    |
| <b>MMP2</b>                                      | Metaloproteinase de matriz 2                   |
| <b>MMP3</b>                                      | Metaloproteinase de matriz 3                   |
| <b>MMP13</b>                                     | Metaloproteinase de matriz 13                  |
| <b>MMQO</b>                                      | Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) |
| <b>MP</b>                                        | Máxima parcimônia                              |
| <b>MS</b>                                        | Ministério da Saúde                            |

|                      |                                                                    |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>MTT</b>           | 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio                    |
| <b>NADH</b>          | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo                                 |
| <b>NADPH</b>         | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato                         |
| <b>NF-κB</b>         | Fator nuclear kappa B                                              |
| <b>NLRP3</b>         | Estrutura multiproteica intracelular                               |
| <b>Nm</b>            | Nanômetro                                                          |
| <b>OPD</b>           | o-Fenilenodiamina                                                  |
| <b>P</b>             | Percolação                                                         |
| <b>p.o.</b>          | <i>per os</i> (via oral)                                           |
| <b>PAMPs</b>         | Padrões moleculares associados a patógenos                         |
| <b>PBS</b>           | Tampão fosfato                                                     |
| <b>PCDT</b>          | Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas                        |
| <b>PCFT</b>          | Protocolo clínico de diretrizes terapêuticas                       |
| <b>PCR</b>           | Reação em cadeia da polimerase                                     |
| <b>PMA</b>           | Miristato de forbol                                                |
| <b>PMSF</b>          | Fluoreto de fenilmetilsulfonil                                     |
| <b>PNPIC</b>         | Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares        |
| <b>PNPMF</b>         | Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos            |
| <b>PRRs</b>          | Receptores de reconhecimento de padrões                            |
| <b>PRSF</b>          | Fator de Redução da Escala Potencial                               |
| <b>PVP</b>           | Polivinilpirrolidona                                               |
| <b>PVDF</b>          | Fluoreto de polivinilideno                                         |
| <b>Q-TOF-MS</b>      | Detector de massa de alta resolução com ionização por electrospray |
| <b>qPCR</b>          | Reação em cadeia da polimerase quantitativo                        |
| <b>r</b>             | Coeficiente de correlação                                          |
| <b>r<sup>2</sup></b> | Coeficiente de determinação                                        |
| <b>RANKL</b>         | Receptor do fator nuclear kappa B ligante                          |
| <b>RENISUS</b>       | Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse no SUS         |
| <b>RNA</b>           | Ácido ribonucleico                                                 |
| <b>ROS</b>           | Espécies reativas de oxigênio                                      |
| <b>Rs</b>            | Resolução                                                          |
| <b>RSA</b>           | Atividade de eliminação de radicais                                |
| <b>SFB</b>           | Soro fetal bovino                                                  |
| <b>SISGEN</b>        | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético                  |

|              |                                                                                          |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SOD</b>   | Superóxido dismutases                                                                    |
| <b>SQR</b>   | Substância química de referência                                                         |
| <b>SRB</b>   | Sulforrodamina B                                                                         |
| <b>STAT</b>  | Transdutor de sinal e ativador de transcrição                                            |
| <b>SUS</b>   | Sistema Único de Saúde                                                                   |
| <b>TBR</b>   | <i>Tree-bisection and reconnection</i>                                                   |
| <b>TCA</b>   | Ácido tricloroacético                                                                    |
| <b>TCR</b>   | Receptor de células T                                                                    |
| <b>THP-1</b> | Linhagem celular monocítica humana derivada de um paciente com leucemia monocítica aguda |
| <b>TNF</b>   | Fator de necrose tumoral                                                                 |
| <b>TNFR1</b> | Receptor de fator de necrose tumoral 1                                                   |
| <b>TNFR2</b> | Receptor de fator de necrose tumoral 2                                                   |
| <b>UFMG</b>  | Universidade Federal de Minas Gerais                                                     |
| <b>USP</b>   | Universidade de São Paulo                                                                |
| <b>UV</b>    | Ultravioleta                                                                             |

## LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

- (1) Echinofilina A
- (2) Echinofilina B
- (3) Echinofilina C
- (4) Echinofilina D
- (5) Echinofilina E
- (6) Echinofilina F
- (7) Chapecoderina A
- (8) Chapecoderina B
- (9) Chapecoderina C
- (10) Echinodolídeo A
- (11) Echinodolídeo B
- (12) Vitexina
- (13) Isovitexina
- (14) Orientina
- (15) Colchinina
- (16) Ácido *cis*-aconítico
- (17) Ácido *trans*-aconítico
- (18) Homoorientina
- (19) Swertisina
- (20) Ácido chicórico
- (21) Ácido cafeoil-feruloil-tartárico
- (22) Ácido di-feruloil-tartárico

## SUMÁRIO

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                        | 32 |
| 2 OBJETIVOS.....                                                                                         | 33 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                                                                                  | 33 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                           | 34 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA.....                                                                             | 34 |
| 3.1 Inflamação.....                                                                                      | 34 |
| 3.2 Ativação da via de sinalização do NF-κB e liberação de citocinas pró-inflamatórias.....              | 39 |
| 3.3 Ativação das vias de sinalização MAPK e JAK-STAT.....                                                | 41 |
| 3.4 Doenças artríticas.....                                                                              | 43 |
| 3.4.1 Artrite reumatoide (AR).....                                                                       | 44 |
| 3.4.2 Osteoartrite (OA) .....                                                                            | 47 |
| 3.5 Aspectos gerais, química e atividades biológicas de <i>Echinodorus macrophyllus</i> .....            | 50 |
| 3.6 Produtos naturais com atividade antiartrítica.....                                                   | 56 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                                               | 60 |
| 4.1 Equipamentos .....                                                                                   | 60 |
| 4.2 Solventes e reagentes.....                                                                           | 62 |
| 4.3 Vidrarias e materiais diversos.....                                                                  | 64 |
| 4.4 Obtenção e processamento do material vegetal.....                                                    | 65 |
| 4.5 Análise da composição química qualitativa das drogas vegetais por LC-MS.....                         | 65 |
| 4.5.1 Preparo dos extratos.....                                                                          | 66 |
| 4.5.2 Análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.....                                                               | 66 |
| 4.6 Identificação molecular e análise filogenética de <i>E. macrophyllus</i> .....                       | 68 |
| 4.6.1 Isolamento de DNA, amplificação, sequenciamento, alinhamento e cálculo de distância par a par..... | 68 |
| 4.6.2 Marcadores moleculares, análises filogenéticas e moleculares.....                                  | 69 |
| 4.7 Ensaios extrativos para obtenção de extrato padronizado.....                                         | 73 |

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.8 Desenvolvimento de método analítico para a quantificação dos marcadores químicos de <i>E. macrophyllus</i> por UPLC-DAD..... | 74 |
| 4.8.1 Preparo das amostras e soluções de substâncias químicas de referência.....                                                 | 74 |
| 4.8.2 Desenvolvimento do método cromatográfico.....                                                                              | 74 |
| 4.8.3 Validação do método analítico de quantificação por UPLC-DAD.....                                                           | 77 |
| 4.8.3.1 Teste de adequabilidade do sistema.....                                                                                  | 77 |
| 4.8.3.2 Seletividade.....                                                                                                        | 77 |
| 4.8.3.3 Linearidade.....                                                                                                         | 78 |
| 4.8.3.4 Limite de quantificação .....                                                                                            | 78 |
| 4.8.3.5 Limite de detecção.....                                                                                                  | 78 |
| 4.8.3.6 Precisão.....                                                                                                            | 79 |
| 4.8.3.7 Exatidão.....                                                                                                            | 79 |
| 4.8.3.8 Robustez.....                                                                                                            | 80 |
| 4.9 Quantificação dos marcadores químicos em extratos de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> por UPLC-DAD.....       | 80 |
| 4.10 Atividade dos extratos sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios <i>in vitro</i> .....                              | 81 |
| 4.10.1 Avaliação da viabilidade celular por SRB.....                                                                             | 81 |
| 4.10.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT.....                                                                             | 82 |
| 4.10.3 Determinação da concentração de TNF e IL-1 $\beta$ .....                                                                  | 82 |
| 4.10.3.1 Protocolos de ELISA para ensaios <i>in vitro</i> .....                                                                  | 83 |
| 4.11 Avaliação da atividade antioxidante de extratos obtidos de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> .....            | 84 |
| 4.11.1 Atividade de captura dos radicais DPPH.....                                                                               | 84 |
| 4.11.2 Ensaio de cooxidação do $\beta$ -carotenol/ácido linoleico.....                                                           | 84 |
| 4.11.3 Atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células THP-1.....                                                    | 85 |
| 4.12 Análises quimiométricas.....                                                                                                | 86 |
| 4.13 Ensaios pré-clínicos para avaliação do potencial antiartrítico.....                                                         | 86 |
| 4.13.1 Animais.....                                                                                                              | 86 |
| 4.13.2 Modelo de AIA agudo.....                                                                                                  | 87 |
| 4.13.3 Modelo de AIA crônico.....                                                                                                | 87 |

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.13.4 Contagem celular.....                                                                          | 88  |
| 4.13.5 Quantificação de citocinas.....                                                                | 89  |
| 4.13.5.1 Protocolo de ELISA para ensaios <i>in vivo</i> .....                                         | 89  |
| 4.13.6 Histopatologia da articulação.....                                                             | 90  |
| 4.14 Avaliação do potencial anti-inflamatório em cultura primária de condrócitos murinos.....         | 91  |
| 4.14.1 Padronização das condições experimentais.....                                                  | 91  |
| 4.14.2 Isolamento de condrócitos de camundongos neonatos.....                                         | 91  |
| 4.14.3 Protocolo para avaliação do potencial anti-inflamatório em cultura de condrócitos murinos..... | 92  |
| 4.14.3.1 Viabilidade celular pela dosagem de LDH.....                                                 | 92  |
| 4.14.3.2 Dosagem de IL-6 por ELISA.....                                                               | 93  |
| 4.14.3.3 Quantificação de MMP-3, MMP-13 e COL2A1 por RT-qPCR.....                                     | 93  |
| 4.15 Desenvolvimento farmacotécnico para obtenção do extrato padronizado.....                         | 95  |
| 4.15.1 Preparo de extratos padronizados para o processo de secagem.....                               | 95  |
| 4.15.2 Secagem dos extratos por <i>spray dryer</i> .....                                              | 95  |
| 4.15.2.1 Adição de adjuvante.....                                                                     | 95  |
| 4.15.3 Caracterização dos pós obtidos por <i>spray dryer</i> .....                                    | 96  |
| 4.15.3.1 Solubilidade em água.....                                                                    | 96  |
| 4.15.3.2 Análise do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico da luz (DLS).....                  | 96  |
| 4.15.3.3 Análise qualitativa por UPLC-DAD.....                                                        | 97  |
| 4.15.3.4 Análise morfológica dos pós por MEV.....                                                     | 97  |
| 4.15.3.5 Determinação da umidade por Karl Fischer.....                                                | 97  |
| 4.15.3.6 Fluidez do pó.....                                                                           | 99  |
| 4.15.3.6.1 Determinação da densidade aparente e compactada.....                                       | 99  |
| 4.15.3.6.2 Determinação do ângulo de repouso.....                                                     | 100 |
| 4.15.4 Adição de excipiente para otimização do pó obtido.....                                         | 100 |
| 4.16 Obtenção da formulação em escala de bancada.....                                                 | 101 |
| 4.17 Análises estatísticas.....                                                                       | 102 |

|                                                                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                                                        | <b>102</b> |
| <b>5.1 Caracterização química dos extratos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS.....</b>                                                    | <b>103</b> |
| <b>5.2 Quantificação dos marcadores químicos por UPLC-DAD.....</b>                                                            | <b>111</b> |
| 5.2.1 Desenvolvimento do método analítico.....                                                                                | 111        |
| 5.2.2 Validação do método analítico por UPLC-DAD.....                                                                         | 115        |
| 5.2.2.1 Teste de adequabilidade do sistema.....                                                                               | 116        |
| 5.2.2.2 Seletividade.....                                                                                                     | 117        |
| 5.2.2.3 Linearidade.....                                                                                                      | 119        |
| 5.2.2.4 Limite de detecção e quantificação.....                                                                               | 123        |
| 5.2.2.5 Precisão.....                                                                                                         | 124        |
| 5.2.2.5.1 Precisão intradia.....                                                                                              | 124        |
| 5.2.2.5.2 Precisão interdias.....                                                                                             | 125        |
| 5.2.2.6 Exatidão.....                                                                                                         | 126        |
| 5.2.2.7 Robustez.....                                                                                                         | 127        |
| 5.2.3 Quantificação dos marcadores químicos em extratos de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> .....              | 129        |
| 5.3 Análise molecular de <i>E. macrophyllus</i> .....                                                                         | 133        |
| 5.4 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial efeito anti-inflamatório de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> .....  | 142        |
| 5.5 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos de <i>E. macrophyllus</i> e <i>E. grandiflorus</i> ..... | 144        |
| 5.6 Análises quimiométricas.....                                                                                              | 149        |
| 5.7 Ensaios extrativos para obtenção de extrato padronizado de <i>E. macrophyllus</i> .....                                   | 152        |
| 5.7.1 Ensaios extrativos.....                                                                                                 | 152        |
| 5.7.2 Quantificação de marcadores químicos nos extratos obtidos nos ensaios extrativos com <i>E. macrophyllus</i> .....       | 155        |
| 5.7.3 Atividade <i>in vitro</i> dos extratos obtidos no ensaio extrativo sobre mediadores pró-inflamatórios.....              | 157        |
| 5.7.4 Avaliação dos extratos obtidos por percolação em modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA agudo).....         | 160        |
| 5.8 Avaliação dos extratos em modelo crônico de artrite induzida por antígeno (AIA crônico).....                              | 165        |

|                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.8.1 Investigação do mecanismo de ação dos extratos em cultura de condrócitos.....                                                       | 173 |
| 5.9 Desenvolvimento farmacotécnico do extrato padronizado.....                                                                            | 177 |
| 5.9.1 Caracterização físico-química e teor de marcadores químicos dos extratos secos por <i>spray dryer</i> .....                         | 184 |
| 5.10 Obtenção e caracterização de formulação com extrato padronizado de <i>E. macrophyllus</i> .....                                      | 193 |
| 5.10.1 Produção do lote da formulação.....                                                                                                | 193 |
| 5.10.2 Caracterização química e físico-química do lote do extrato padronizado.....                                                        | 194 |
| 5.10.3 Formulação do extrato seco desenvolvido.....                                                                                       | 195 |
| 5.10.3.1 Análise de fluidez do pó para encapsulação.....                                                                                  | 195 |
| 5.10.4 Teores de marcadores químicos.....                                                                                                 | 197 |
| 5.10.5 Avaliação da atividade antiartrítica da formulação em modelo de AIA agudo.....                                                     | 198 |
| 5.11 Síntese das atividades realizadas com vistas ao desenvolvimento futuro de fitoterápico antiartrítico de <i>E. macrophyllus</i> ..... | 204 |
| 6 CONCLUSÕES.....                                                                                                                         | 205 |
| Referências.....                                                                                                                          | 206 |

## 1 INTRODUÇÃO

É notória a expansão do mercado de fitoterápicos no Brasil: em 2015, a comercialização desses produtos no país movimentou US\$ 550 milhões, sendo estimado um crescimento anual de 12% nesse mercado no Brasil (CARVALHO et al., 2017), e um crescimento global de US\$ 347,50 bilhões até 2029 (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2022). Ainda, um levantamento recente realizado pelo *Fortune Business Insights* em 2022, demonstrou que a pandemia causada pelo Covid-19 impactou em uma maior demanda do mercado de fitoterápicos em todas as regiões em comparação com os níveis pré-pandemia, apresentando um crescimento global acima do esperado de 8,4% em 2020 se comparado a 2019. A expansão do mercado estaria associada ao menor custo e tempo dispendido no desenvolvimento de fitoterápicos, em comparação com fármacos sintéticos (HASENCLEVER et al., 2017). Adicionalmente, outras vantagens são atribuídas aos fitoterápicos, como menor custo associado em alguns tratamentos, baixa incidência de efeitos tóxicos e adversos, além de interações sinérgicas entre os componentes químicos do fitocomplexo. Não menos relevante é a riquíssima biodiversidade brasileira que, associada ao menor volume de recursos dispendidos para o desenvolvimento de fitoterápicos e a autonomia de produção no país, são fatores que podem impulsionar o desenvolvimento de produtos inovadores por indústrias farmacêuticas nacionais (HASENCLEVER et al., 2017).

As principais enfermidades pesquisadas pela indústria farmacêutica na atualidade são aquelas relacionadas a processos inflamatórios, doenças infecciosas e câncer, com mais de 50 fármacos aprovados para cada uma dessas patologias nos últimos 30 anos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Dentre as doenças de natureza inflamatória destacam-se as doenças artríticas como osteoartrite (AO) e a artrite reumatoide (AR), uma doença autoimune sistêmica, de etiologia desconhecida, que leva à destruição das articulações e deformidades por erosão óssea e de cartilagens, resultando em limitações graves e impacto econômico para o paciente e para a sociedade. Há poucos estudos de prevalência da AR na América Latina (BRASIL, 2021); no entanto, no Brasil, estima-se que a AR acometa de 0,2% a 1% da população (OLIVEIRA et al., 2017). Já a OA é considerada a terceira doença mais comum entre pacientes com mais de 60 anos, acarretando aposentadoria precoce e redução da qualidade de vida dos portadores da doença (COIMBRA; PLAPLER; CAMPOS, 2019).

A farmacoterapia atual da AR e da OA é baseada no uso de fármacos modificadores do progresso da doença, como o metotrexato, que apresenta graves efeitos adversos. Os fármacos biológicos, também utilizados no tratamento da AR, atuam em mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF). No entanto, eles demandam administração parenteral e induzem resposta terapêutica não uniforme, além de promoverem efeitos adversos graves e apresentarem alto custo (FINDEISEN; SEWELL; OSTOR, 2021). Portanto, é de grande relevância a pesquisa de novos fármacos com potencial atividade antiartrítica, que possam ser administrados por via oral, oferecendo maior comodidade ao paciente, que induzam menos efeitos adversos e que diminuam o impacto financeiro do tratamento, tanto para o paciente quanto para o sistema público de saúde.

Diversas plantas medicinais são utilizadas tradicionalmente no país e no mundo como agentes anti-inflamatórios (RIBEIRO et al., 2018; OLUWAFEMI; OGUNTIBEJU, 2018). Dentre elas, destaca-se *Echinodorus macrophyllus*, popularmente conhecida como chapéu-de-couro no Brasil, e utilizada tradicionalmente para o tratamento de reumatismo e artrites (CORRÊA et al., 1998; LORENZI; MATOS, 2000). *E. macrophyllus* consta na lista de espécies selecionadas como prioritárias para o desenvolvimento de fitoterápicos para o Sistema Único de Saúde (SUS) e foi incluída na chamada CNPq/MS-SCTIE-Decit Nº 19/2018 – Fitoterápicos, no âmbito do qual este trabalho foi desenvolvido. Neste contexto, o presente trabalho tem como escopo desenvolver um extrato padronizado de folhas de *E. macrophyllus* com atividade antiartrítica, e uma formulação farmacêutica deste, visando obter um produto fitoterápico para administração por via oral, que possa futuramente ser introduzido no SUS.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar o estudo químico-biológico de folhas de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli, visando desenvolver um extrato padronizado e formulação farmacêutica com atividade anti-inflamatória, com potencial para tratar doenças artríticas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obter o material vegetal e realizar a identificação química, biológica e molecular da espécie *E. macrophyllus*.
- 2) Preparar extratos vegetais de folhas de *E. macrophyllus* com diferentes solventes e métodos extrativos.
- 3) Avaliar o efeito dos extratos sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios TNF e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em culturas de células monocíticas humana (THP-1) estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano.
- 4) Investigar o efeito dos extratos obtidos em modelos pré-clínicos agudo e crônico de artrite induzida por antígeno (AIA), de forma a selecionar aqueles com maior potencial para desenvolvimento.
- 5) Avaliar a atividade dos extratos mais ativos no item 4 sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios em modelo *in vitro* em cultura primária de condrócitos murinos e investigar o mecanismo de ação.
- 6) Realizar o desenvolvimento farmacotécnico do extrato mais ativo selecionado nos ensaios antiartríticos dos itens 4 e 5, visando selecionar o mais adequado para a formulação.
- 7) Produzir um lote em escala de bancada da formulação fitoterápica desenvolvida no item 6 e realizar sua caracterização química, físico-química e morfológica.
- 8) Investigar o efeito da formulação fitoterápica desenvolvida em modelo pré-clínico de AIA agudo.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta biológica desencadeada por diversos fatores, entre eles a presença de patógenos, células danificadas, substâncias tóxicas e processos fisiológicos. Esses fatores são responsáveis por induzir respostas inflamatórias agudas e/ou crônicas em diferentes tecidos, acarretando danos teciduais ou o desenvolvimento de doenças (CHEN et al., 2018). Segundo Sugimoto e colaboradores (2016), a inflamação é considerada uma reação do hospedeiro a um dano tecidual, infeccioso ou estéril, com o objetivo de restaurar a homeostase tecidual. Os sinais clássicos de um processo inflamatório são rubor (vermelhidão, devido à

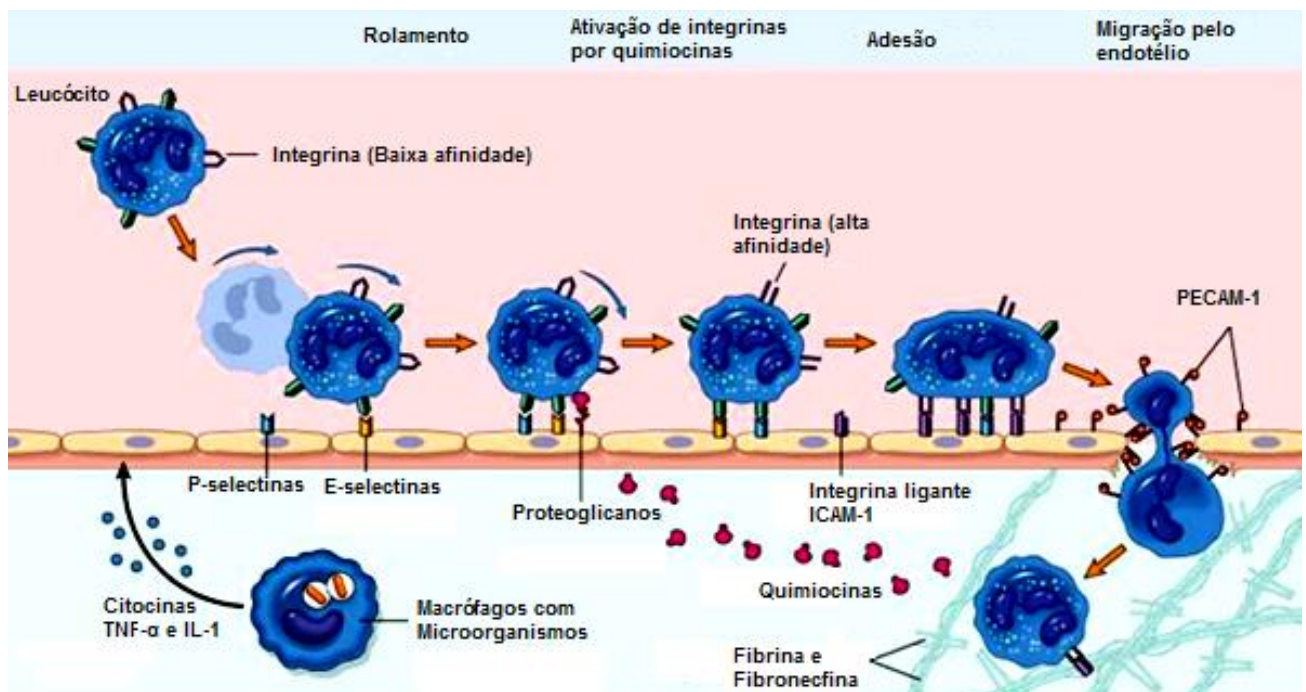
hiperemia), tumor (inchaço, causado pelo aumento da permeabilidade da microvasculatura e extravasamento de proteínas e plasma para o espaço intersticial), calor (associado ao aumento de fluxo sanguíneo e à atividade metabólica dos mediadores celulares) e dor (mudança na perivascularização e terminações nervosas associadas) (POBER; SESSA, 2015). A inflamação descontrolada ou não resolvida pode levar a danos teciduais, originando diversas doenças inflamatórias crônicas, incluindo síndromes e patologias de autoimunidade com eventual perda da função do órgão (SUGIMOTO et al., 2016).

O organismo possui como estruturas de defesa barreiras estruturais, como o tecido epitelial, e barreiras químicas, compostas pelos diferentes fluidos corporais como lágrimas, suor, saliva, secreção nasal e urina, visando a proteção frente à entrada de patógenos (KALLO et al., 2022). Apesar das estruturas de defesa, substâncias nocivas podem invadir o organismo e ativar o sistema imunológico, o qual possui duas linhas de atuação fundamentais de resposta ao dano tecidual e/ou celular para restaurar a homeostase: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata, considerada a primeira linha de resposta ao estresse celular (patógeno ou qualquer estímulo nocivo), tem como característica uma resposta rápida de recrutamento de células imunes (monócitos, neutrófilos e macrófagos) para o local de infecção desencadeando a resposta inflamatória por meio da produção de citocinas (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6) e quimiocinas. Ainda, atua na ativação do processo fagocítico visando a eliminação de patógenos e ao combate aos estímulos nocivos (TURVEY; BROIDE, 2010). As citocinas, produzidas na resposta induzida durante a imunidade inata, induzem diversos mecanismos de defesa, sendo também responsáveis por desenvolver e ativar a memória imunológica frente ao agente agressor e pela migração de células do sistema imune (MARSHALL et al., 2018).

Atuando em conjunto com a imune inata, têm-se a imunidade adaptativa que incluem o reconhecimento de antígenos “não próprios” específicos, distinguindo-os dos antígenos “próprios”; a geração de vias que eliminam patógenos específicos ou células infectadas por patógenos; a identificação e restauração do estímulo nocivo; e o desenvolvimento de uma memória imunológica. As células do sistema imunológico adaptativo incluem as células T antígeno-específicas e as células B, que se diferenciam em plasmócitos para produzir anticorpos. Essas duas linhas de defesa imunológica, inata e adaptativa, trabalham em sinergia para a restauração da homeostase tecidual (MARSHALL et al., 2018).

Portanto, a resposta inflamatória é desencadeada por antígenos externos ou próprios do organismo, e ocorre inicialmente por meio das células imunológicas residentes no tecido: macrófagos, células dendríticas e APCs. Essas células, ao reconhecerem o antígeno, liberam citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF, que induzem as células endoteliais do local da lesão a expressar selectinas e ligantes para integrinas na superfície luminal, possibilitando a adesão e a diapedese dos leucócitos circulantes. Além disso, os macrófagos e as células dendríticas presentes no tecido eliminam o antígeno por fagocitose e liberam citocinas, além de atuarem como células apresentadoras de antígeno para os linfócitos, para ativação de linfócitos T e B (CHEN et al., 2018). Os leucócitos circulantes atingem o local da lesão, são ativados por várias citocinas e quimiocinas, e posteriormente secretam mediadores da inflamação (**Figura 1**).

**Figura 1.** Eventos celulares associados à resposta inflamatória. Liberação de citocinas por macrófagos ativados pela fagocitose de microrganismos, responsáveis pela translocação de leucócitos para o sítio injuriado através da alteração de permeabilidade do endotélio vascular.



**Fonte:** modificado de KUMAR, ABBAS, FAUSTO (2005).

Os neutrófilos são predominantes na fase aguda e eliminam o antígeno por fagocitose e, na sequência, ocorre a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

e de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF. Já os linfócitos T e linfócitos B são a segunda linha de resposta e desempenham um papel na mediação da inflamação por outros mecanismos, incluindo a secreção de citocinas, coestimulação de linfócitos e produção de anticorpos e complexos imunológicos (FREIRE; VAN-DYKE, 2013).

Após o desencadeamento de um processo inflamatório, a resposta é coordenada por ativação de diferentes vias de sinalização, que regulam os níveis de mediadores inflamatórios em células residentes nos tecidos e células inflamatórias recrutadas do sangue (PAWA et al., 2020). A detecção da resposta inflamatória por células imunes inatas e células residentes desencadeia a produção de mediadores que modulam o curso da inflamação. Esses processos de sinalização compartilham os mesmos mecanismos: 1) receptores de padrão de superfície celular reconhecem os estímulos prejudiciais; 2) vias inflamatórias são ativadas; 3) mediadores inflamatórios são liberados; 4) células inflamatórias são recrutadas (FREIRE; VAN-DYKE, 2013). Agentes infecciosos e não infecciosos e substâncias liberadas em decorrência de dano celular ativam as células inflamatórias e desencadeiam as vias de sinalização inflamatória, mais comumente as vias do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), da Janus quinase (JAK) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) (CHEN et al., 2018).

Na imunidade inata, o reconhecimento e ativação de vias para eliminação de patógenos depende de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que permitem que as células imunes detectem e respondam rapidamente ao patógeno. Esses receptores reconhecem estruturas comuns, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Exemplos de antígenos reconhecidos por este sistema são os componentes da parede celular bacteriana, como o LPS, e o ácido ribonucleico (RNA) (MARSHALL et al., 2018).

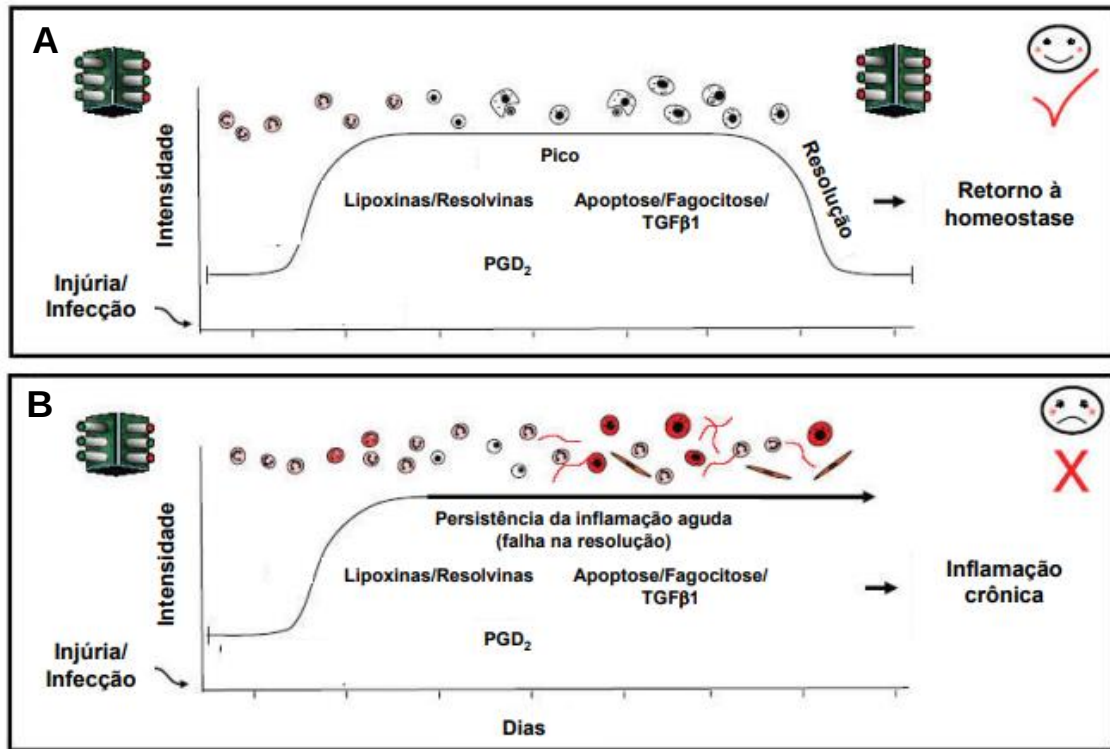
Estudos mostram que os PRRs também podem reconhecer componentes da inflamação estéril liberados durante uma lesão tecidual. Esses componentes são denominados de padrões moleculares associados a lesão (DAMPs) e têm função semelhante aos PAMPs em termos de ativação da sinalização pró-inflamatória (CHEN; NUÑEZ, 2010). Com a ativação desses receptores de reconhecimento de padrão pelos estímulos inflamatórios ocorre a ativação das redes de sinalização para eliminar o estímulo nocivo e restaurar o tecido danificado (CHEN et al., 2018).

Na ativação desse sistema são produzidos linfócitos T que expressam receptores únicos de ligação ao antígeno em sua membrana, conhecidos como

receptores de células T (TCR). Para sua produção, as células T requerem a ação das APCs, geralmente células dendríticas, macrófagos, células B, fibroblastos e células epiteliais, dependendo da fisiopatologia da doença inflamatória, para reconhecer um antígeno específico (MARSHALL et al., 2018). Portanto, embora as respostas imunes inatas e adaptativas sejam fundamentalmente diferentes em seus mecanismos de ação, a sinergia entre elas é essencial para uma resposta imune eficaz visando restaurar a homeostase do organismo (CHAPLIN, 2010).

A fase indutiva da inflamação, descrita anteriormente, é geralmente seguida da fase resolutiva, que visa a eliminação do estímulo nocivo e retorno à homeostase. No entanto, em algumas situações a etapa resolutiva falha, levando à cronificação do processo inflamatório, que pode se estender por meses a anos (**Figura 2**). A extensão na duração do processo inflamatório está relacionada com a causa da lesão e a capacidade do organismo de reparar e superar o dano. Portanto, inicia-se o processo crônico quando a infiltração das células inflamatórias primárias, como macrófagos, linfócitos e células plasmáticas no local da injúria se estende por longo período, produzindo citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e enzimas, contribuindo para a progressão do dano tecidual e reparo secundário, incluindo fibrose e formação de granuloma (PAWA et al., 2020).

**Figura 2:** Ciclo temporal, em dias, dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória e requisitos para resolução, representando o papel que mediadores moleculares específicos desempenham nesses eventos. Em (A) tem-se o início da resposta inflamatória, com a liberação de mediadores pró-inflamatórios que iniciam e aumentam a fase aguda da resposta. Esta resposta é contrabalançada por sinais anti-inflamatórios endógenos que servem para moderar a gravidade e limitar a duração da fase inicial. À medida que a inflamação progride, certos “sinais de parada” evitam o tráfego adicional de leucócitos para o tecido. Esses sinais de parada incluem a liberação de lipoxinas, resolvinas e de algumas prostaglandinas que promovem o recrutamento de monócitos e sua diferenciação em macrófagos com função fagocitária, que removem os estímulos nocivos e os produtos de lesão tecidual. Esse conjunto sequencial de respostas leva à resolução completa e à restauração do tecido. Em (B) é representado o cronificação do processo inflamatório devido à falha no processo resolutivo.



Fonte: adaptado de Serhan e colaboradores (2007).

### 3.2 Ativação da via de sinalização do NF-κB e liberação de citocinas pró-inflamatórias

O NF-κB é um fator de transcrição de proteínas e considerado um regulador da imunidade inata. A via de sinalização do NF-κB é ativada mediante sinais patogênicos e de dano celular, organizando assim a resistência celular a patógenos invasores ou qualquer estímulo nocivo. Diversos estudos demonstraram que o NF-κB é um “hub” responsável por uma sinalização biológica complexa. A ativação da via de sinalização do NF-κB ocorre em diferentes etapas que culminam no processo de restauração do dano tecidual após o início do processo inflamatório, sendo eles: resolução dos processos inflamatórios, resposta imunológica, restauração celular e apoptose. O NF-κB é armazenado fisiologicamente no citoplasma, na forma inativa, ligado a proteínas inibidoras da família κB (IκB). A sinalização decorrente da ativação de PRRs ativa as proteínas quinases de IκB (IKK), responsáveis pela fosforilação de IκB. Na sequência, a poliubiquitinação desse inibidor permite a liberação do NF-κB e sua translocação para o núcleo e promoção da transcrição gênica. Essa via é de grande relevância na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e para o recrutamento de células inflamatórias, que contribuem para a resposta inflamatória (ALBENSI, 2019).

A ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B está envolvida no desenvolvimento e progressão da inflamação, pois atua não só aumentando a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, mas também regulando a proliferação celular, apoptose, morfogênese e diferenciação (LIU et al., 2017). Entre as citocinas pró-inflamatórias principais e reguladas pelo NF- $\kappa$ B, estão o TNF e a IL-1 $\beta$ ; porém, outras citocinas também participam do processo inflamatório (**Tabela 1**), sendo algumas pró-inflamatórias e outras anti-inflamatórias (CHEN et al., 2018).

O TNF pode ser expresso tanto na membrana celular como na forma solúvel, sendo produzido por diversas células e desempenha papel relevante na diferenciação, proliferação e sobrevivência das células do sistema imune (KANASHISRO et al., 2020). O TNF liga-se a dois tipos de receptores, o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e o receptor do fator de necrose tumoral 2 (TNFR2). O primeiro está expresso em quase todas as células do organismo e o segundo é mais comumente encontrado em células do sistema hematopoiético. No entanto, estudos mostram que o efeito do TNF na viabilidade dos macrófagos não depende apenas da rede de sinalização TNFR1-TNFR2, mas também de sua interferência com outros sistemas de sinalização envolvidos com os PRRs, inflamassomas e interferons. Os efeitos da ligação dessa citocina ao receptor podem levar à ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B1, que controla um grande número de genes inflamatórios, ou à apoptose, dependendo do estado metabólico da célula (WAJANT; SIEGMUND, 2019). O aumento local de TNF é um dos responsáveis pelos sinais cardinais da inflamação, incluindo calor, tumor, dor e rubor. Ele age sobre os neutrófilos, aumentando sua habilidade em destruir microrganismos, ativa mastócitos, amplifica e prolonga a inflamação, além de estimular a fagocitose e a produção de oxidantes (KANASHISRO et al., 2020).

As quimiocinas também são secretadas após resposta à estímulos pró-inflamatórios e sua principal função é regular o tráfego celular, como o de monócitos, neutrófilos e linfócitos, de grande relevância na resolução do processo inflamatório. Quimiocinas participam da resposta inflamatória aguda neutrofílica, a quimiocina atrativa de neutrófilos 1 (CXCL1) e a quimiocina atrativa de neutrófilos 2 (CXCL2), além da quimiocina atrativa de monócitos (CCL2), que atua no recrutamento de monócitos após os estímulos pró-inflamatórios. Cabe ressaltar que diferentes quimiocinas são liberadas em diferentes momentos da resposta inflamatória, de acordo com o processo inflamatório associado (MARTINS-GREEN; PETREACA; YANG, 2013).

**Tabela 1:** Citocinas inflamatórias e suas funções.

| <b>Citocina</b> | <b>Família</b> | <b>Principal fonte</b>                                 | <b>Atuação</b>                                                                         |
|-----------------|----------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-1 $\beta$    | IL-1           | Macrófagos, monócitos                                  | Pró-inflamatório, proliferação, apoptose e diferenciação de células NK e linfócito B   |
| IL-4            | IL-4           | Linfócitos T                                           | Anti-inflamatório, proliferação de linfócitos T e B, e diferenciação de linfócitos B   |
| IL-6            | IL-6           | Macrófagos, linfócitos T, adipócitos                   | Pró-inflamatório, produção de citocinas                                                |
| IL-8            | CXC            | Macrófagos, células epiteliais e endoteliais           | Pró-inflamatório, quimiotaxia, angiogênese                                             |
| IL-10           | IL-10          | Monócitos, linfócitos B e T                            | Anti-inflamatório, inibição de citocinas pró-inflamatórias                             |
| IL-12           | IL-12          | Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos          | Pró-inflamatório, diferenciação celular, e ativação de células NK                      |
| IL-11           | IL-6           | Fibroblasto, neurônios, células epiteliais             | Anti-inflamatório, diferenciação e indução de proteína de fase aguda                   |
| TNF             | TNF            | Macrófagos, células NK e CD4+, linfócitos e adipócitos | Pró-inflamatório, produção de citocinas, proliferação celular, apoptose                |
| IFN- $\gamma$   | INF            | Células T, NK e NKT                                    | Pró-inflamatório, inata, imunidade antiviral adaptativa                                |
| GM-CSF          | IL-4           | Células T, macrófagos e fibroblastos                   | Pró-inflamatório, ativação de macrófagos, aumento da função de neutrófilos e monócitos |
| TGF- $\beta$    | TGF            | Macrófagos, células T                                  | Anti-inflamatório, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias                 |

**Fonte:** Adaptado de CHEN et al. (2018).

### 3.3 Ativação das vias de sinalização MAPK e JAK-STAT

A família das MAPKs está associada a numerosos eventos celulares, incluindo diferenciação, mitogênese, oncogênese e apoptose (CARGNELLO; ROUX, 2011). Essa via de sinalização é mediada por proteínas quinases que direcionam as respostas celulares em uma variedade de estímulos, incluindo estresse osmótico, choque térmico, presença de mitógenos e citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6, que são responsáveis pela regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular e de apoptose (CHEN et al., 2018).

As diversas cascatas de sinalização elicítadas pelas MAPK são compostas, no mínimo, pelas enzimas MAPK, MAPK quinase (MAPKK) e MAPK quinase quinase (MAPKKK). Essas enzimas são responsáveis pela fosforilação de diversos substratos e ativação da via de sinalização associada a MAPK, mais comumente a via associada ao p38, que inicia a resposta inflamatória (RAMALINGAM et al., 2020). A ativação de p38 MAPK normalmente ocorre por meio de uma cascata de sinalização de MAPK, em

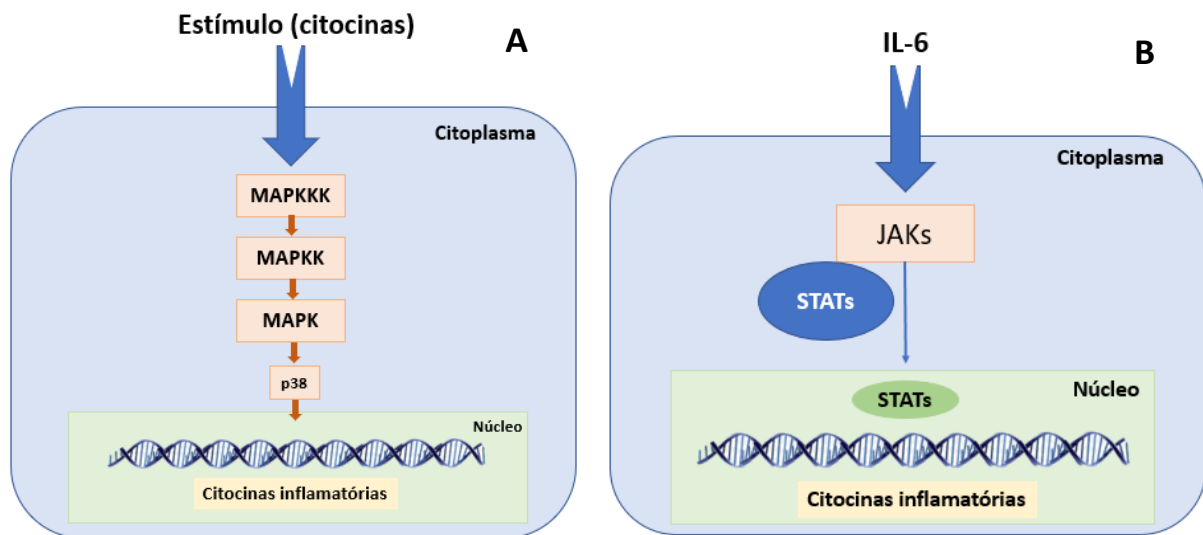
que MAPK quinase quinases (MAP3Ks) ativam MAP2Ks, que ativam p38 MAPK por meio de fosforilação dupla (pT180/p182). No entanto, mecanismos alternativos envolvendo a autofosforilação de p38 MAPK foram relatados (LAJEVIC et al., 2011). A MAPK p38 foi originalmente descoberta como alvo molecular para inibição de TNF e IL-1 $\beta$ . As formas das famílias p38 MAPK são ativadas por estresse celular, incluindo radiação ultravioleta (UV), choque térmico, alto estresse osmótico, LPS, inibidores da síntese de proteínas, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF) e certos mitógenos (**Figura 3A**). Posteriormente, outras proteínas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e ciclooxygenase do tipo 2 (COX-2), foram associadas com esse mecanismo de resposta inflamatória (CARGNELLO; ROUX, 2011).

Já ativação da via de sinalização JAK-STAT ocorre como resposta à um estímulo inflamatório, com ativação de mediadores como citocinas, fatores de crescimento, interferons e moléculas relacionadas como o hormônio do crescimento e leptina. A ativação dessa via de sinalização se dá por meio de fatores extracelulares que podem controlar a expressão gênica (KUI, NICHOLSON, 2012). As JAKs são consideradas transdutores de sinais que estão associadas aos receptores ativados pela interação com os ligantes, mediante a um estímulo inflamatório no organismo. As JAKs são tipos de receptores associados a tirosina quinases que se ligam às regiões citoplasmáticas dos receptores de citocinas do tipo I e II, como os receptores Interferon (IFN $\alpha/\beta$  e IFN $\gamma$ ) (SEIF et al., 2017).

A ativação das JAKs ocorre mediante estimulação de citocinas que fosforilam os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), o que resulta na dimerização e translocação de STATs para o núcleo, a fim de ativar ou suprimir a transcrição de genes. Após o processo de fosforilação, são criados locais de ancoragem para os STATs, que são fatores de transcrição essenciais presentes no citoplasma na forma latente. Este processo ocorre pela fosforilação da tirosina e é considerado essencial para a dimerização dos STATs e ligação ao ácido desorribonucleico (DNA) (CHEN et al., 2018). Quando as proteínas da família STAT sofrem o processo de translocação para o núcleo, elas se ligam às regiões promotoras do gene alvo para regular a transcrição de genes responsáveis pela resposta inflamatória envolvida. Um exemplo de ativação desta via é a ligação de membros da família do fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) e IL-6 aos receptores de membrana plasmática que ativam as proteínas JAK-STAT, ou seja, essa citocina é

um ativador que desencadeia as respostas vinculadas a esta via (**Figura 3B**) (KUI, NICHOLSON, 2012).

**Figura 3.** Vias de ativação envolvendo MAPK e JAK-STAT. (A) Via de sinalização MAPK ativada por citocinas pró inflamatórias. (B) Via de sinalização JAK-STAT ativada pela citocina IL-6.



**Fonte:** adaptado de CHEN e colaboradores (2018).

### 3.4 Doenças artríticas

A artrite é uma doença inflamatória crônica que afeta as articulações e outros tecidos. É considerada uma doença reumática, que afeta mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (GLOBAL RA NETWORK, 2022). Existem diferentes tipos e origens de artrite, incluindo aquelas causadas por danos mecânicos e deposição de cristais, encontrados, respectivamente, na osteoartrite e gota, e doenças causadas por processos autoimunes, como na artrite reumatoide (BECKER et al., 2016). Além disso, mais recentemente, tem-se a doença artrítica causada após infecção pelo *Chikungunya* vírus (BRASIL, 2023).

De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (2020), cerca de 58,5 milhões de americanos adultos foram diagnosticados com artrite nos EUA de 2013 a 2015. Essa doença é mais comum em mulheres (23,5%) do que em homens (18,1%) nos EUA e afeta principalmente adultos com saúde regular ou ruim (40,5%) em comparação com indivíduos com saúde normal ou excelente/muito boa (15,4%) (CDC, 2020). Além disso, a doença tem menor incidência em adultos que praticam atividade física regularmente (18,1%) do que naqueles insuficientemente ativos ou

inativos (23,1% e 23,6%, respectivamente) (BARBOUR et al., 2017). O processo inflamatório das artrites é caracterizado por inchaço, dor, vermelhidão e mau funcionamento das articulações. Alguns pacientes podem evoluir para quadros mais graves com comprometimento cardiovascular e renal nos casos de AR, causando redução na qualidade de vida, além de ônus econômico para os pacientes e para os sistemas de saúde (SENTHELAL, 2021).

### **3.4.1 Artrite reumatoide (AR)**

A AR é uma doença inflamatória crônica sistêmica, de natureza autoimune, caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem e da estrutura óssea das articulações. Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença incluem idade, sexo, características genéticas (variações nos genes do antígeno leucocitário humano (HLA), especialmente o HLA-DRB1) e exposição ambiental (tabagismo, poluentes atmosféricos e ocupacionais) (BULLOK et al., 2019). A doença atinge aproximadamente 0,5 a 1% da população mundial, com taxa de incidência três vezes maior em mulheres do que em homens, e está diretamente relacionada com o aumento da idade. Há poucos estudos de prevalência da AR no América Latina (BRASIL, 2021) e estima-se que ela acometa de 0,2% a 1% da população brasileira (GERMANO et al., 2021).

O processo inflamatório na AR se inicia por uma resposta inflamatória aguda no tecido sinovial das articulações, da cartilagem e do osso e, menos frequentemente, em sítios extra-articulares, que se torna crônica e leva às alterações na estrutura articular (CALABRESI et al., 2018). Muitas complicações podem ocorrer com o desenvolvimento da AR, como dano permanente nas articulações, exigindo artroplastia, e manifestações extra-articulares como a vasculite reumatoide e a síndrome de Felty (BULLOK et al., 2019). Em geral, a AR acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas, como rigidez matinal, fadiga e perda de peso, além de deformidades físicas e dores que prejudicam as atividades diárias e geram um impacto econômico e limitação física significativa para o paciente (GOELDNER et al., 2011; NAGAYOSHI et al., 2018).

A fisiopatologia do processo inflamatório da AR envolve os componentes do sistema imunológico adaptativo e inato. As anormalidades na resposta imune celular e humoral acarretam a ocorrência de autoanticorpos, principalmente os fatores reumatoides (FR), e anticorpos antiproteínas modificadas (AMPA), em conjunto com a

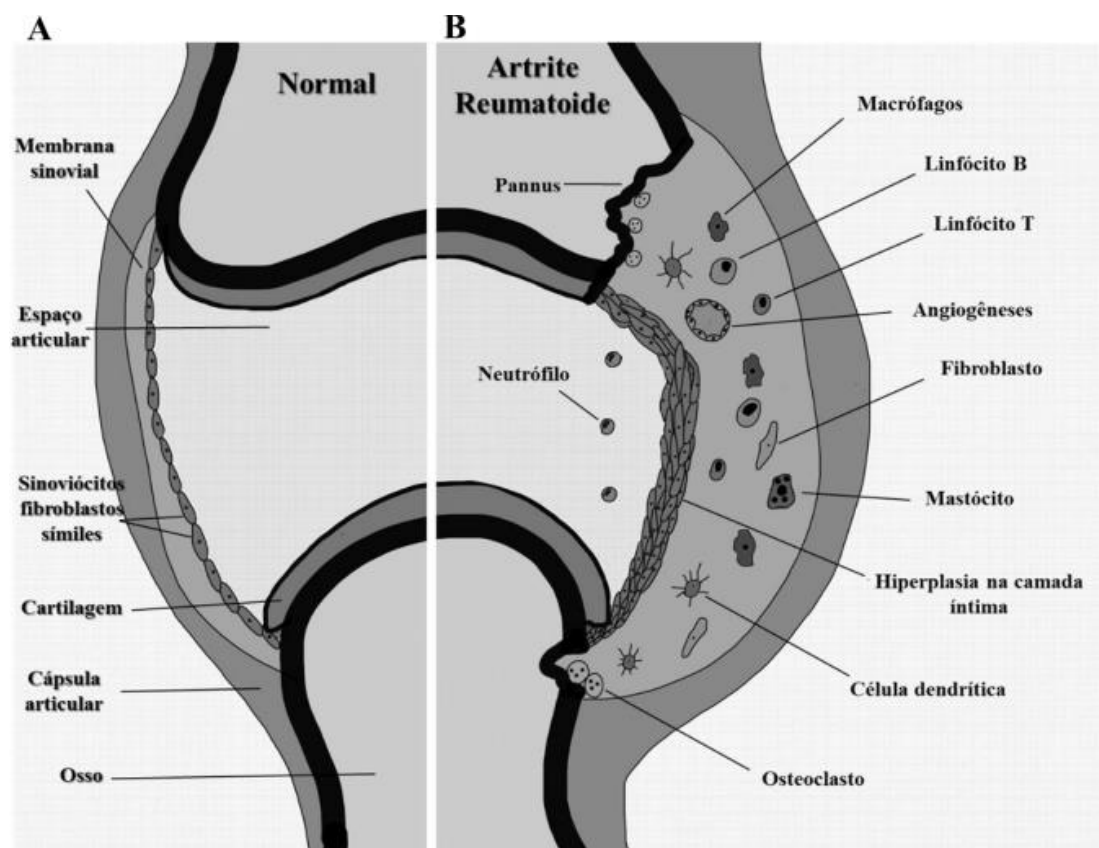
migração de linfócitos T e B para a sinóvia. Devido à intensa ativação do sistema imune inato, ocorre a ativação de monócitos e macrófagos nos tecidos envolvidos, causando hiperplasia sinovial (SCHERER; HAUPL; BURNESTER, 2020).

A hiperplasia sinovial é uma marca registrada da AR. Neste processo, o espaço sinovial das articulações é acometido pela infiltração de uma variedade de células inflamatórias (formação de *pannus*), especificamente células T, macrófagos e células plasmáticas (CRUVINEL et al., 2010). As células recrutadas e os sinoviócitos são estimulados e passam a produzir uma resposta inflamatória contínua e crônica, caracterizada pela liberação de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15 e IL-17. Essas citocinas são responsáveis por desencadear a sinovite e regulam a gravidade e progressão da inflamação e das reações imunológicas na articulação reumática. Além disso, os sinoviócitos estimulados por citocinas produzem metaloproteinases de matriz (MMP), que são liberadas no líquido sinovial e degradam a cartilagem. Ainda, os linfócitos e sinoviócitos expressam o ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL), o qual induz a maturação e ativação de osteoclastos multinucleados, responsáveis pela destruição e absorção do osso, causando destruição articular (TANAKA, 2020). Todo esse processo fisiopatológico (**Figura 4**) é responsável pelos sintomas clássicos da doença, tais como dor articular, inchaço, destruição da cartilagem e do osso, além de manifestações sistêmicas causadas pela produção de metabólitos como o ácido araquidônico e várias citocinas inflamatórias (SCHERER; HAUPL; BURNESTER, 2020).

A terapia farmacológica da AR compreende duas abordagens principais: tratamento sintomático com anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e esteroidais (AIES), e fármacos antirreumáticos modificadores da doença, como o metotrexato, a hidroxicloroquina e a sulfassalazina. Os AINES atuam apenas em um pequeno segmento da cascata inflamatória, especificamente a ativação de prostaglandinas e ciclooxygenases, mas não interferem com os eventos imunoinflamatórios e não retardam a destruição das articulações (BANIK, 2021). Já o metotrexato modifica o processo da doença em todos os aspectos e, uma vez efetivo, não requer o uso de terapias sintomáticas (FINDEISEN; SEWELL; OSTOR, 2021). No entanto, apresenta graves efeitos adversos como dor de cabeça intensa, rigidez de nuca, vômitos, febre, redução na contagem de glóbulos brancos e plaquetas, e insuficiência renal, entre outros (BURMESTER; POPE, 2017).

Os fármacos biológicos, desenvolvidos nos últimos anos para tratamento de AR, atuam em mediadores pró-inflamatórios, como o TNF. No entanto, eles demandam administração parenteral e induzem resposta terapêutica não uniforme (MOTA, et al., 2015), além de promoverem efeitos adversos graves, estando seu uso associado ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores (FINDEISEN; SEWELL; OSTOR, 2021). Além disso, os fármacos biológicos apresentam custo elevado, o que gera grande impacto financeiro para os pacientes e para o SUS. Segundo o Banco de Preços em Saúde (BPS) do Ministério da Saúde, em 2020 o gasto do SUS para o tratamento anual de um paciente variou de R\$ 38.208,46, no caso do infliximabe, a R\$ 28.934,49 para o adalimumabe (BRASIL, 2021).

**Figura 4.** Articulação de paciente saudável (A) e com artrite reumatoide (B). Em (B) é possível observar a formação do *pannus*, caracterizado pela presença de várias células imunes e sinoviais ativadas, além dos processos de erosão da cartilagem desencadeados após a resposta inflamatória.



**Fonte:** modificado de Strand; Kimberly; Isaacs (2007).

Dentre as abordagens terapêuticas para AR mais recentes aprovadas no Brasil, destacam-se os fármacos modificadores do curso da doença tofacitinibe, upadacitinibe e mais recentemente, o baricitinibe, sendo os três inibidores seletivos de JAK. Estes fármacos atuam impedindo a transdução de sinais mediados por citocinas através da via de sinalização JAK-STAT, com alta efetividade por via oral. Porém, apresentam custo elevado, como o baricitinibe, que tem custo anual em torno de R\$ 10.000,00 por paciente (MOTA et al., 2015; BRASIL, 2021; BRASIL, 2022). Além disso, estudos demonstram que os pacientes tratados com tofacitinibe possuem maior risco para tuberculose e infecções graves que podem acarretar óbito. Ainda, dados sobre a segurança a longo prazo deste medicamento, para essa especialidade farmacêutica, são incipientes (BANIK, 2021). Já para o upadacitinibe, o estudo clínico randomizado em pacientes com AR realizado por Genovese e colaboradores (2018) identificou efeitos adversos após sua utilização por 12 semanas, tais como infecção do trato respiratório e urinário, nasofaringite e agravamento do processo de AR.

O baricitinibe também modula a via de sinalização de JAK e atua como bloqueador da fosforilação e ativador de transdutores de sinais e transcrição. Ele foi incluído em 2020 no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) de artrite reumatoide, para utilização na segunda etapa do tratamento em pacientes com a doença ativa de moderada a grave, com resposta insuficiente aos outros tratamentos, e se encontra disponível no SUS (BRASIL, 2020). No entanto, de acordo com estudo clínico randomizado, a utilização deste medicamento por pacientes portadores de AR aumentou a susceptibilidade a infecções, em comparação com o grupo placebo, além da maior incidência de eventos trombolíticos (GENOVESE, 2020).

### **3.4.2 Osteoartrite (OA)**

A OA é uma doença inflamatória progressiva que pode acarretar a degeneração articular afetando todas as suas estruturas, principalmente a cartilagem das articulações sinoviais. A OA pode evoluir para uma insuficiência articular, caracterizada por alterações da cartilagem articular, com zonas de fibrilação e fissuras, microfraturas, cistos, esclerose subcondral e formação de osteófitos nas bordas articulares. Essas alterações levam a dores crônicas e limitações funcionais das articulações afetadas e, posteriormente, à degeneração da cartilagem, causando grande redução na qualidade de vida do paciente portador da doença (COIMBRA; PLAPLER; CAMPOS, 2019).

A OA é a doença articular mais comum e afeta principalmente joelhos, quadris, mãos e pés. Estima-se que 240 milhões de indivíduos em todo o mundo tenham OA sintomática, incluindo 10% dos homens e 18% das mulheres com 60 anos ou mais (ALLEN; THOMA; GOLIGHTLY, 2021). Nos EUA, em 2020, estima-se que 1 em cada 7 adultos apresentaram algum tipo de artrite. Dentre os tipos de artrite acometida, a AO é a forma mais comum, afetando 32,5 milhões de adultos nos EUA (CDC, 2020). Já no Brasil, a OA é atualmente a terceira doença mais comum entre os pacientes com mais de 60 anos. Os dados são mais relevantes se considerarmos que a população de pessoas com mais de 60 anos, que era de 19 milhões em 2012, aumentará para mais de 64 milhões em 2050, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (COIMBRA; PLAPLER; CAMPOS, 2019). Esses dados são de extrema relevância, considerando a incapacidade para o trabalho, a redução da qualidade de vida e os custos ao sistema de saúde gerados pela OA, incluindo o tratamento da doença e a aposentadoria precoce por incapacidade funcional (LE et al., 2012).

Na fisiopatologia da AO, as características comuns são perda de cartilagem e estreitamento do espaço articular devido ao processo inflamatório que ocasiona a perda da cartilagem. A OA é caracterizada pela degradação da cartilagem articular e dos componentes da matriz óssea. Dentre as principais estruturas que são degradadas destaca-se o colágeno tipo II e o proteoglicano agregano, levando à perda da estrutura e função da cartilagem (GRASSEL et al., 2020). Embora a inflamação sinovial na OA não seja tão extensa quanto a observada nas formas inflamatórias clássicas de artrite, como a AR, há evidências crescentes de que a destruição da cartilagem na OA é o resultado da inflamação da cartilagem em nível molecular. Assim, apesar do desgaste mecânico ser de grande importância na OA, a degeneração articular ocorre como resultado de uma combinação de danos moleculares e da incapacidade de gerenciar efetivamente os impactos físicos, já que esses estimulam os condrócitos a produzirem uma série de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas (ANANDACOOMARASAMY, 2010).

Durante o processo patológico da OA, os condrócitos, que são as únicas células na cartilagem responsáveis pela síntese e degradação da matriz, são desregulados, ocorrendo redução da síntese de cartilagem e aumento da degradação da matriz pelas enzimas MMP. Esse mecanismo ocorre pela ativação de citocinas e fatores de crescimento, o que acomete a perda da cartilagem. As citocinas que têm impacto no metabolismo da cartilagem articular são classificadas em três grupos: catabólicas (IL-

1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF), reguladoras e inibidoras enzimáticas (IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ ) e anabolizantes (fatores de crescimento, IGF, COMPs, TGF  $\beta$ ) (ASHKAVAND; MALEKINEJAD; VISHWANATH, 2013).

O tratamento da OA limita-se ao uso de analgésicos simples, anti-inflamatórios não esteroidais e corticosteroides, medidas físicas como exercícios de alongamento, fortalecimento e posturais, injeções de esteroides e, nos casos refratários, tratamento cirúrgico. O avanço no estudo da fisiopatologia da AO tem demonstrado que a patogênese não é puramente mecânica e/ou relacionada apenas ao envelhecimento, com a identificação das vias inflamatórias envolvidas, o que levou à aplicação clínica de outras abordagens terapêuticas (COIMBRA; PLAPLER; CAMPOS, 2019), como a condroitina e glucosamina, que estimula a síntese de cartilagem, além de atuar na inibição da IL-1 e das metaloproteinases (JUNIOR; INÁCIO, 2013). No entanto, embora muitos estudos tenham mostrado um efeito significativo do tratamento com condroitina e glucosamina, acompanhado de notável segurança, ainda há controvérsias sobre a eficácia desse tratamento em comparação com o placebo, especialmente pela ausência da compreensão do seu mecanismo de ação farmacológico (ZHU et al., 2018).

Outro exemplo de novas abordagens terapêuticas para AR é a utilização da capsaicina tópica, recomendada para o tratamento da OA do joelho pela *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) como adjuvante da redução do processo inflamatório (BANNURU et al., 2019). A capsaicina se liga aos nociceptores e causa depleção da substância P que está relacionada com o estímulo de fibras aferentes do tipo C e a degeneração de fibras nervosas periféricas (FLORES; CASTRO; NASCIMENTO, 2013). Ainda, foi demonstrado que esses novos tratamentos alteraram significativamente a abordagem clínica e terapêutica da AO (COIMBRA; PLAPLER; CAMPOS, 2019). Sendo assim, em 2021, o Ministério da Saúde publicou a portaria nº 48 que tornou pública a incorporação de anti-inflamatórios não esteroides tópicos, como a capsaicina, para dor causada por osteoartrite (BRASIL, 2021). No entanto, cabe ressaltar, que analisando as alternativas terapêuticas para AR e OA, não há nenhum tratamento aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ou pelo *Food and Drug Administration* (FDA) que tratem essas duas doenças artríticas concomitantemente, pois, apenas os anti-inflamatórios não esteroides são indicados para o tratamento sintomáticos de ambas. Portanto, novas terapias, que atuem na AR

e OA visando o tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes portadores são de grande relevância para o tratamento de pacientes artríticos (WEN et al., 2023).

### 3.5 Aspectos gerais, química e atividades biológicas de *Echinodorus macrophyllus*

*Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae) (sinonímia *Aquarius macrophyllus* (Kunth) Christenh. & Byng., *Alisma macrophyllum* Kunth) é popularmente conhecida como chapéu-de-couro. Esta espécie ocorre em todas as regiões do Brasil, com maior distribuição no estado de Minas Gerais (CORREA, 2001; FLORA E FUNGO DO BRASIL, 2020). É uma planta aquática enraizada, encontrada em canais de irrigação e drenagem, margens de rios e lagoas, e em baixadas pantanosas (**Figura 5**). É cultivada como espécie ornamental e possui ampla utilização na medicina tradicional brasileira (LORENZI, 2000).

No Brasil, duas espécies são conhecidas popularmente como chapéu-de-couro: *Echinodorus macrophyllus* e *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (sinonímia *Aquarius grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Christenh. & Byng, *Alisma grandiflorum* Cham. & Schltdl.). As folhas de chapéu-de-couro (*E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*) são utilizadas popularmente como diurético, tônico, depurativo, para tratar reumatismo e artrite, doenças virais e bacterianas, além de doenças da pele e para eliminar ácido úrico. As folhas são utilizadas comercialmente na indústria alimentícia, para a produção de refrigerantes como o Mate-Couro, entre outros (CLEMENTE; STEFFEN, 2010; CORREA 2001; LORENZI; MATOS, 2002).

A monografia de *E. macrophyllus* consta na 1ª e 2ª edições da Farmacopeia Brasileira (PHARMACOPEIA, 1926; FARMACOPEIA, 1959), enquanto a monografia de *E. grandiflorus* integra a 5ª e 6ª edições (BRASIL, 2010; BRASIL, 2019). A espécie *E. macrophyllus* constava da 1ª Edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011); no entanto, foi excluída na atualização desse formulário em 2021 (BRASIL, 2021).

As duas espécies supracitadas são utilizadas com a mesma finalidade medicinal em diversas regiões do país, na forma de chás caseiros ou de preparações fitoterápicas (LORENZI; MATOS, 2002). No entanto, os dados da literatura sobre a diferenciação entre essas espécies ainda são incipientes. Alguns estudos indicam similaridade nos aspectos botânicos (LEHTONE; MYLLYS, 2008) e na composição química dessas espécies, enquanto outros estudos indicam uma variação quantitativa

e/ou qualitativa em suas composições químicas (GARCIA et al., 2016; SILVA et al., 2022). Esses dados evidenciam a necessidade de novos estudos químicos e farmacológicos buscando identificar as substâncias ativas das espécies popularmente conhecidas como chapéu-de-couro e promover o desenvolvimento futuro de fitoterápicos a partir das mesmas (LEITE et al., 2007).

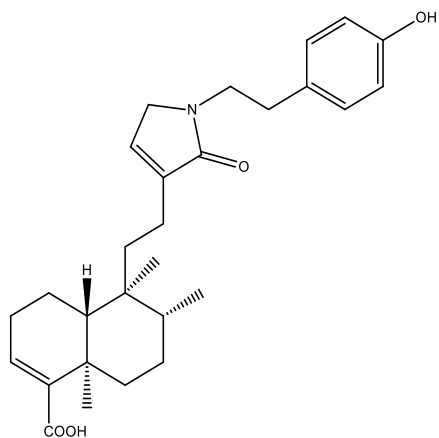
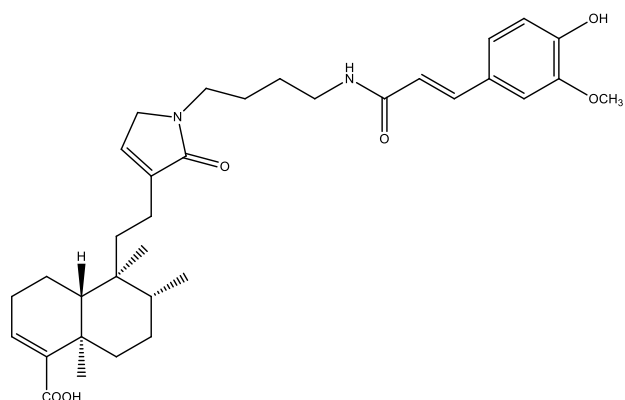
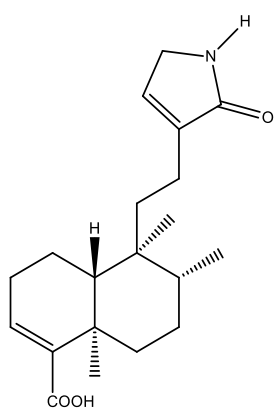
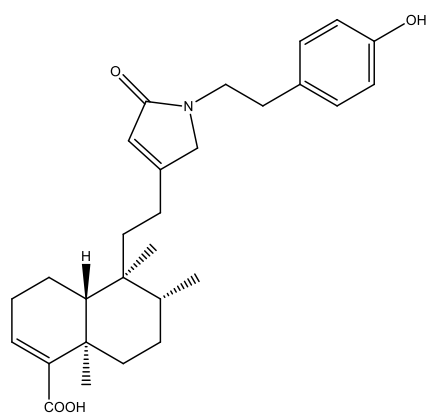
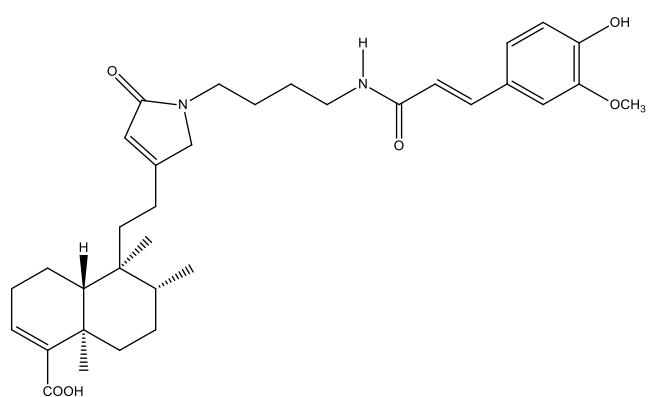
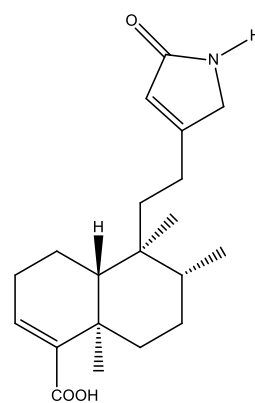
**Figura 5:** Fotografia de partes aéreas de exemplar de *E. macrophyllus* cultivado no Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) da UFMG.

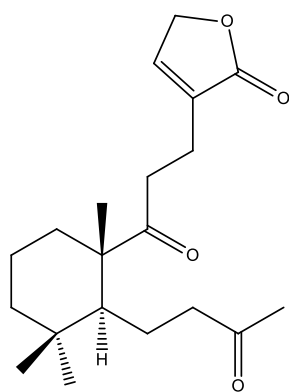


**Fonte:** autoria própria.

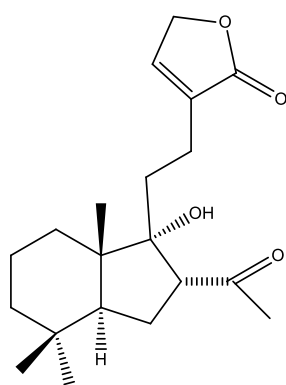
Segundo Marques e colaboradores (2017), a diferenciação morfológica de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* não é inequívoca, visto que ambas são espécies aquáticas que apresentam grandes folhas coriáceas, que dão origem ao nome popular “chapéu de couro”. As espécies têm inflorescências caracterizadas por delicadas flores brancas, utilizadas na ornamentação, não apresentando diferenças na anatomia foliar e floral. Além disso, poucas informações constam na literatura sobre a sistemática do gênero *Echinodorus* visando diferenciar as espécies que o compõe (LEHTONE, 2006). Com isso, Lehtonen & Myllys (2008) realizaram um estudo com as espécies, e relataram que *E. macrophyllus* está intimamente relacionada com *Echinodorus bracteatus* Micheli. Evidências filogenéticas consideraram *E. macrophyllus* uma espécie separada e distante de *Echinodorus scaber*, apesar das semelhanças morfológicas entre elas e do fato de que em alguns agrupamentos taxonômicos essas espécies foram tratadas como táxons conspecíficos, sem distinção entre espécies (HAYNES & HOLM-NIELSEN 1994).

A composição química das folhas de *E. macrophyllus* foi investigada por Kobayashi e colaboradores (2000) e Shigemori e colaboradores (2002), sendo isolados seis diterpenos clerodânicos nitrogenados, denominados echinofilinas A **(1)**, B **(2)**, C **(3)**, D **(4)**, E **(5)**, e F **(6)**, além dos diterpenos labdânicos chapecoderinas A **(7)**, B **(8)** e C **(9)**. Dois diterpenos do tipo cembrano, com anel lactônico de oito membros, denominados echinodolídeos A **(10)** e B **(11)**, também foram relatados para a espécie (SHIGEMORI et al., 2002). Já Tanus-Rangel e colaboradores (2010) relataram isolamento de vitexina **(12)** e isovitexina **(13)** a partir da fração em acetato de etila proveniente do extrato etanólico de folhas. A orientina **(14)** também já foi identificada no extrato etanólico de folhas de *E. macrophyllus* (GONSENZA, 2010). Ainda, um estudo mais recente realizado por Silva e colaboradores (2022), identificou por LC-MS, a presença de derivados do ácido tartárico em uma fração obtida por Sephadex LH20 do extrato etanólico de folhas de *E. macrophyllus*. Foram identificados putativamente nessa fração os ésteres metílicos dos ácidos diidroferuloil-tartárico e trimetoxicinamoil-tartárico, bem como os ácidos cafeoil-feruloil-tartárico, trimetoxicinamoil-tartárico e dimetoxicinamoil-tartárico.

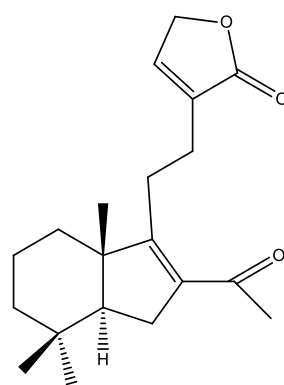
**(1)****(2)****(3)****(4)****(5)****(6)**



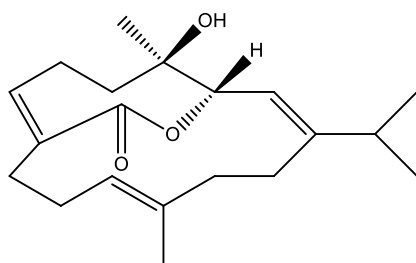
(7)



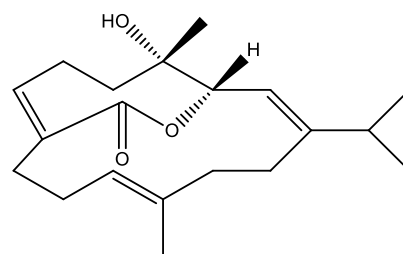
(8)



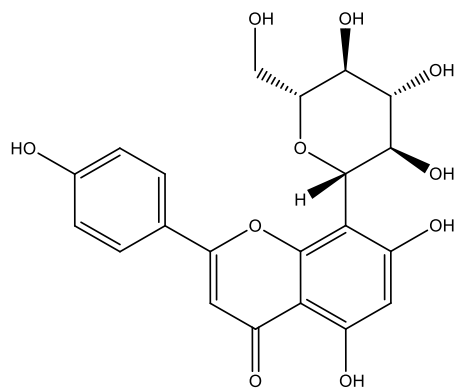
(9)



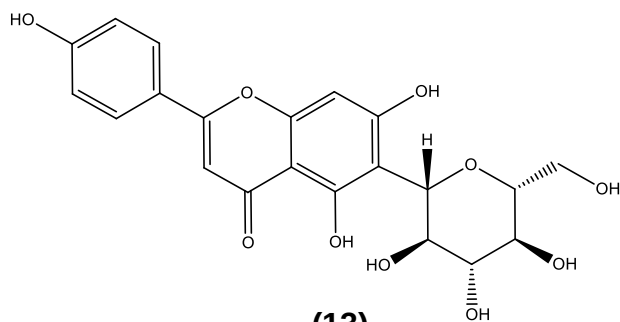
(10)



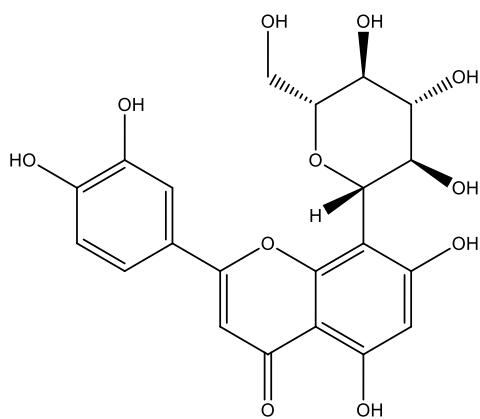
(11)



(12)



(13)



(14)

A atividade anti-inflamatória de *E. macrophyllus* foi investigada anteriormente. Nochi e colaboradores (2000) e Castro e colaboradores (2002) demonstraram a inibição da formação de edema de pata induzido por carragenina em camundongos Swiss após administração intraperitoneal (i.p.) do extrato aquoso de folhas, nas doses de 100 e 200 mg/kg, com 71% e 84% de redução do edema, respectivamente. Já o extrato hidroalcólico reduziu o edema de pata em 50% no mesmo modelo, quando avaliado na dose de 2000 mg/kg (NOCHI et al., 2000).

Na investigação da atividade antirreumática, Pinto e colaboradores (2007) avaliaram o efeito induzido pelo extrato aquoso (0,5 e 5,0 mg/kg, *per os*) de partes aéreas de *E. macrophyllus* em modelo de avaliação da imunossupressão *in vivo*, com a análise de produção de anticorpos e de hipersensibilidade tardia, pela administração de eritrócitos de ovelha. Além do extrato aquoso, foi analisado como controle positivo a dexametasona (1 mg/kg). Foi analisado a modulação de resposta em células T e B, proliferação de linfócitos e produção de óxido nítrico. Observou-se redução da produção de células B e da hipersensibilidade tardia mediada por células T, com redução do infiltrado leucocitário. Além disso, foi observada a redução da liberação de óxido nítrico *in vitro*, em linhagem celular de macrófagos murinos (J774) estimulados com LPS, sem promover citotoxicidade. Os efeitos imunossupressores relatados nesse estudo suportam o uso popular tradicional da espécie para tratar condições exacerbadas de resposta imune humoral e/ou celular, como em doenças crônicas artríticas e reumatismo.

A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico a 75% de folhas de *E. macrophyllus* foi avaliada por Tanus-Rangel (2010) em diferentes modelos de inflamação. O extrato, administrado por via oral nas doses de 1, 5 e 30 mg/kg, inibiu de forma dose dependente o edema de pata induzido por carragenina (25%, 46% e 63%, respectivamente) e por dextrana (30%, 23% e 42%, respectivamente) em ratos Wistar. Além disso, os extratos reduziram a permeabilidade vascular em modelo de edema de pata induzido por ácido acético em camundongos (30 mg/kg). No modelo de indução de edema por carragenina em ratos, também foi possível observar a redução do volume de exsudato e da migração de leucócitos.

O óleo essencial de *E. macrophyllus* foi avaliado quanto ao seu efeito antinociceptivo em modelo de hiperalgesia induzido por injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. O óleo, administrado por via oral nas doses de 50 e 100 mg/kg, promoveu redução de 65% e 59% nas contorções (COELHO et al., 2012).

Silva e colaboradores (2016) avaliaram o extrato aquoso e frações obtidas por Sephadex LH20 de folhas de *E. macrophyllus* em modelo de inflamação induzida por bolsa de ar em camundongos, nas doses de 2,5 a 250 mg/kg. Os autores também avaliaram *in vitro* a inibição da migração de neutrófilos utilizando *insert transwell*. O extrato e as frações foram caracterizados pela presença de flavonoides e reduziram a migração de leucócitos totais, leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) e a formação do exsudato, além de diminuir o infiltrado inflamatório nos tecidos, bem como reduziram a migração de neutrófilos e a produção de óxido nítrico.

No estudo de Fernandes e colaboradores (2019), o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório *in vivo* do extrato hexânico de *E. macrophyllus* foi avaliado em modelo de nocicepção química (injeção de ácido acético e formalina), térmica (imersão da cauda e placa quente) e tópica (injeção de xileno). O extrato, avaliado na dose de 25 mg/kg, apresentou atividade antinociceptiva no modelo de injeção de ácido acético (redução de 52% do limiar de dor) e placa quente por 60 (25 e 100 mg/kg) e 120 minutos (25 mg/kg). O efeito anti-inflamatório (50% de redução do edema) foi observado apenas nas doses de 50 e 100 mg/kg neste modelo. Já na avaliação da inflamação neurogênica induzida por xileno, apenas a dose de 100 mg/kg induziu resposta anti-inflamatória (88,3% de redução do edema; 100 mg/kg).

### 3.6 Produtos naturais com atividade antiartrítica

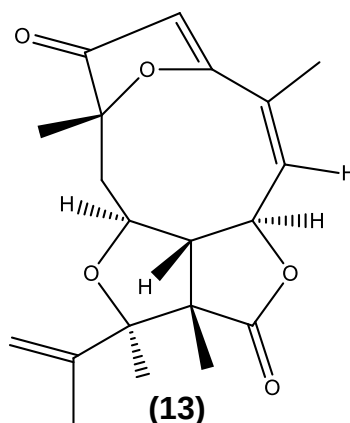
Diversas espécies vegetais ocorrentes no Brasil e no mundo são utilizadas popularmente para o tratamento de doenças inflamatórias, artrites e reumatismo. Vários produtos naturais isolados e extratos vegetais com diferentes composições químicas tiveram sua ação anti-inflamatória e antiartrítica demonstrada em modelos *in vitro*, *in vivo* e em estudos clínicos (ALAM; AMIN; DEY, 2021). Flavonoides, polifenóis simples, proantocianidinas, alcaloides, terpenoides e esteroides são as classes de produtos identificadas nos extratos ativos nesses estudos. Esses metabólitos secundários atuam em diferentes alvos envolvidos na resposta anti-inflamatória (RIBEIRO et al., 2018).

As estratégias farmacológicas adotadas para avaliar produtos naturais com potencial atividade anti-inflamatória e antiartrítica incluem a busca de agonistas de glicocorticoides, de inibidores da biossíntese de eicosanoides, e de bloqueadores da sinalização de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 $\beta$ , através da inibição da ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes pró-

inflamatórios, como o NF- $\kappa$ B (KOEBERLE; WERZ, 2014). Diversos estudos demonstram que extratos e substâncias isoladas apresentam atividade anti-inflamatória em modelos pré-clínicos de artrite, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios e a infiltração de células de defesa nas articulações (ALAM; AMIN; DEY, 2021).

Nos estudos pré-clínicos com modelos de artrite, os produtos naturais se mostraram promissores no controle da inflamação através de mecanismos como modulação de mediadores anti-inflamatórios (IL-10, IL-4), inibição de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e regulação de células Th17/Treg, ativadoras de células T. A resposta anti-inflamatória induzida compreende, ainda, o controle de mediadores moleculares da inflamação como NF- $\kappa$ B, STAT e MAPK, reduzindo e modulando a resposta inflamatória e artrítica. Além disso, na modulação da ativação de células T, são controladas a liberação das citocinas principais (IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-17), sendo alguns desses mediadores responsáveis também pela sinalização das células T (DUDICS et al., 2018).

Dentre os produtos naturais com ação artrítica mais relevante pode-se citar a colchinina (**15**), um alcaloide isolado de *Colchicum autumnale*. A colchinina atua inibindo a divisão celular, através da ligação às tubulinas dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico (PEREIRA et al., 2012). Na artrite gotosa, esse efeito interfere na atividade dos neutrófilos impedindo a diapedese, a mobilização e a desgranulação lisossomal, que libera, além de substâncias pró-inflamatórias, agentes quimiotáticos de leucócitos. Portanto, a colchinina inibe a formação do inflamassoma NLRP3 (estrutura multiproteica intracelular, importante para o processamento e a liberação das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18) induzida por cristais de ácido úrico. Dessa forma, tem grande aplicação na terapêutica atual da gota (AZEVEDO et al., 2017).



Diversas espécies brasileiras também já foram investigadas frente ao potencial antiartrítico. A andiroba (*Carapa guianensis*) é popularmente utilizada para tratamento de dores e artrite, e o óleo extraído de suas sementes é rico em tetranortriterpenoides. Este óleo demonstrou propriedades anti-inflamatórias e provou ser eficaz na inibição da liberação de IL-1 e TNF na dose de 100 mg/kg em modelo de artrite induzido com zimosan (PENIDO et al., 2006).

Diversas plantas medicinais com ação antiartrítica foram revistas por Dudics e colaboradores (2018) e são apresentadas na **Tabela 2**, com os respectivos alvos terapêuticos.

**Tabela 2:** Espécies vegetais com potencial antiartrítico.

| Nome da planta                  | Compostos ativos                    | Alvos da atividade antiartrítica                   |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <i>Boswellia serrata</i>        | Ácidos bosvélícos                   | Citocinas pró-inflamatórias e lipoxigenase (5-LOX) |
| <i>Harpagophytum procumbens</i> | Harpagosídeo e Harpagídeo           | COX-2, MAPK, NK-kB e óxido nítrico (NO)            |
| <i>Rosa canina</i>              | Carotenoides e ácidos orgânicos     | COX-1 e COX-2                                      |
| <i>Uncaria tomentosa</i>        | Mitrafilina                         | Citocinas pró-inflamatórias, antioxidantes e NF-kB |
| <i>Urtica dioica</i>            | Flavonoides glicosilados e terpenos | NF-kB e fosfolipase A2 (PLA2)                      |
| <i>Zingiber officinale</i>      | Zingerona e gingerol                | COX-2 NF-kB                                        |

**Fonte:** adaptado de Dudics e colaboradores (2018).

Alguns derivados de drogas vegetais já foram avaliados em estudos clínicos, visando investigar sua atividade antiartrítica. Assim, o extrato padronizado em clorofórmio/metanol de folhas de *Tripterygium wilfordii*, planta utilizada na medicina tradicional chinesa para tratar doenças autoimunes e inflamatórias como artrite reumatoide e lúpus eritematoso, foi avaliada estudo clínico randomizado duplo-cego. O extrato foi administrado em pacientes com artrite reumatoide, por via oral, três vezes ao dia, na dose de 60 mg/paciente, durante 24 semanas de tratamento. O extrato apresentou menor eficácia que a sulfassalazina, empregada como controle positivo, porém, exibiu atividade antiartrítica pela redução dos níveis de marcadores

inflamatórios como IL-6 e fator reumatoide, e melhora dos parâmetros bioquímicos. Através dos testes radiológicos realizados, observou-se uma regressão do quadro de artrite reumatoide nos pacientes tratados com o extrato padronizado (MANSK et al., 2009; SONG; ZHANG; DAI, 2020).

Na revisão sistemática e meta análise realizada por Zhou e colaboradores (2018), foram identificados onze estudos clínicos randomizados empregando o extrato padronizado de *Tripterygium wilfordii* no tratamento de pacientes com AR, com ou sem a associação com metotrexato. Segundo os autores, os resultados indicam que os extratos fornecem melhora estatisticamente significativa e clinicamente importante dos sintomas de AR e apresentam perfil de segurança aceitável. No entanto, até o momento, não há nenhum produto fitoterápico derivado da espécie em uso clínico (DRUGBANK, 2021).

Algumas revisões da literatura já destacaram outros produtos naturais avaliados em estudos clínicos randomizados, como o extrato seco obtido da goma-resina extraída do caule de *Boswellia serrata*. Neste estudo, conduzido com 30 pacientes com osteoartrite do joelho (333 mg por cápsula, via oral, três vezes ao dia, durante 8 semanas), os pacientes tratados com o extrato relataram diminuição da dor e inchaço e aumento da flexão do joelho, além do aumento da capacidade de caminhar (OLIVEIRA et al., 2021).

O extrato seco de raízes de *Curcuma longa* também avaliado para o tratamento da osteoartrite (500 mg/dia, padronizado em 95% de curcuminoides, por 30 dias). O grupo tratado com o extrato mostrou melhora no índice de osteoartrite, com redução na liberação de IL-1 $\beta$  e biomarcadores de estresse oxidativo em comparação com o grupo tratado com placebo. Já a administração das raízes pulverizadas de *Cinnamomum zeylanicum* (500 mg da droga vegetal administrada diariamente por 8 semanas) foi avaliada em ensaio clínico randomizado com 36 mulheres com artrite reumatoide. O estudo demonstrou que os pacientes tratados com a canela apresentaram uma diminuição significativa dos níveis séricos de proteína C reativa e TNF em comparação com o grupo tratado com o placebo (OLIVEIRA et al., 2021).

No Brasil, a diversificada flora do país, ainda não proporcionou o desenvolvimento de um fitoterápico antiartrítico, ou com estudo clínico em andamento. No entanto, já resultou o desenvolvimento de alguns produtos com ampla aceitação no mercado, caso do Acheflan<sup>®</sup>, um anti-inflamatório tópico produzido a partir do óleo essencial de folhas de *Cordia verbenaceae* (YUNES; CHECHINEL-FILHO, 2016).

Portanto, a riquíssima biodiversidade brasileira, o menor volume de recursos dispendidos para o desenvolvimento de fitoterápicos e a autonomia de produção desses produtos no país são fatores que podem impulsionar o desenvolvimento de produtos inovadores por indústrias farmacêuticas nacionais (HASENCLEVER et al., 2017).

Um levantamento de medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, realizado em 2017, totaliza 359 produtos, sendo 332 fitoterápicos simples e 27 associações. Esses fitoterápicos são produzidos a partir de 101 espécies vegetais sendo que apenas 27 delas são nativas do Brasil (CARVALHO et al., 2017). No entanto, conforme levantamento realizado no site da ANVISA, em 2023, esse número reduziu para 320 produtos fitoterápicos, sendo que apenas 12 deles são com espécies nativas do Brasil. Tendo em vista a grande biodiversidade brasileira e o extenso uso tradicional de plantas no país, o MS vem empreendo ações para incentivar a pesquisa de plantas medicinais com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos visando sua introdução no SUS, incluindo a chamada pública CNPq/MS-SCTIE-Decit Nº 19/2018 – Fitoterápicos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Equipamentos**

- Analisador de tamanho de partículas LS Particle Size Analyse, modelo LS 13320 Beckman Coulter.
- Agitador magnético com aquecimento IKA, C-MAG modelo HS 7.
- Aparelho para determinação de densidade de pós e granulados Erweka SVM.
- Balança analítica Metler, modelo AB 204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho-maria, Fanem, modelo 146.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09.
- Centrífuga citológica Fanen, modelo 248.
- Centrífuga Hermle Z323K.

- Chapa agitadora, Fisaton.
- Citospin, Shandon II, ThermoShandon.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Estufa de CO<sub>2</sub> Forma Scientific, modelo 3158.
- Estufa de cultura Fanem, modelo 502 A.
- Estufa de secagem com renovação de ar, Fanem.
- Evaporador rotatório Büchi, modelo B-480.
- Instrumento para PCR quantitativo (qPCR) SuperScript Reverse Transcriptase III, Thermo Fisher Scientific.
- Lavador de microplacas Bio-Rad, modelo ImmunoWash 1575.
- Leitor de microplacas Tecan, modelo Infinite M200, com software i-control para processamento de dados.
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101.
- Liofilizador para laboratório escala piloto, Epsilon 2-4 LSCplus.
- Ma Malvern Zeta Sizer nano series ZS90
- Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL.
- Microscópio Olympus, modelo CKX41.
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM – 840A.
- Moinho de facas Marconi, modelo MA680.
- Phmetro Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Pipetador automático Drummond, modelo Pipet Aid XP.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Real-time PCR System CFX96, marca BioRad.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência Waters Acquity UPLC H-Class Bio System (modelo 2015), constituído por injetor automático, detector de arranjos de diodos PDA 2996, bomba quaternária L-6200<sup>a</sup> com degaseificador de linhas, e sistema computadorizado operado pelo programa Empower 3, Waters®.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) - Waters®, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray Z-spray (ESI), analisador de massas do tipo quadrupolo e sistema computadorizado operado pelo programa MassLinx.
- Spray dryer Buchi 190.

- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500.
- Termociclador com gradiente para PCR, Kasvi.
- Termociclador 7500 Fast usando o fluoróforo SYBR Green, Thermo Fisher Scientific.
- Ultra centrífuga Hermle, modelo Z 323 K.
- Vórtex Mixer, Vixar.

#### 4.2 Solventes e reagentes

- Ácido chicórico (97% de pureza), Extrasynthese.
- Ácido cítrico, Sigma-Aldrich.
- Ácido linoleico, Sigma-Aldrich.
- Ácido *cis*-aconítico (98% de pureza), Sigma-Aldrich.
- Ácido *trans*-aconítico (98% de pureza), Sigma-Aldrich e Extrasynthèse.
- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico, Merck.
- Ácidos grau CLAE: ácido fórmico e ácido fosfórico, Merck.
- Adjuvante completo e incompleto de Freund, Sigma-Aldrich.
- Aerosil®, Êxodo.
- Albumina bovina sérica (BSA), Sigma-Aldrich.
- Albumina bovina sérica metilada (mBSA), Sigma-Aldrich.
- Antibióticos: penicilina G e gentamicina, Sigma-Aldrich.
- Beta-caroteno (95% de pureza), Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Celulose microcristalina 100, Blanver Farmacoquímica Ltda.
- Cloreto de sódio, Sigma-Aldrich.
- Dexametasona, Sigma-Aldrich.
- Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, Sigma-Aldrich.
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich.
- DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, Sigma-Aldrich.
- EDTA dissódico, Sigma-Aldrich.
- Etanol comercial, Minálcool e Emfal.
- Etanol P.A., Sigma-Aldrich.
- Fosfato de sódio monobásico, Sigma-Aldrich.
- Fosfato dissódico de dexametasona, Sigma-Aldrich.

- Fosfato de sódio bibásico, Merck.
- Homoorientina, (98% de pureza) Extrasynthèse.
- Kit ELISA IL-1 $\beta$  humano, DY201 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA MCP-1 humano, DY279 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA TNF- $\alpha$  humano, DY210 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA TNF- $\alpha$  camundongo, DY410 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA IL-1 $\beta$  camundongo, DY401 Duo Set, R&D systems
- Kit ELISA CXCL1 camundongo, DY453 Duo Set, R&D systems.
- Kit ELISA IL-6 camundongo, DY40605 Duo Set, R&D systems
- Líquido de Turk, Reny-lab.
- Lipopolissacarídeo bacteriano, Sigma-Aldrich.
- Meio de cultura RPMI, Sigma-Aldrich.
- *o*-Fenilenodiamina (OPD), Sigma-Aldrich.
- Paraformaldeído, Sigma-Aldrich.
- Pastilhas de tampão fosfato salino, Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrogênio P.A., Synth.
- Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), Sigma- Aldrich.
- Pirogalol, Sigma- Aldrich.
- Polietilenoglicol 300 (PEG300) P.A., Sigma-Aldrich.
- Primers ITS (4/5 e ER e EF) matK (ER/EF e MG1/MG5), leafy (FLint2-F1 e FLint2-R1), 5S-NTS (PI e PII) e psbA-trnH (psbA e trnH2), IDT.
- Primers MMP3, MMP1 e COL1A, IDT.
- Propilenoglicol, Neon.
- Quercetina (95% de pureza), Sigma- Aldrich
- Solventes grau CLAE: metanol e acetonitrila, Tedia Brasil.
- Random primers (Promega, EUA)
- Sílica gel 60 G, Merck.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol, álcool etílico, Neon; éter de petróleo, Quimex.
- Soro fetal bovino inativado, Sigma-Aldrich.
- Swertisina doação do Professor Eloir Schenkel da Universidade Federal de Santa Catarina
- Tampão fosfato salina (PBS), Sigma-Aldrich.

- Tween 20, Sigma-Aldrich
- Tween 80, Sigma-Aldrich

#### 4.3 Vidrarias e materiais diversos

- Balões volumétricos de 1, 10, 25 e 100 mL, Satelit, Normax e Blaubrand.
- Borrifador de vidro.
- Béqueres, provetas e balões de fundo redondo de diferentes tamanhos.
- Câmara de Neubauer, Labor Optik.
- Capilar para aplicação em CCD.
- Coluna para UPLC Waters BEHC18 (50 × 2,1 mm d.i., partículas de 1,7 µm).
- Coluna para UPLC Acquity UPLC HSS C18, Waters; 100 × 2,1 mm d.i. 1,8 µm
- Coluna para CLAE LiChrospher100, RP-18, com partículas de 5 µm, 125 × 4,6 mm d.i., Merck.
- Coluna para CLUE, C18, com partículas de 1,8 µm, 50 × 2,1 mm d.i., Waters.
- Cromatoplas de vidro de 5 × 10 cm e 10 × 10 cm.
- Cromatofolhas (Al) de sílica gel, Merck.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Frascos de vidro com tampa rosqueável de 20 mL.
- Frascos para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup>, Corning.
- Kit de coloração de lâminas panótico.
- Lâmina para análise diferencial de leucócitos, análises histopatológicas e câmara de Neubauer.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, CellStar 655180, Greiner-Bio-One.
- Microplaca de 96 poços para imunoensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen.
- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 5 mL e 10 mL, Sarstedt.
- Placa de 96 poços para cultivo celular, Corning.
- Placa de 96 poços para imunoensaio, Nunc.
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Ração para roedores, Nuvilab.
- Seringas e agulhas de diferentes dimensões.

- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 µm, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Tubo de ensaio para coletor de frações.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- Tubo de plástico tipo *safe-lock* de 2 mL, MDI.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e CLUE-MS.

#### 4.4 Obtenção e processamento do material vegetal

A droga vegetal folhas de *E. macrophyllus* foi adquirida da Indústria Farmacêutica Catedral LTDA em dois lotes distintos. O primeiro foi adquirido em 04/2014 (lote 01488/14) e denominado DV1 e o segundo em 03/2019 (lote 00456/19) e denominada DV2. A droga vegetal folhas de *E. grandiflorus* também foi adquirida da Indústria Farmacêutica Catedral LTDA em 05/2013 (lote 02077/13) e denominada EG. Todas as drogas vegetais foram acompanhadas de laudos de identificação e de controle de qualidade emitidos pelo fornecedor. As drogas vegetais foram pulverizadas em moinho de facas e acondicionadas em frascos de vidro.

As folhas de *E. macrophyllus* foram coletadas no Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) da UFMG. Material testemunho deste exemplar foi previamente depositado no Herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o número BHCB 28557. Esta amostra vegetal, denominada DVMus, foi seca e pulverizada em moinho de facas e posteriormente armazenada em frascos de vidro. O acesso ao patrimônio genético foi realizado no âmbito de projeto registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número AEE3796.

#### 4.5 Análise da composição química qualitativa das drogas vegetais por LC-MS

As drogas vegetais DV1, DV2, DVMus e EG tiveram sua composição química analisada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas (UPLC-ESI-MS). Para tanto, foram preparados diferentes extratos a partir das drogas vegetais (DV1, DV2, DVMus e EG) por sonicação, com o intuito de comparação entre as amostras obtidas.

#### 4.5.1 Preparo dos extratos

Porções de 1 g do material vegetal seco de DV1, DV2, DVMus e EG foram submetidas à sonicação com 150 mL de etanol comercial (EtOH 96 °GL), ou com soluções hidroetanólicas a 90% (EtOH 90%), 70 % (EtOH 70%) e 50% (EtOH 50%) v/v, em 3 ciclos extrativos com duração de 10 minutos cada. No caso das soluções hidroetanólicas, o grau de alcoolatura foi ajustado com auxílio de alcoômetro. Os extratos obtidos foram filtrados, reunidos e concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura média de 55 °C. Na sequência, os extratos hidroetanólicos foram liofilizados até completa eliminação da água. Todos os extratos foram transferidos para frascos previamente tarados, e mantidos em dessecador, sob pressão reduzida, para eliminação do solvente residual, e os respectivos rendimentos foram calculados (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Rendimentos extrativos obtidos para os extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de DV1, DV2 e DVMus preparados por sonicação.

| Droga vegetal | Solvente extrator | Massa da droga vegetal (g) | Massa do extrato seco (g) | Rendimento (% m/m) |
|---------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|
| DV1           | EtOH 96°GL        | 1                          | 0,0851                    | 8,5                |
|               | EtOH 90%          | 1                          | 0,0999                    | 9,9                |
|               | EtOH 70%          | 1                          | 0,2131                    | 21,3               |
|               | EtOH 50%          | 1                          | 0,2534                    | 25,3               |
| DV2           | EtOH 96°GL        | 1                          | 0,114                     | 11,1               |
|               | EtOH 90%          | 1                          | 0,144                     | 14,4               |
|               | EtOH 70%          | 1                          | 0,1913                    | 19,1               |
|               | EtOH 50%          | 1                          | 0,2258                    | 22,6               |
| DVMus         | EtOH 96°GL        | 1                          | 0,0407                    | 4,1                |
|               | EtOH 90%          | 1                          | 0,1965                    | 19,6               |
|               | EtOH 70%          | 1                          | 0,2151                    | 21,5               |
|               | EtOH 50%          | 1                          | 0,2221                    | 22,2               |
| EG            | EtOH 96°GL        | 1                          | 0,0297                    | 2,9                |
|               | EtOH 90%          | 1                          | 0,1137                    | 11,4               |
|               | EtOH 70%          | 1                          | 0,2215                    | 22,1               |
|               | EtOH 50%          | 1                          | 0,228                     | 22,8               |

Legenda: DV1: *E. macrophyllus* obtida em 2014; DV2: *E. macrophyllus* obtida em 2019; DVMus: *E. macrophyllus* obtida do MHNJB e EG: *E. grandiflorus*; EtOH 96°GL: extrato com etanol 96 °GL; EtOH 90%: extrato hidroetanólico 90%; EtOH 70%: extrato hidroetanólico 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico 50%.

#### 4.5.2 Análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

Os extratos obtidos por sonicação a partir de DV1, DV2 e DVMus (item 4.5.1) foram analisados empregando-se UPLC acoplado a DAD em interface com

espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo (MS-TQD). Para tanto, empregou-se uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC HSS C18, Waters; 100 × 2,1 mm d.i. 1,8 µm) em combinação com uma pré-coluna (Acquity UPLC HSS C18 VanGuard pre-column; 2,1 × 5 mm d.i. 1,7 µm), utilizando-se eluição com água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico no modo de eluição em gradiente segmentado (GARCIA et al., 2016, adaptado), representado na **Tabela 4**. O fluxo utilizado foi de 0,3 mL/min, com volume de injeção de 4,0 µL, mantendo-se a temperatura da coluna em 40 °C.

**Tabela 4.** Condição de eluição utilizada para análise dos extratos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

| Tempo | %H <sub>2</sub> O | %CH <sub>3</sub> CN | Modo de eluição          |
|-------|-------------------|---------------------|--------------------------|
| 0     | 96                | 4                   | -                        |
| 1     | 96                | 4                   | Isocrático               |
| 8     | 30                | 70                  | Gradiente côncavo tipo 7 |
| 9     | 5                 | 95                  | Gradiente linear         |
| 11    | 5                 | 95                  | Isocrático               |
| 12    | 96                | 4                   | Gradiente linear         |

Legenda: H<sub>2</sub>O: água Milli-Q; CH<sub>3</sub>CN: acetonitrila.

As análises no espectrômetro de massas foram realizadas em modo exploratório (*Scan*), monitorando os modos negativo e positivo, em operação nas seguintes condições: voltagem do capilar de 3,54 kV; voltagem do cone de rampa de 10-70V; temperatura da fonte de 120 °C; temperatura de dessolvatação 450 °C (**Tabela 5**). O intervalo de massas avaliado foi da relação massa/carga (*m/z*) de 100 a 900. As amostras foram injetadas na concentração de 1 mg/mL, obtidas por meio da solubilização de 1 mg de cada extrato em 1,0 mL de metanol (MeOH) grau Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), realizada diretamente em microtubos plásticos tipo *safe-lock*. O extrato foi mantido em banho de ultrassom (10 minutos), centrifugado a 8.400 × *g*, ambos por 10 min, e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de PVDF (0,22 µm) e injetados, automaticamente, no sistema de cromatografia descrito.

**Tabela 5 -** Condições espectroscópicas definidas para a análise dos extratos.

| Condições espectroscópicas de detecção no modo ESI- |      |
|-----------------------------------------------------|------|
| Voltagens                                           |      |
| Capilaridade(kV)                                    | 3,54 |

|                                                 |           |
|-------------------------------------------------|-----------|
| Cone (V)                                        | 10-70     |
| Extrator (V)                                    | 3         |
| RF Lens (V)                                     | 0,1       |
| <b>Temperatura</b>                              |           |
| Temperatura de dessolvatação (°C)               | 450       |
| Temperatura na fonte (°C)                       | 120       |
| <b>Fluxo dos Gases</b>                          |           |
| Gás de dessolvatação (L/h)                      | 600       |
| Cone (L/h)                                      | 60        |
| <b>Analizador</b>                               |           |
| Resolução de massas baixas 1                    | 14,7      |
| Resolução de massas altas 1                     | 10        |
| Ion energy                                      | 1         |
| Entrada                                         | 2         |
| Saída                                           | 2         |
| Resolução de massas baixas 2                    | 13        |
| Resolução de massas altas 2                     | 14        |
| Ion energy 2                                    | 1         |
| Ganho                                           | 1         |
| <b>Espectroscopia na região do ultravioleta</b> |           |
| Faixa de varredura (nm)                         | 190 - 500 |

A identificação dos constituintes foi realizada com base na feição espectral e máximos de absorção no UV, bem como pela  $m/z$  do íon referente à molécula desprotonada  $[M-H]^-$  e o perfil de fragmentação. Para fragmentação foram analisadas voltagens de colisão de 12-26v. A identificação baseou-se na comparação com dados da literatura e com resultados obtidos para substâncias de referência disponíveis (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, swertisina e ácido chicórico), analisados na concentração de 20 µg/mL.

#### 4.6 Identificação molecular e análise filogenética de *E. macrophyllus*

Procedeu-se a análise molecular e filogenética de amostra de *E. macrophyllus*. O trabalho foi realizado sobre supervisão do Prof. João Aguiar Nogueira Batista, do Departamento de Botânica, ICB, UFMG. Para tanto, foi coletado material vegetal fresco de espécime cultivado no MHNJB da UFMG (DVMus), incluindo folhas, caules, raízes e flores. As folhas coletadas da espécie foram submetidas à extração de DNA para posterior análise molecular e filogenética.

##### 4.6.1 Isolamento de DNA, amplificação, sequenciamento, alinhamento e cálculo de distância par a par

O DNA genômico total foi extraído de folhas frescas usando uma versão modificada do protocolo 2 × CTAB de Doyle & Doyle (1987). Para as amplificações por PCR, utilizou-se os *primers* descritos na **Tabela 6** e os parâmetros descritos por Lehtone & Myllys (2008) e Staden e colaboradores (1998), com pequenas modificações. Os produtos amplificados e purificados foram sequenciados em ambas as fitas de DNA usando os mesmos *primers* de PCR pela Macrogen Inc. (Coreia). Os eletroferogramas das sequências de DNA foram editados e um consenso foi gerado por meio da utilização do programa Staden (STADEN; BEAL; BONFIELD, 1989). As sequências foram alinhadas usando o programa MUSCLE (EDGAR; MUSCLE, 2004) e posteriormente ajustadas manualmente usando o programa MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), de acordo com os procedimentos descritos por Kelchner (2000). As distâncias genéticas (47 terminais e 3182 pares de bases) entre os principais grupos recuperados nas análises filogenéticas foram calculadas usando o método da distância *p* no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Lacunas e dados ausentes foram tratados com a opção de exclusão Pairwise.

**Tabela 6.** *Primers* usados no PCR e sequenciamento.

| Marcadores       | Primer    | Sequência 5' → 3'              | TM      | Referências         |
|------------------|-----------|--------------------------------|---------|---------------------|
| ITS              | ITS4      | TCCTCCGCTTATTGATATGC           | 54°C    | White et al. 1990   |
|                  | ITS5      | GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG         | 53°C    |                     |
|                  | ITS-ER    | ATGCTTAAACTCRGCGGGTGA          | 59/62°C |                     |
| 5S-NTS           | PI        | TGGGAAGTCCTYGTGTTGCA           | 59/62°C | Cox et al. 1992     |
|                  | PII       | KTMGYGCTGGTATGATCGCA           | 56/63°C |                     |
| Leafy            | Flint2-F1 | CTTCCACCTCTACGACCAGTG          | 60°C    | Grob et al. 2004    |
|                  | Flint2-R1 | TCTTGGGCTTGTTGATGTAGC          | 58°C    |                     |
| <i>matK</i>      | matK-EF   | GAAGAATTCCAAAARGATTT           | 45/47°C | Liang & Hilu 1996   |
|                  | matK-ER   | TCCTTGATATCGAACATAATG          | 49°C    |                     |
|                  | MG1       | CTACTGCAGAACTAGTCGGATGGAGTAGAT | 63°C    |                     |
|                  | MG15      | ATCTGGGTTGCTAACTCAATG          | 55°C    |                     |
| <i>psbA-trnH</i> | psbA      | GTTATGCATGAACGTAATGCTC         | 54°C    | Sang et al. 1997    |
|                  | trnH2     | CGCGCATGGTGGATTCAATCC          | 64°C    |                     |
|                  |           |                                |         | Tate & Simpson 2003 |

Legenda: TM: temperatura de *melting*.

#### 4.6.2 Marcadores moleculares, análises filogenéticas e moleculares

Sequências de nucleotídeos de três regiões do genoma nuclear a saber o *nrITS* consistindo em ITS1, ITS2 e o gene 5.8S; a região não transcrita 5S (5S-NTS) e o segundo *ínton* do gene *LEAFY*, bem como de duas regiões plastidiais (*matK-trnK* e

*psbA-trnH*) foram utilizados para as análises moleculares e filogenéticas. A seleção dos marcadores foi baseada em análises filogenéticas moleculares descritas anteriormente para espécies de *Echinodorus* (LEHTONE; MYLLYS, 2008; LEHTONEN; FALCK, 2011). A amostragem taxonômica foi baseada em uma seleção de táxons disponíveis no *GenBank* selecionados para a diversidade taxonômica de *Echinodorus* e incluiu 38 táxons e 47 terminais. Informações sobre *vouchers*, origens geográficas e números de acesso no *GenBank* são fornecidos na **Tabela 7**. Para o enraizamento das árvores nas análises filogenéticas, foi utilizada a espécie *Echinodorus berteroi*, recuperada como irmã das outras espécies do gênero, de acordo com resultados anteriormente descritos (LEHTONE; MYLLYS, 2008; LEHTONEN; FALCK, 2011).

Realizou-se máxima parcimônia (MP) e inferência Bayesiana (BI) para comparar os resultados entre um método que não requer modelos explícitos de substituição de nucleotídeos (MP) com outro que requer (BI). Para detectar possíveis incongruências, a análise foi realizada primeiro individualmente para cada marcador e depois com todos os marcadores concatenados. A análise filogenética de máxima parcimônia foi realizada usando PAUP\* versão 4 (SWOFFORD, 2018) com o algoritmo de Fitch (pesos iguais, caracteres não ordenados; Fitch 1971) como critério de otimização. Cada pesquisa consistiu em 2.000 réplicas de adições aleatórias de táxons, e rearranjo das árvores usando o algoritmo *tree-bisection and reconnection* (TBR), armazenando  $\leq 10$  árvores por replicação para evitar trocas extensas em regiões subótimas. Avaliou-se o suporte interno dos dados obtidos por meio de Bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) utilizando 2.000 réplicas, adição simples e algoritmo de rearranjo TBR, armazenando  $\leq 15$  árvores por replicação. Para os níveis de suporte considerou-se as porcentagens *bootstrap* (BP) de 50 a 70% como fracas, 71 a 85% como moderadas e  $> 85\%$  como fortes (KRESS; PRINCE; WILLIAMS, 2002).

A análise bayesiana usando MrBayes 3.2.7a foi realizada no Portal 2.0 (RONQUIST et al., 2012) do *Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research* (CIPRES), tratando cada região de DNA como uma partição separada. Um modelo evolutivo para cada região de DNA foi selecionado no MrModeltest 2 (NYLANDER, 2004) usando os testes de razão de verossimilhança hierárquica (hLRTs). O comando *unlink* foi usado para estimar os parâmetros do modelo separadamente para cada partição. Cada análise consistiu em duas corridas independentes com quatro cadeias para 10.000.000 gerações, salvando uma árvore a cada 1.000 gerações e um parâmetro de temperatura

de 0,2. A convergência entre as execuções foi avaliada por meio do desvio padrão médio das frequências de divisão ( $< 0,01$ ), do Fator de Redução da Escala Potencial (PRSF) ( $= 1,0$ ) e foi obtida após 1.970.000 gerações. Depois de descartar as primeiras 2.500 árvores (25%) como o *burn-in*, as árvores restantes foram usadas para avaliar a topologia e as probabilidades posteriores (PP) em um consenso de maioria de 50%. Como o PP na análise bayesiana não é equivalente ao BP, mas geralmente é muito maior (ERIXON et al., 2003), usamos critérios semelhantes a um teste estatístico padrão, considerando grupos com  $PP > 0,95$  como fortemente suportados, grupos com PP variando de 0,90 a 0,95 como moderadamente suportados, e grupos com  $PP < 0,90$  como fracamente suportados.

**Tabela 7.** Números de acesso no GenBank e dados de *voucher* dos terminais utilizados nas análises filogenéticas de *Echinodorus*.

| Taxon                                            | Voucher                                   | ITS      | LEAFY    | <i>psbA-trnH</i> | <i>matK-trnK</i> | 5S       |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|----------|------------------|------------------|----------|
| <i>Echinodorus africanus</i><br>Rataj            | PR745390                                  | KT437644 | -        | -                | -                | -        |
| <i>Echinodorus barthii</i><br>H.Muehlberg        | Lehtonen 702<br>(TUR)                     | KT437652 | HM367221 | HM367327         | KT437639         | -        |
| <i>Echinodorus berteroi</i><br>(Spreng.) Fassett | Lehtonen &<br>Ramirez-Garcia<br>412 (TUR) | EF088087 | EF088181 | HM367270         | EF088134         | EF088022 |
| <i>Echinodorus bracteatus</i><br>Micheli         | Lehtonen &<br>Navarrete 491<br>(TUR)      | EF088076 | EF088170 | HM367301         | EF088124         | EF088040 |
| <i>Echinodorus opacus</i><br>Rataj               | Bogner s.n. (TUR)                         | KT437650 | KT437657 | KT437643         | KT437634         | -        |
| <i>Echinodorus cf. osiris</i><br>Rataj           | Quester s.n. (TUR)                        | EF088094 | EF088188 | HM367324         | -                | EF088042 |
| <i>Echinodorus cf. opacus</i><br>Rataj           | Quester s.n. (TUR)                        | -        | HM367214 | HM367323         | -                | -        |
| <i>Echinodorus cf. opacus</i><br>Rataj           | Bogner s.n.                               | -        | HM367214 | HM367323         | KT437634         | -        |
| <i>Echinodorus cordifolius</i><br>(L.) Griseb.   | Lehtonen 457<br>(TUR)                     | EF088078 | EF088172 | HM367302         | EF088126         | EF088027 |
| <i>Echinodorus cordifolius</i><br>(L.) Griseb.   | Lehtonen &<br>Ramirez-Garcia<br>417 (TUR) | EF088079 | EF088173 | HM367303         | EF088127         | EF088028 |
| <i>Echinodorus decumbens</i><br>Kasselm.         | Lehtonen 392<br>(TUR)                     | EF088069 | EF088163 | HM367296         | EF088117         | EF088018 |
| <i>Echinodorus emersus</i><br>Lehtonen           | Lehtonen 140<br>(TUR)                     | EF088051 | EF088147 | HM367286         | EF088100         | EF088001 |
| <i>Echinodorus floribundus</i><br>(Seub.) Seub.  | Lehtonen 188<br>(TUR)                     | EF088054 | EF088150 | HM367287         | EF088103         | EF088004 |
| <i>Echinodorus gabriellii</i><br>Rataj           | Bogner s.n. (TUR)                         | KT437647 | HM367225 | HM367329         | KT437633         | -        |

|                                                                  |                                                                |          |          |          |          |          |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Echinodorus glaucus</i><br>Rataj                              | Muhlberg s.n.<br>(TUR)                                         | EF088084 | EF088178 | HM367307 | EF088132 | EF088033 |
| <i>Echinodorus grandiflorus</i><br>(Cham. & Schltdl.)<br>Micheli | Lehtonen 393<br>(TUR)                                          | EF088070 | EF088164 | HM367297 | EF088118 | EF088019 |
| <i>Echinodorus grandiflorus</i><br>(Cham. & Schltdl.)<br>Micheli | Lehtonen 391<br>(TUR)                                          | EF088065 | HM367239 | HM367337 | EF088113 | EF088014 |
| <i>Echinodorus grisebachii</i><br>Rataj Small                    | Lehtonen 151<br>(TUR)                                          | EF088053 | EF088149 | HM367272 | EF088102 | EF088003 |
| <i>Echinodorus heikobleheri</i><br>Rataj                         | Quester s.n. (TUR)                                             | EF088093 | EF088187 | HM367274 | EF088139 | EF088041 |
| <i>Echinodorus horemanii</i><br>Rataj                            | Falck 96 (TUR)                                                 | -        | HM367230 | HM367332 | -        | -        |
| <i>Echinodorus horizontalis</i><br>Rataj                         | Lehtonen &<br>Rodriguez Arevalo<br>99 (TUR)                    | EF088047 | EF088143 | HM367282 | EF088096 | EF087997 |
| <i>Echinodorus inpai</i><br>Rataj                                | Muhlberg s.n.<br>(TUR)                                         | EF088092 | EF088186 | HM367310 | EF088138 | -        |
| <i>Echinodorus longipetalus</i><br>Micheli                       | Lehtonen &<br>Burguez 271 (TUR)                                | EF088067 | EF088162 | HM367284 | EF088115 | EF088016 |
| <i>Echinodorus longiscapus</i><br>Arechav.                       | Lehtonen & Delfino<br>341 (TUR)                                | EF088063 | EF088158 | HM367292 | EF088112 | EF088012 |
| <i>Echinodorus longiscapus</i><br>Arechav.                       | Lehtonen &<br>Dematteis 204<br>(TUR)                           | EF088059 | HM367245 | HM367289 | EF088108 | EF088009 |
| <i>Echinodorus</i><br><i>macrophyllus</i><br>(Kunth) Micheli     | Lehtonen 700<br>(TUR)                                          | -        | HM367206 | HM367314 | -        | -        |
| <i>Echinodorus maculatus</i><br>Somogyi                          | Lehtonen 719<br>(TUR)                                          | KT437645 | HM367238 | HM367336 | KT437635 | -        |
| <i>Echinodorus muricatus</i><br>Griseb.                          | Botanic Garden,<br>Natural History<br>Museum, UiO,<br>#1993-30 | -        | -        | DQ786514 | -        | -        |
| <i>Echinodorus Osiris</i><br>Rataj                               | Lehtonen 698<br>(TUR)                                          | KT437651 | HM367222 | HM367328 | KF632793 | -        |
| <i>Echinodorus paniculatus</i><br>Micheli                        | Lehtonen &<br>Pacheco 469<br>(TUR)                             | EF088082 | EF088176 | HM367306 | EF088130 | EF088031 |
| <i>Echinodorus paniculatus</i><br>Micheli                        | Lehtonen 168<br>(TUR)                                          | EF088048 | EF088144 | HM367285 | EF088097 | EF087998 |
| <i>Echinodorus</i><br><i>portoalegrensis</i><br>Rataj            | TUR:Bogner s.n.                                                | KT437648 | HM367226 | HM367330 | KT437632 | -        |
| <i>Echinodorus</i><br><i>pseudohorizontalis</i><br>Rataj         | PR:PR745393                                                    | -        | KT437641 | -        | -        | -        |
| <i>Echinodorus pubescens</i><br>Rataj                            | Harley et al. 20019<br>(AAU)                                   | -        | EF088193 | HM367312 | -        | EF088045 |
| <i>Echinodorus reptilis</i><br>Lehtonen                          | Lehtonen &<br>Burguez 261 (TUR)                                | EF088061 | EF088156 | HM367290 | EF088110 | EF088010 |
| <i>Echinodorus scaber</i><br>Rataj                               | Lehtonen &<br>Pacheco 440<br>(TUR)                             | EF088080 | EF088174 | HM367304 | EF088128 | EF088029 |

|                                                                |                                    |          |          |          |          |          |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Echinodorus subalatus</i><br>Mart. ex Schult.f.)<br>Griseb. | Lehtonen &<br>Pacheco 472<br>(TUR) | EF088075 | EF088169 | HM367300 | EF088123 | EF088024 |
| <i>Echinodorus subalatus</i><br>Mart. ex Schult.f.)<br>Griseb. | Lehtonen 394<br>(TUR)              | EF088071 | EF088165 | HM367298 | EF088119 | EF088020 |
| <i>Echinodorus trialatus</i><br>Fassett                        | Lehtonen &<br>Pacheco 441<br>(TUR) | EF088074 | EF088168 | HM367299 | EF088122 | EF088023 |
| <i>Echinodorus tunicatus</i><br>Small                          | Lehtonen 133<br>(TUR)              | EF088058 | EF088154 | HM367283 | EF088107 | EF088008 |
| <i>Echinodorus uruguayensis</i><br>Arechav.                    | Lehtonen et al.<br>237(TUR)        | EF088066 | EF088161 | HM367295 | EF088114 | EF088015 |
| <i>Echinodorus viridis</i><br>Rataj                            | PR:PR745396                        | -        | -        | KT437642 | -        | -        |
| <i>Echinodorus</i> sp.                                         | Lehtonen &<br>Burguez 275 (TUR)    | EF088062 | EF088157 | HM367291 | EF088111 | EF088011 |
| <i>Echinodorus</i> sp.                                         | Lehtonen &<br>Burguez 309 (TUR)    | EF088085 | EF088179 | HM367308 | EF088133 | EF088034 |

#### 4.7 Ensaios extrativos para obtenção de extrato padronizado

Foram realizados ensaios extrativos, em triplicata, visando determinar a melhor condição extrativa para obter extrato vegetal padronizado de *E. macrophyllus*. Os ensaios extrativos foram realizados com a droga vegetal DV2 devido maior disponibilidade de material vegetal. Os ensaios extrativos foram realizados com a relação droga vegetal / solvente extrator indicada na 1ª Edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011). Portanto, os extratos foram preparados na proporção extrativa final de 1 g da droga vegetal para 150 mL do solvente extrator.

Para o estudo do processo extrativo, porções de 20 g de DV2 seca e pulverizada foram submetidas à percolação exaustiva (P), à maceração estática (ME) com renovação de solvente a cada 24 horas, por 7 dias, e à maceração dinâmica (MD), com agitação de 30 minutos e três repetições, com diferentes solventes: etanol 96 °GL, soluções hidroetanólicas a 90%, 70% e 50%, e acetato de etila (EtOAc). Após os ciclos extrativos, a porção orgânica dos solventes extratores foi eliminada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 55 °C, a cada ensaio realizado. Para eliminação da água, foi empregado o processo de liofilização, até a secura completa dos extratos vegetais. Os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo por, no mínimo, 24 horas, para completa eliminação do solvente residual.

#### 4.8 Desenvolvimento de método analítico para a quantificação dos marcadores químicos de *E. macrophyllus* por UPLC-DAD

Os teores dos marcadores químicos ácido *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, ácido chicórico, swertisina, ácido cafeoil-feruloil-tartárico e ácido diferuloil-tartárico foram quantificados por UPLC-DAD nos extratos descritos na seção 4.5.1, 4.7 e 4.16, usando método desenvolvido e validado neste trabalho e descrito na sequência.

##### 4.8.1 Preparo das amostras e soluções de substâncias químicas de referência

Para as análises, porções (1,0 mg) dos extratos secos foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) para os extratos EtOH 70% e EtOH 50%, ou solubilizadas em metanol para os extratos EtOH 96 °GL e EtOH 90%. Posteriormente, os extratos foram sonificados em banho de ultrassom por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 8400 × g por 10 min, filtrados através de uma membrana de 0,22 µm e os sobrenadantes obtidos (5 µL) foram injetados no sistema de UPLC-DAD. Já as soluções das substâncias químicas de referência (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, ácido chicórico, homoorientina e swertisina) foram preparadas a 20 µg/mL, utilizando-se metanol como solvente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 8400 × g por 10 min, filtradas através de uma membrana de 0,22 µm e os sobrenadantes obtidos (5 µL) foram injetados no sistema de UPLC-DAD.

##### 4.8.2 Desenvolvimento do método cromatográfico

O desenvolvimento do método analítico para quantificação foi realizado empregando o sistema Waters Acquity UPLC H-Class Bio System (modelo 2015) composto por uma bomba quaternária, um amostrador automático, um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) 2996 e um sistema de tratamento de dados Empower Pro 3. A partir da condição do perfil exploratório descrita no item 4.5.2, foram realizadas modificações visando melhorar a resolução dos picos de interesse para a quantificação. Os parâmetros avaliados durante o desenvolvimento do método incluíram o modificador orgânico, temperatura, fluxo, tipo de eluição (isocrático, gradiente linear, côncavo e convexo), inclinação do gradiente, comprimento e tipo de partículas de preenchimento das colunas. As condições cromatográficas mais relevantes (A-C) avaliadas neste estudo, são dispostas na **Tabela 8**. O fluxo do eluente de 0,3 mL/min e a temperatura de 40 °C foram mantidos em todas as condições ensaiadas, enquanto volumes de injeção de 5,0 µL e 3,0 µL foram avaliados.

**Tabela 8.** Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação de marcadores químicos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*.

| Tempo (min) | Eluente (%)      |      | Curva | Volume de injeção (µL) |
|-------------|------------------|------|-------|------------------------|
|             | H <sub>2</sub> O | ACN  |       |                        |
| Condição A  |                  |      |       |                        |
| 0           | 96               | 4    | 6     | 5                      |
| 1,5         | 85               | 15   | 6     |                        |
| 11          | 77,5             | 22,5 | 7     |                        |
| 18          | 10               | 90   | 7     |                        |
| 20          | 5                | 95   | 6     |                        |
| 21          | 5                | 95   | 6     |                        |
| 22          | 96               | 4    | 6     |                        |
| Condição B  |                  |      |       |                        |
| 0           | 96               | 4    | 6     | 5                      |
| 1,5         | 85               | 15   | 6     |                        |
| 2,5         | 83,8             | 16,2 | 7     |                        |
| 3,5         | 83,8             | 16,2 | 7     |                        |
| 4,0         | 82,6             | 17,4 | 7     |                        |
| 5,0         | 82,6             | 17,4 | 7     |                        |
| 8,5         | 79,4             | 20,6 | 7     |                        |
| 9,5         | 79,4             | 20,6 | 6     |                        |
| 10,5        | 78,7             | 21,3 | 6     |                        |
| 11,5        | 78,7             | 21,3 | 6     |                        |
| 20,5        | 10               | 90   | 7     |                        |
| 22,5        | 5                | 95   | 6     |                        |
| 23,5        | 5                | 95   | 6     |                        |
| 24,5        | 96               | 4    | 6     |                        |
| Condição C  |                  |      |       |                        |
| 0           | 96               | 4    | 6     | 3                      |
| 1,5         | 85               | 15   | 6     |                        |
| 2,5         | 83,8             | 16,2 | 7     |                        |
| 3,5         | 83,8             | 16,2 | 7     |                        |
| 4,0         | 82,6             | 17,4 | 7     |                        |
| 5,0         | 82,6             | 17,4 | 7     |                        |
| 8,5         | 79,4             | 20,6 | 7     |                        |
| 9,5         | 79,4             | 20,6 | 6     |                        |
| 10,5        | 78,7             | 21,3 | 6     |                        |
| 11,5        | 78,7             | 21,3 | 6     |                        |
| 20,5        | 10               | 90   | 7     |                        |
| 22,5        | 5                | 95   | 6     |                        |
| 23,5        | 5                | 95   | 6     |                        |
| 24,5        | 96               | 4    | 6     |                        |

Legenda: H<sub>2</sub>O: água Milli-Q; ACN: acetonitrila

A identificação dos picos correspondentes aos marcadores químicos nos cromatogramas foi feita por meio da análise do espectro de absorção no UV, comparação com substância química de referência (SQR) injetada nas mesmas condições e comparação com os perfis de fragmentação e do íon molecular obtidos

no UPLC-DAD-ESI-MS/MS, conforme indicado no item 4.5.2. Ainda, para confirmação do analito homoorientina e não de seu isômero orientina, foi realizada a co-injeção do extrato com a adição de SQR (0,5 mg/mL).

O método desenvolvido para a quantificação empregou coluna BEH Shield RP-18 (100 × 2,1 mm d.i., 1,7 µm; Waters) em combinação com uma pré-coluna BEH Shield RP-18 (4 × 4 mm d.i., 1,7 µm; Waters) à 40 °C. Água (A) e acetonitrila (B) foram usados como eluentes, ambos contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, a uma vazão de 0,3 mL/min. Um gradiente segmentado foi empregado compreendendo etapas de gradiente côncavo (tipo 7) e linear, juntamente com etapas de eluição isocrática, conforme descrito na **Tabela 9**. Os espectros no UV foram registrados online no intervalo de 190 a 400 nm e os cromatogramas foram extraídos em 350 nm para quantificar flavonoides e ésteres de ácido tartárico, e em 220 nm para ácidos aconíticos.

**Tabela 9.** Gradiente de eluição desenvolvido para quantificar marcadores químicos em extratos de *E. macrophyllus* por UPLC-DAD

| Tempo | %A   | %B   | Curva |
|-------|------|------|-------|
| 0     | 96   | 4    | 6     |
| 1,5   | 85   | 15   | 6     |
| 2,5   | 83,8 | 16,2 | 7     |
| 3,5   | 83,8 | 16,2 | 7     |
| 4,0   | 82,6 | 17,4 | 7     |
| 5,0   | 82,6 | 17,4 | 7     |
| 8,5   | 79,4 | 20,6 | 7     |
| 9,5   | 79,4 | 20,6 | 6     |
| 10,5  | 78,7 | 21,3 | 6     |
| 11,5  | 78,7 | 21,3 | 6     |
| 20,5  | 10   | 90   | 7     |
| 22,5  | 5    | 95   | 6     |
| 23,5  | 5    | 95   | 6     |
| 24,5  | 96   | 4    | 6     |

Legenda: %A: porcentagem de água Milli-Q; %B: porcentagem de acetonitrila, ambos contendo 0,1% v/v de ácido fórmico.

#### 4.8.3 Validação do método analítico de quantificação por UPLC-DAD

A validação do método cromatográfico desenvolvido (item 4.8.2) foi realizada de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH, 2006) e da resolução RDC Nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017).

Para os estudos de validação, foi utilizado o extrato EtOH 70% devido sua maior complexidade quando comparado com as demais matrizes obtidas nesse trabalho. O programa Empower 3 foi utilizado para aquisição e processamento dos dados. As análises estatísticas foram realizadas no Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2016) e GraphPad Prism, versão 6 (GraphPad Software, 2013).

#### **4.8.3.1 Teste de adequabilidade do sistema**

Com o intuito de estabelecer se o sistema cromatográfico e os procedimentos analíticos otimizados seriam capazes de fornecer dados de qualidade aceitável para as análises quantitativas, os parâmetros de adequabilidade do sistema foram calculados para todos os analitos a serem quantificados nos diferentes extratos. Os parâmetros avaliados foram a resolução ( $R_s$ ), fator de retenção ( $k$ ), fator de cauda, número de pratos teóricos e DPR dos tempos de retenção dos compostos quantificados. Os dados foram obtidos pelo *System Suitability* do programa Empower 3 (Waters), de acordo com as equações recomendadas pela *The United States Pharmacopoeia* (USP, 2006), sendo os resultados expressos como valor médio das representações. Os resultados obtidos foram comparados com os limites recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2011) e Snyder (1997) para análises quantitativas.

#### **4.8.3.2 Seletividade**

A pureza dos picos dos analitos foi avaliada a partir dos espectros no UV registrados pelo DAD em diferentes pontos. Essa análise foi realizada pela comparação entre o ângulo de pureza e o limiar de pureza de cada pico. Foi considerado pico com pureza espectral quando o valor de limiar de pureza foi maior que do ângulo de pureza conforme indicado no software (Empower 3, Waters) e realizado por Oliveira, Lacerda e Bonella (2012) e Mahajan e colaboradores (2022). O método foi considerado seletivo quando todos os analitos apresentaram pureza dos picos, simultaneamente, em uma mesma condição cromatográfica.

#### **4.8.3.3 Linearidade**

A linearidade do método foi determinada para cada marcador químico, sendo eles a mistura dos ácidos *cis*- e *trans*-aconítico na proporção 1:1 (6,25, 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0 µg/mL), homoorientina (1,25, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 µg/mL), swertisina (30,0,

45,0, 67,0, 100,0 e 150,0 µg/mL) e ácido chicórico (9,37, 18,75, 37,5, 75,0, 150,0 e 300 µg/mL). Alíquotas dessas soluções (5 µL) foram injetadas em triplicata no sistema de UPLC-DAD e as curvas de calibração foram obtidas plotando a massa injetada de cada analito *versus* as áreas de pico correspondentes, em três dias distintos, usando regressão linear (Prism 6.01; GraphPad). A curva de calibração do ácido chicórico foi utilizada para quantificar os teores de ácido cafeoil-feruloil-tartárico e ácido diferuloil-tartárico.

As curvas analíticas foram construídas em triplicata, em três dias diferentes. Os dados obtidos para cada analito foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de correlação ( $r$ ) e determinação ( $r^2$ ) correspondente foram calculados. As curvas obtidas nos três dias foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ( $p < 0,05$ ). Para a análise das curvas obtidas foram avaliados os coeficientes de correlação ( $r$ ), coeficiente de determinação ( $r^2$ ), teste F de Anova, teste de Ryan-Joiner para normalidade, teste Durbin-Watson para independência dos resíduos e teste de Brown-Forsythe para resíduos, todos calculados pelo programa Action Stat versão 3.6.

#### 4.8.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estimado a partir da equação que considera os parâmetros da curva analítica:

$$LQ = \frac{10 s}{S}$$

Onde:

LQ: limite de quantificação

s: desvio padrão do intercepto da curva da regressão

S: inclinação da curva analítica

#### 4.8.3.5 Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção foi realizada a partir dos dados da curva analítica, utilizando-se a seguinte equação:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

Onde:

LQ: limite de quantificação

s: desvio padrão do intercepto da curva de regressão

S: inclinação da curva analítica

#### 4.8.3.6 Precisão

A avaliação da precisão foi realizada intradia e interdia. A precisão intradia foi verificada por meio de seis determinações a 100% da concentração dos marcadores químicos ( $n = 6$ ). As amostras foram preparadas segundo descrito no item 4.8.1. A precisão interdia foi determinada de maneira semelhante, em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ( $n = 12$ ).

O teor de cada marcador químico no extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* foi determinado e o DPR foi calculado. As médias dos teores entre os dois dias de determinações foram comparadas pelo teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8.3.7 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela recuperação por meio da fortificação do extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* com quantidades conhecidas das SQR. Para isso, foram preparadas soluções metanólicas das SQR (1000 µg/mL). Volumes diferentes das soluções contendo massas conhecidas das substâncias foram adicionadas diretamente a 2 mg do extrato EtOH 70%, conforme descrito na **Tabela 10** para cada marcador químico.

Todos os marcadores químicos foram fortificados em três níveis de concentração, em triplicata para cada nível. Após a fortificação, as soluções foram preparadas e analisadas conforme o item 4.8.1. Amostras com o extrato EtOH 70% sem fortificação ( $n = 3$ ) também foram preparadas para a determinar a massa recuperada. A recuperação foi determinada conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{massa experimental}}{\text{massa teórica}} \times 100$$

**Tabela 10.** Correspondência entre os volumes e as massas de SQR adicionadas ao extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* para ensaio de recuperação.

| Solução do analito<br>(concentração em mg/mL)             | Volume (µL) de solução de<br>SQR adicionada ao extrato | Massa (µg) de SQR<br>adicionada ao extrato |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> -aconíticos<br>(1 mg/mL) | 6,25                                                   | 6,25                                       |
|                                                           | 12,5                                                   | 12,5                                       |
|                                                           | 25,0                                                   | 25,0                                       |

|                              |       |       |
|------------------------------|-------|-------|
| Homoorientina<br>(1 mg/mL)   | 0,7   | 0,7   |
|                              | 1,4   | 1,4   |
|                              | 2,8   | 2,8   |
| Swertisina<br>(1 mg/mL)      | 0,87  | 0,87  |
|                              | 1,75  | 1,75  |
|                              | 3,5   | 3,5   |
| Ácido chicórico<br>(1 mg/mL) | 3,73  | 3,73  |
|                              | 7,45  | 7,45  |
|                              | 14,90 | 14,90 |

Legenda: SRQ: substância química de referência.

#### 4.8.3.8 Robustez

Para o ensaio de robustez, seis soluções extrativas foram preparadas a partir do extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus*, conforme descrito no item 4.8.1. As soluções foram analisadas empregando-se a condição analítica estabelecida (item 4.8.2) e, também, após alterações deliberadas das condições de análise dos seguintes parâmetros: temperatura da coluna (38 e 42 °C), comprimento de onda para detecção dos analitos (348 e 352 nm para flavonoides e derivados do ácido tartárico; 218 e 222 nm para os ácidos *cis*- e *trans*-aconítico) e a concentração de ácido fórmico na fase móvel (0,08 e 0,12% v/v). Os parâmetros modificados foram avaliados individualmente. As concentrações foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.9 Quantificação dos marcadores químicos em extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* por UPLC-DAD

A quantificação dos marcadores químicos em extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* foi realizada com as amostras preparadas nos itens 4.5.1, 4.7, e 4.16, empregando o método desenvolvido e validado por UPLC-DAD (item 4.8). Os teores de marcadores químicos nas amostras foram calculados utilizando o fator resposta (SNYDER et al., 1997). Os teores foram obtidos em triplicata ( $n = 3$ ) e foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.10 Atividade dos extratos sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro*

O efeito dos extratos obtidos nos ensaios extrativos (itens 4.5.1 e 4.7) sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias foi avaliado *in vitro* em cultura de células THP-

1 (linhagem monocitária derivada de leucemia aguda monocítica humana - ATCC TIB-202) estimuladas com LPS. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos da sulforrodamina B (SRB) e do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Para isso, as células monocíticas foram diferenciadas em macrófagos através do estímulo com o acetato miristato de forbol (PMA). As amostras que apresentaram viabilidade celular superior a 90% foram consideradas não tóxicas e elegíveis para a realização do ensaio de quantificação de citocinas pró-inflamatórias. Todos os experimentos foram realizados com os extratos na concentração de 60 µg/mL.

#### **4.10.1 Avaliação da viabilidade celular por SRB**

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Vichai e Kirtikara (2006). As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma suspensão de células foi preparada na densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL, obtida pela centrifugação de um frasco de cultura e ressuspensão sequencial do *pellet* com RPMI contendo 10% de SFB e 2 µL de PMA (1 mg/mL). Alíquotas de 100 µL desta suspensão foram transferidas para os poços de uma microplaca, que foi incubada à 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 6 horas para permitir a diferenciação e adesão das células.

Após este período, as células foram carenciadas com o meio RPMI suplementado com 2% de SFB e incubadas novamente nas mesmas condições, por 12 horas. Após este período, as amostras foram plaqueadas nas concentrações do ensaio (60 µg/mL) e a microplaca foi novamente incubada nas mesmas condições por 18 horas. Para promover a fixação das células, após a incubação, 100 µL da solução de ácido tricloroacético (TCA, 10% v/v) à 4°C foram adicionados em cada poço. A microplaca foi incubada à 4 °C por 1 h. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados cuidadosamente quatro vezes com 200 µL de água destilada em lavadora automática de microplacas. Em seguida, os poços foram deixados secar por 24 h.

Na sequência, 100 µL da solução de SRB 0,057 % (m/v) foram adicionados, e a placa foi deixada à temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso de corante presente nos poços da microplaca foi removido por meio de quatro ciclos de lavagem com 200 µL de solução de ácido acético 1% v/v. A placa foi deixada para secar durante 24h. Em sequência, 100 µL de solução Tris Base 10 mM (pH 10,5) foram adicionados

em todos os poços da microplaca, para extração do corante ligado as proteínas. A placa foi agitada durante 5 minutos no leitor de microplacas e a densidade óptica foi medida em 510 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula  $(A - B / C - B) \times 100$ , onde A, B e C, correspondem às absorbâncias das amostras, branco e controle negativo, respectivamente.

#### **4.10.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT**

O ensaio foi realizado conforme previamente descrito, com modificações (MOSMANN, 1983). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço e incubadas por 24 horas em estufa à 37 °C e atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de meio completo contendo as amostras (60 µg/mL) em triplicata. Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 28 µL/poço do sal de tetrazólio (MTT), na concentração de 2 mg/mL, em tampão fosfato (PBS). Após 90 min de incubação com o MTT, todo o conteúdo foi aspirado por pipeta automática, seguindo-se adição de DMSO a cada poço (100 µL/poço) e posterior homogeneização com a pipeta automática para solubilizar os cristais de formazana formados. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro em 510 nm. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a equação descrita para SRB no item 4.10.1.

#### **4.10.3 Determinação da concentração de TNF e IL-1 $\beta$**

Para quantificar as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células THP-1 estimuladas com LPS, foram adicionados à microplaca 100 µL de suspensão celular em meio RPMI contendo 2% de SFB à  $1 \times 10^5$  células/poço. A placa foi incubada em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. As amostras foram solubilizadas em meio RPMI com 2% de SFB nas concentrações de ensaio e 100 µL das soluções foram adicionados aos poços. Na sequência, a placa foi incubada por 3 horas nas condições descritas anteriormente. Em seguida, 20 µL de solução de LPS (1 ng/mL em meio RPMI com 2% de SFB) foram adicionados aos poços, e a placa foi incubada novamente por 12 horas, nas mesmas condições. Após incubação, a microplaca foi centrifugada ( $1800 \times g$  por 5 minutos) e 100 µL do sobrenadante foram coletados para quantificar as citocinas pelo método de ELISA, conforme o protocolo descrito a seguir. O pellet celular foi utilizado para avaliação da viabilidade celular por MTT, conforme descrito no item anterior.

#### 4.10.3.1 Protocolos de ELISA para ensaios *in vitro*

Para a determinação da concentração de citocinas humanas foram utilizados kits de ELISA da R&D Systems (DY210-KIT TNF e DY201-KIT IL-1 $\beta$ ) e o ensaio foi realizado conforme as orientações do fabricante. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura anti-TNF e anti-IL-1 $\beta$  (4  $\mu$ g/mL), solubilizados em PBS. A placa foi mantida à 2-8 °C durante 12 horas. Após incubação, as placas foram lavadas (3 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 20, 0,1% v/v) em um lavador de placas automático.

As placas foram completamente secas e, em seguida, adicionou-se 200  $\mu$ L da solução de bloqueio (1% de albumina de soro bovino em PBS) em todos os poços. A microplaca foi mantida em agitação por 2 horas. Após esse período, a placa foi lavada e seca conforme descrito anteriormente. Adicionou-se, então, 100  $\mu$ L das amostras ou dos padrões de TNF (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,6, pg/mL) ou de IL-1 $\beta$  (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,6 e 7,81 pg/mL). Incubou-se a microplaca por 18 horas à 2-8 °C e posteriormente as placas foram lavadas e secas.

Adicionou-se, na sequência, 100  $\mu$ L de solução de anticorpo de detecção TNF (500 ng/mL) ou IL-1 $\beta$  (200 ng/mL) e as placas foram mantidas sob agitação por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e secas, na sequência adicionou-se aos poços da microplaca 100  $\mu$ L de uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (R&D system). Incubou-se as placas por 30 minutos na ausência da luz e realizou-se a última lavagem e secagem vigorosa das placas. Adicionou-se aos poços 100  $\mu$ L de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato (0,4 mg/mL) e 2,4  $\mu$ L de solução de peróxido de hidrogênio (35% v/v). A reação foi interrompida após 30 minutos pela adição de 50  $\mu$ L de ácido clorídrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado em leitor de microplacas em 490 nm. A concentração de TNF e IL-1 $\beta$  foi calculada a partir da curva de calibração construída para cada citocina.

#### 4.11 Avaliação da atividade antioxidante de extratos obtidos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*

A atividade antioxidante dos extratos vegetais obtidos (item 4.5.1) foi avaliada por três metodologias distintas: estabilização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), proteção da oxidação do  $\beta$ -caroteno, pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, e inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células THP-1, que são descritas na sequência.

#### 4.11.1 Atividade de captura dos radicais DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo modelo de captura dos radicais DPPH foi realizada conforme descrito anteriormente por Mensor e colaboradores (2001), com adaptações. Todos os extratos foram inicialmente ensaiados a 200 µg/mL, e posteriormente as amostras ativas (% de inibição superior a 50%) foram avaliadas nas concentrações de 1-200 µg/mL e curvas de concentração-resposta foram construídas para determinação da concentração efetiva para estabilização de 50% dos radicais (CE<sub>50</sub>). Para realização do protocolo experimental, 250 µL de cada amostra, metanol (controle negativo) e pirogalol (50 µg/mL, controle positivo) foram adicionados a uma placa de 96 poços. Em seguida, 100 µL de metanol (poços em branco) e solução de DPPH (120 µg/mL, poços de reação) foram adicionados à microplaca. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (modelo EL808IU-Biotek, Biotek) a cada 5 min até 25 min, em 515 nm. A porcentagem de atividade de estabilização do radical DPPH (% RSA) foi calculada usando a seguinte equação:  $\% \text{ RSA} = (AC - AS) / AC \times 100$ , onde AC é a absorbância do controle e AS é a absorbância das amostras coletadas em 25 min. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da CE<sub>50</sub> determinada por regressão não linear utilizando GraphPad Prism, versão 6.0.

#### 4.11.2 Ensaio de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O protocolo experimental foi seguido conforme descrito anteriormente por Duarte-Almeida e colaboradores (2006), com pequenas adaptações. Inicialmente, todos os extratos foram avaliados na concentração de 200 µg/mL, e posteriormente, os extratos ativos (% de inibição superior a 50%) foram diluídos para obtenção de curva de resposta da atividade antioxidante. Para o protocolo, os extratos foram solubilizados em metanol (2,2 mg/mL) e posteriormente diluídos de 2,47 a 200 µg/mL.

Para os experimentos, alíquotas de 25 µL das soluções foram adicionadas a uma placa de 96 poços. Uma mistura de 25 mg de ácido linoléico e 100 mg de Tween 20 foi adicionada a um balão de fundo redondo contendo 1 mL de uma solução de  $\beta$ -caroteno em clorofórmio (1 mg/mL) e transferidos para o rotaevaporador até completa evaporação do solvente. Em seguida, 50 mL de água aerada foram adicionados ao frasco, para obtenção da emulsão de  $\beta$ -caroteno. Uma emulsão em branco foi preparada de forma semelhante, exceto pela adição da solução de  $\beta$ -caroteno. Alíquotas (250 µL) de ambas as emulsões foram adicionadas às colunas pares e

ímpares da microplaca, alternadamente. Metanol foi usado como controle negativo e quercetina (20 µg/mL em metanol) como controle positivo.

As leituras foram realizadas imediatamente em 470 nm. Após a primeira leitura, a microplaca foi incubada à 45 °C e o ciclo cinético foi realizado com leituras em intervalos de 15 minutos, totalizando 120 minutos. A atividade antioxidante foi expressa como % de inibição da peroxidação lipídica (%I), utilizando a fórmula  $I\% = \frac{\text{absorbância controle (Ac)} - (\text{abs inicial} - \text{abs final}) - \text{absorbância da amostra (Aam)}}{(\text{abs final} - \text{abs inicial})} \times 100$ . Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores de  $CI_{50}$  foram determinados por regressão não linear usando GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

#### **4.11.3 Atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células THP-1**

O efeito dos extratos na produção de ROS por células THP-1 foi realizado de acordo com Ryan e colaboradores (2004), com adaptações. As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foi preparada uma suspensão celular com densidade de  $2 - 8 \times 10^5$  células/mL, obtida pela centrifugação de um frasco de cultura e ressuspensão sequencial do pellet com RPMI 10% FBS e 4 µL PMA (100 nM) e incubado por 24 horas em garrafas de cultura celular, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o PMA foi lavado com RPMI 10% FBS, com posterior incubação das células sem adição de PMA e SFB em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas. Posteriormente,  $2 \times 10^5$  células por poço foram semeadas (250 µL) em uma placa de 24 poços e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, as células foram tratadas com os extratos (60 µg/mL) e a placa foi incubada por 3 horas em estufa à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram tratadas com uma alíquota (20 µL) de uma solução de LPS (10 µg/mL) a cada 15 minutos por 75 minutos. Os seguintes controles foram adicionados à placa: poços contendo apenas meio RPMI sem LPS, poços contendo meio RPMI com LPS, poços contendo células THP-1 não diferenciadas.

A quercetina (100 µmol/L, metanol) foi usada como controle positivo. Após a estimulação com LPS, as células foram incubadas com 10 µM de H<sub>2</sub>DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluorescina) por 15 min à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram coletados e a fluorescência foi lida em um leitor de microplacas Varioskan Lux (Thermo Scientific), com excitação em 493 nm e emissão em 522 nm.

#### 4.12 Análises quimiométricas

As análises quimiométricas foram realizadas visando estabelecer relações entre os teores dos marcadores químicos, inibição de TNF e atividade antioxidante dos extratos obtidos (item 4.5.1). As análises foram realizadas em colaboração com o Dr. José Hugo de Sousa Gomes (FAFAR, UFMG) e Prof. Marcelo Martins Sena (Departamento de Química, ICEX, UFMG). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada empregando o software MATLAB R2010b (The MathWorks, Natick, EUA) instalado com PLS\_Toolbox 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, EUA).

#### 4.13 Ensaios pré-clínicos para avaliação do potencial antiartrítico

Todos os extratos preparados por percolação (item 4.7) e a formulação obtida (item 4.16) tiveram sua atividade avaliada *in vivo* em modelo agudo de artrite induzida por antígeno (AIA).

Os ensaios foram realizados sob supervisão do Prof. Mauro Martins Teixeira e do Prof. Flávio Almeida Amaral, no Laboratório de Imunofarmacologia, ICB, UFMG. Os ensaios foram executados com o auxílio dos doutorandos Peter Rocha e Brenda Resende, da Dra. Vívian Louise do Laboratório de Imunofarmacologia, ICB, e do Dr. Diego Pinto de Oliveira do Laboratório de Fitoquímica, FAFAR, ambos da UFMG.

##### 4.13.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6j com idade entre 6 e 9 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, ICB. As gaiolas utilizadas tinham dimensões de 28x13x16 cm e foram separadas horizontalmente por 5 cm de cada uma e 60 cm verticalmente, com 4 animais em cada gaiola. Houve controle de temperatura (28 – 30°C), umidade (50%) ventilação e ciclo da luz (claro/escuro) de 12:12 horas. Os animais tiveram acesso a água e ração sem restrição. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 83/2015 e 46/2022).

##### 4.13.2 Modelo de AIA agudo

Os camundongos C57BL/6 foram imunizados pela injeção intradérmica (i.d.) de uma emulsão contendo 100 µL de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich), na qual foram dissolvidos 500 µg de albumina bovina

metilada (mBSA; Sigma-Aldrich). Os experimentos foram realizados 14 dias após a imunização com CFA/mBSA. Os extratos foram avaliados nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, solubilizados em propilenoglicol e administrados por gavagem (100 µL), 1 hora antes do desafio com injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial) de mBSA (10 µg/cavidade, 10 µL). Os animais foram mantidos em jejum por 4 horas antes do tratamento, com livre acesso a água.

Os animais foram eutanasiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (240 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg) 24 horas após o desafio. Seis animais por grupo constituíram a unidade amostral; o grupo controle positivo de tratamento recebeu administração oral de dexametasona (5 mg/kg). O grupo controle negativo foi tratado com o veículo utilizado, sendo que o grupo controle negativo recebeu injeção intra-articular de PBS e o grupo desafiado e os tratados receberam mBSA (COELHO et al., 2008).

#### **4.13.3 Modelo de AIA crônico**

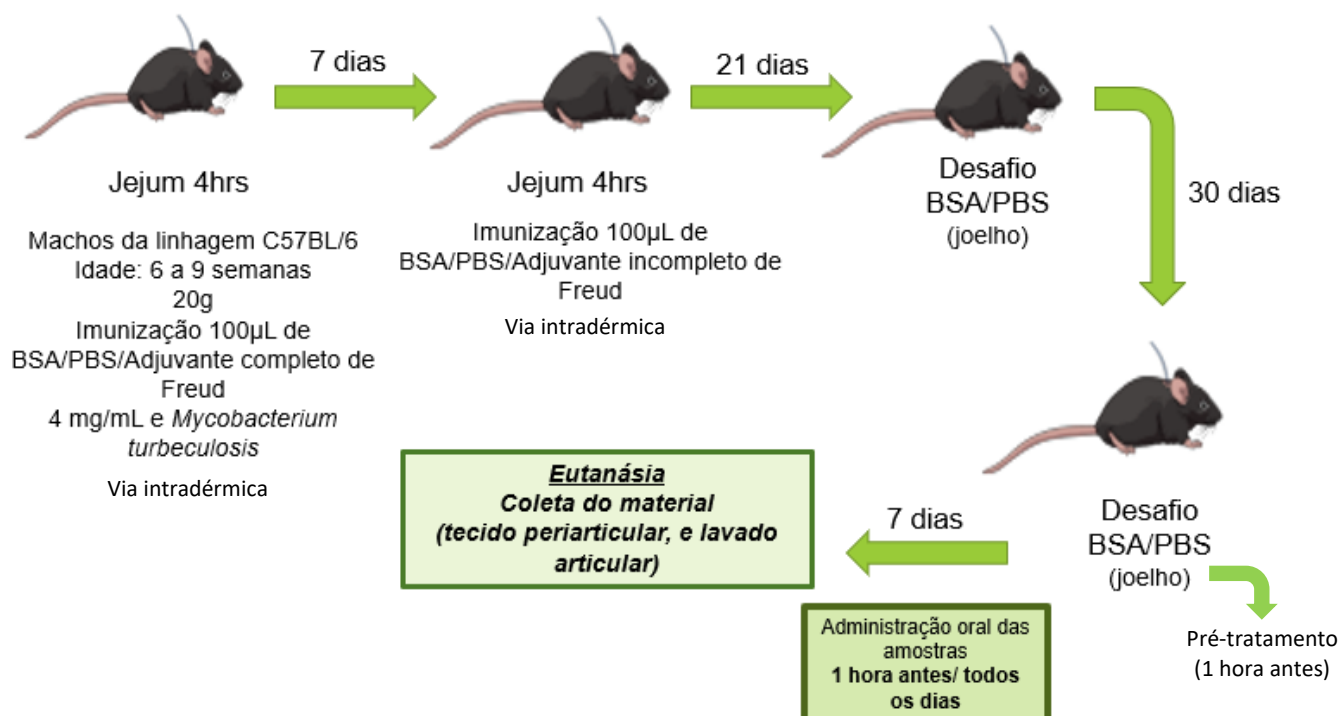
Dois extratos ativos (EtOH 96°GL e EtOH 70%) no modelo agudo de AIA (item 4.13.2) foram avaliados no modelo crônico de AIA. A indução da artrite nesse modelo foi realizada conforme descrito anteriormente por Queiroz-Junior e colaboradores (2011).

Camundongos C57BL/6 foram imunizados no dia 0 por injeção intradérmica (acima da calda do animal) de 100 µg de albumina bovina sérica metilada (mBSA) em 50 µL de PBS, emulsificada em 50 µL de adjuvante completo de Freud (CFA), e suplementada com 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* por volume total da emulsão. Uma segunda imunização foi realizada no dia 7 com mBSA e adjuvante incompleto de Freud (IFA), utilizando mesmo volume e via de administração. Em paralelo a cada imunização, 200 ng da toxina *Bordetella pertussis* em PBS foi injetada por via intraperitoneal.

O primeiro desafio foi realizado no dia 21, por injeção intra-articular de 100 µg de mBSA em 20 µL de PBS. Trinta dias depois (dia 51), os animais foram novamente desafiados com uma segunda injeção intra-articular de 100 µg de mBSA em 20 µL de PBS. Os tratamentos foram realizados nas doses de 30 e 300 mg/kg por gavagem, 1 hora antes da injeção do antígeno (dia 51) e repetidos diariamente até a avaliação dos parâmetros inflamatórios. Dexametasona (5 mg/kg) foi utilizada como controle positivo.

Os animais foram eutanasiados 7 dias após o segundo desafio, e o lavado articular e o tecido periarticular foram coletados para análise (**Figura 6**).

**Figura 6.** Delineamento experimental para o ensaio de AIA crônico indicando as imunizações, desafios e tratamentos realizados no experimento.



#### 4.13.4 Contagem celular

Após administração do estímulo inflamatório, a cavidade articular foi exposta e alíquotas de 20 µL do lavado articular foram coletadas com a injeção de 4 vezes de 5 µL de PBS. As alíquotas foram diluídas em 20 µL de líquido de Turk, e a contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100×) e contador manual. As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação no aparelho Cytospin onde foram colocados 50 µL de albumina bovina sérica (BSA) a 3% e 80 µL do lavado articular. Em seguida, as lâminas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e secas à temperatura ambiente. As lâminas secas foram coradas segundo a técnica de May-Grumwald e Giemsa. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000×), usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar polimorfonucleares e mononucleares. Os resultados foram

expressos como número de células polimorfonucleares e mononucleares  $\times 10^4$  / cavidade articular

#### **4.13.5 Quantificação de citocinas**

Os níveis de citocinas e quimiocinas no tecido periarticular foram quantificados por ensaio de ELISA (COELHO et al., 2008), 24 h (modelo AIA agudo) e 7 dias (modelo de AIA crônico) após administração do segundo estímulo inflamatório. Após a eutanásia dos animais, o tecido da região periarticular do joelho do membro inferior estimulado foi coletado, pesado e em seguida homogeneizado em solução de extração de citocinas, constituída por PBS contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0,1 nM benzetonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, sendo o volume dessa solução ajustado de acordo com a massa do tecido (1 mL para cada 100 mg de tecido). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a  $8400 \times g$  e o sobrenadante utilizado para a quantificação de IL-1 $\beta$  e CXCL-1, sendo esse sobrenadante diluído na proporção de 1:3 em solução de PBS/BSA a 1%. Todos os procedimentos do ensaio de ELISA foram realizados segundo instruções do fabricante dos kits, sendo a detecção realizada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 492 nm.

##### **4.13.5.1 Protocolo de ELISA para ensaios *in vivo***

Os kits de ELISA utilizados para determinação de IL-1 $\beta$  e CXCL-1 de camundongos foram obtidos da R&D Systems (DY410 DuoSet e DY453 DuoSet, respectivamente) e os procedimentos adotados foram realizados conforme as orientações do fabricante. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de soluções de anticorpo de captura nas concentrações de 5,5  $\mu$ g/mL (anti-IL-1 $\beta$ ) e 0,8  $\mu$ g/mL (anti-CXCL-1) em PBS. As soluções permaneceram em contato com a placa overnight, à 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas (3 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%) em um lavador de placas automático. Na sequência, foram adicionados 200  $\mu$ L/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de 2 horas. Em seguida, as soluções padrão de IL-1 $\beta$  de camundongo (2000 a 31,25 pg/mL) ou de CXCL1 (1000 a 15,625 pg/mL) e as amostras (100  $\mu$ L do sobrenadante/ poço) foram adicionadas à placa. Após 18 horas de incubação à 4 °C, as placas foram lavadas e 100  $\mu$ L de solução de anticorpo de detecção biotinilado (200 ng/mL) foram adicionados às mesmas e

incubadas por 1 hora. Transcorrido este período e após lavagem, adicionou-se à placa 100 µL de uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 20 a 30 min, a placa foi novamente lavada e 100 µL de tampão citrato contendo o-fenilenodiamina, na concentração de 0,4 mg/mL e 0,2 µL/mL de peróxido de hidrogênio foram adicionados. Após 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido clorídrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria, em um leitor de placas, no comprimento de onda de 490 nm.

#### **4.13.6 Histopatologia da articulação**

O processamento do material articular para histologia foi realizado com o auxílio do técnico Domênico Romano Romani da Faculdade de Odontologia da UFMG, e as análises de score pelo Dr. Celso Martins Queiroz-Júnior do laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A região da articulação fêmur-tibial foi removida cirurgicamente e dissecada mantendo-se o invólucro muscular. Os espécimes obtidos foram fixados em solução de formalina (10% paraformaldeído a 37%, 0,65% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2) durante 24 horas. As amostras foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA a 10% pH 7,2, à temperatura ambiente, por um período de três semanas. Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos com soluções de etanol (70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanizadas em xilol e incorporadas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo obtendo-se cortes consecutivos de 5 µm, os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina e então analisados em microscópio óptico.

O score histológico foi avaliado segundo Queiroz-Junior e colaboradores (2011). Foram avaliados os seguintes parâmetros: infiltrado leucocitário (score de 0-4 onde 0: ausência de infiltrado leucocitário; 1: inflamação leve (1-10%); 2: inflamação moderada (10-25%); 3: inflamação intensa (25-50%) e 4: inflamação severa (acima de 50%); Integridade do tecido sinovial score de 0-3 onde 0: sem alterações; 1: hiperplasia focal; 2: hiperplasia extensa (30- 50%); e 3: hiperplasia generalizada (acima de 50%); e reabsorção óssea (score de 0-2 onde 0: sem alterações; 1: escassas lacunas de reabsorção e 2: perda óssea/cartilaginosa significativa). Estes parâmetros foram quantificados em um score total de 8.

#### **4.14 Avaliação do potencial anti-inflamatório em cultura primária de condrócitos murinos**

Os extratos vegetais que se mostraram ativos no ensaio de AIA agudo (item 4.13.2) foram avaliados em cultura de condrócitos murinos visando avaliar o mecanismo preliminar da ação anti-inflamatória e antiartrítica. O experimento foi baseado no trabalho realizado por Gosset e colaboradores (2008) e Liu e colaboradores (2010), com adaptações que foram padronizadas conforme descrito na sequência.

##### **4.14.1 Padronização das condições experimentais**

Inicialmente, foi realizada a padronização das condições experimentais empregando cultura primária de condrócitos murinos analisando algumas variáveis fundamentais como: idade do camundongo (3, 4 e 7 dias) para extração do joelho e cultivo de condrócitos, condições gerais de cultivo (concentração de SFB, utilização de tripsina para repique e acompanhamento geral das células), quantidade de células por plaqueamento ( $1 \times 10^7$  e  $2 \times 10^5$  células/poço), concentração dos extratos (50 e 100 µg/mL) com o intuito de definir concentração que não induz morte celular, análise da viabilidade celular pelo método do MTT e LDH, concentração e o tempo de exposição das células ao estímulo pró-inflamatório.

##### **4.14.2 Isolamento de condrócitos de camundongos neonatos**

Para cultura de células de condrócitos, seis camundongos neonatos (CD11c/6) de 4 dias foram eutanasiados por decapitação pós sedação com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10-15 mg/kg). As cartilagens das articulações do joelho foram finamente coletadas e separadas, e sequencialmente digeridas com a solução de collagenase 0,5 mg/mL em meio DMEM por 45 minutos em estufa à 37 °C com agitação. Os condrócitos liberados foram coletados, ressuspensos em meio DMEM (Gibco) suplementado com 15% de soro fetal bovino e solução de antibiótico-antifúngico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B) e mantidos em incubação à 37 °C, e 5% CO<sub>2</sub>, para expansão por 48 horas. Os procedimentos e protocolos experimentais foram adicionados em adendo do CEUA 46/2022.

##### **4.14.3 Protocolo para avaliação do potencial anti-inflamatório em cultura de condrócitos murinos**

Inicialmente, foi realizado o tratamento da microplaca de 48 poços com ornitina (7% em água, 150 µL por poço), durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada e complementada seca. Posteriormente, os condrócitos foram plaqueados (300 µL,  $2 \times 10^5$  células/poço) em meio DMEM com 5% de SFB. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com os extratos vegetais (50 µg/mL) e posteriormente estimuladas com LPS (10 ng/mL). Após 24 horas, foi coletado o sobrenadante para a dosagem de IL-6, e para a avaliação da viabilidade celular pela análise da expressão da enzima LDH. O pellet celular foi adicionado de Trizol para a extração de RNA e posterior análise por qPCR para avaliar a transcrição da enzima metaloproteinase do tipo 3 (MMP-3).

#### **4.14.3.1 Viabilidade celular pela dosagem de LDH**

O ensaio foi realizado conforme instruções do fabricante do Kit LDH (Bioclin). Como controle positivo foi utilizado o Triton, um agente surfactante aniônico capaz de lisar a membrana celular. Para realização do ensaio, foi retirada uma alíquota de 4 µL do sobrenadante de cada poço, a qual foi transferida para uma placa de 96 poços e então adicionado o reagente LDH (reagente 1: substrato tamponado e reagente 2: coenzima, na proporção 1:5). Foram realizadas quatro leituras da absorbância no comprimento de onda de 340 nm em leitor de microplacas (1ª leitura imediatamente após a adição do reagente LDH e leituras sequenciais nos tempos de 1, 3 e 4 minutos). A viabilidade celular foi calculada por meio da equação (2):

$$\Delta/\text{min} = [(\text{Abs. } 1^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{Abs. } 2^{\text{a}} \text{ leitura}) + (\text{Abs. } 3^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{Abs. } 4^{\text{a}} \text{ leitura})] / 2 \\ \times 20794,3467$$

Onde o valor de 20794,34 representa o fator de correção informado pelo fabricante.

#### **4.14.3.2 Dosagem de IL-6 por ELISA**

A dosagem da citocina IL-6 foi realizada por kit de Elisa (DY40605 Duo Set, R&D systems) e os procedimentos adotados foram realizados conforme as orientações do fabricante conforme descrito no item 4.13.5.1.

#### **4.14.3.3 Quantificação de MMP-3, MMP-13 e COL2A1 por RT-qPCR**

A quantificação de metaloproteinase do tipo 3 (MMP-3), metaloproteinase do tipo 13 (MMP-13) e colagenase 1<sup>a</sup> (COL21A) foi realizada conforme descrito por Cisalpino e colaboradores (2017). Inicialmente, O RNA total foi isolado do pellet celular utilizando Trizol.

De acordo com o protocolo, primeiramente é realizada a lise das células pipetando várias vezes. Posteriormente é utilizado no mínimo 750 µL de Trizol para  $5 \times 10^6$  células. Foi adicionado Trizol às células e os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado clorofórmio, na proporção de 0,2 mL para cada 1 mL de Trizol. Cada mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada por 15 minutos em gelo, e em seguida centrifugadas em 12.000 rpm, à 4 °C, por 15 minutos. Cada amostra foi separada em três fases, sendo uma inferior, de coloração rosa contendo fenol clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa superior incolor. A fase aquosa superior foi transferida cuidadosamente para um novo microtubo, evitando a contaminação com a interfase e a fase fenólica. Para a precipitação do RNA, 0,5 mL de isopropanol P.A (1°C) foi adicionado a cada tubo. As amostras foram agitadas, incubadas por 10 minutos em gelo e centrifugadas em 12.000 rpm, à 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante de cada tubo foi desprezado por inversão, com cuidado, e lavado com 1 mL de etanol 75% (1°C), sendo posteriormente centrifugado em 7.500 rpm, 4° C, por 5 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o excesso de álcool retirado da parede do tubo por capilaridade. O pellet resultante foi suspenso em água milliQ livre de RNases. Posteriormente, o RNA extraído foi estocado a -80°C até o uso.

Para o estudo, o RNA foi ressuspenso em água livre de nuclease e posteriormente com a adição da transcriptase reversa, o RNA foi transformado em DNA e amplificado para quantificação em termociclador. Para síntese de cDNA, adicionou-se 2 µL de Randon Primer em 10 µL da amostra do RNA previamente extraído, com posterior aquecimento a 70 °C por 10 minutos, seguido de repouso por 5 minutos à 45 °C para resfriamento. Adicionou-se 8 µL da solução Mix contendo 4 µL de tampão 5×; 1 µL de DL-ditiotreitol (DTT); 1 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTP) 10×; 0,5 µL de Super Script; 0,5 µL de inibidor de RNase e 1µL de água dietilpirocarbonato (DEPC) em cada amostra, incubando-as à 45°C overnight. Ao final, as amostras foram homogeneizadas e deixadas por 10 minutos à 70°C com sequencial armazenamento em temperatura de -20 °C ou -80 °C.

O PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizado em um sistema Applied Biosystems 7500 com detecção de sequência usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com 2 µg de DNA total usando transcriptase reversa M-MLV (Promega) e 50 µM de Oligo dT (15) (Promega). Foram realizados testes de temperatura e concentração de primers para melhor validação dos resultados obtidos. O nível relativo de expressão gênica foi determinado pelo método de ciclo de limite comparativo, conforme descrito pelo fabricante, em que os dados para cada amostra foram normalizados por RNA ribossômico 18S e expresso como uma mudança de dobra em comparação com controles. Os seguintes pares de primers foram usados:

-RNA ribossômico 18S: 5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3' (para frente) e 5'-CTCAACACGGGAAACCTC-3' (reverso)

-COL2A1: 5'-TGCATGAGGGAGCGGTAGAG-3' (para frente) e 5'-TTGGCACCAGGAGCACCAGG-3' (reverso), conforme descrito Donahue e colaboradores (2003).

-MMP-13: 5'-CCTTCTGGTCTTGACAC-3' (para frente) e 5'-GGCTGGGTCACTTCTCTG-3' (reverso), conforme descrito Sigh e colaboradores (2013).

-MMP-3: 5'-CAGGAAGATAGCTGAGGACT-3' (para frente) e 5'-TTCCAAGTGCAGATCCAC-3' (reverso), conforme descrito por Hohjoh e colaboradores (2020).

O cálculo da expressão das metaloproteinases foi realizada conforme as equações abaixo:

**Equação 1:**  $\Delta CT = CT \text{ (expressão do gene alvo)} - CT \text{ (expressão do gene de referência)}$

**Equação 2:**  $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ (expressão do gene em amostra alvo)} - \Delta CT \text{ (expressão do gene em amostra de referência)}$

**Equação 3:**  $2^{-\Delta\Delta CT}$

Onde:

CT: ciclo limite

#### 4.15 Desenvolvimento farmacotécnico para obtenção do extrato padronizado

Para obtenção do extrato padronizado de *E. macrophyllus*, foram avaliadas condições de secagem e adição de adjuvantes. Foram realizadas análises físico-químicas para caracterização dos pós obtidos.

#### **4.15.1 Preparo de extratos padronizados para o processo de secagem**

Inicialmente, o material vegetal seco (folhas de DV2) foi moído em moinho de facas e tamisado (tamis nº 20 com 20 Mesh, 850 µm). Posteriormente, o material vegetal (50 g) foi submetido à extração por percolação empregando a relação droga vegetal / solvente extrator de 1:150, utilizando 500 mL de solução hidroetanólica 70% ou 50% a cada 24 horas. O extrato foi coletado a cada período, durante 6 dias, com fluxo de 5,3 mL/min, obtendo-se um volume final de extrato de 3 litros. Em seguida, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório (pressão de 175 mbar, temperatura do banho de 45 °C) para eliminação do etanol. O extrato aquoso resultante foi seco por *spray dryer*.

#### **4.15.2 Secagem dos extratos por *spray dryer***

As soluções extrativas obtidas no item 4.15.1 foram secas em *spray dryer*. Inicialmente foram empregadas as condições propostas por Chaves e colaboradores (2009) para secagem de extratos vegetais, a saber, temperatura de 140 °C, fluxo do ar secagem de 38 m<sup>3</sup>/h e fluxo de passagem da solução para a secagem de 4,5 mL/min. A partir desses parâmetros, alguns ajustes foram realizados para definir a condição apropriada para a matriz em estudo. Após os testes iniciais, as seguintes condições de secagem foram padronizadas: temperatura de 160 °C, aspiração a 38 m<sup>3</sup>/h e bombeamento a 6 mL/min. Ainda, foram definidas a temperatura do ar de entrada de 160° e a temperatura do ar de saída de 102°. Durante o procedimento de atomização, a mistura foi mantida em agitação constante em agitador com barra magnética.

##### **4.15.2.1 Adição de adjuvante**

Visando melhorar a homogeneidade do pó obtido, aumentar a recuperação do pó após a secagem, e a obtenção do pó com propriedades farmacotécnicas adequadas, avaliou-se a adição de adjuvantes às soluções extrativas antes do processo de secagem.

Foram adicionadas às soluções extrativas hidroetanólicas alíquotas de Tween 80, conforme Pires & Moura (2017), nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 3% m/m ou dióxido de silício coloidal (Aerosil®) (VASCONCELOS et al., 2005; LINDEN et al., 2000), para concentrações finais de 12,5, 25 e 35% m/m, em triplicata. As soluções extrativas foram, então, submetidas ao processo de secagem conforme descrito no

item anterior. Foram calculados o rendimento dos extratos secos obtidos para cada condição de secagem e os pós obtidos foram submetidos à caracterização do perfil químico (item 4.8.2) e de parâmetros físico-químicos (item 4.15.2) para definição da melhor condição de secagem para produção da form.

#### **4.15.3 Caracterização dos pós obtidos por *spray dryer***

Os extratos secos com e sem a adição de Aerosil® (item 4.15.2.1) foram caracterizados para avaliar parâmetros farmacotécnicos como fluidez do pó, solubilidade em água, homogeneidade do tamanho de partícula, teor de água e rendimento final para definir a concentração do adjuvante a ser utilizada para obtenção do pó. As caracterizações foram realizadas segundo Chaves e colaboradores (2009), Nik e colaboradores (2019) e Pudziuvelyte e colaboradores (2020), e são descritas na sequência.

##### **4.15.3.1 Solubilidade em água**

A solubilidade em água do extrato seco obtido foi determinada segundo Cortés-Rojas, Souza, Oliveira (2015) com algumas modificações. Resumidamente, 20 mg de pó foram pesados exatamente e 2 mL de água foram adicionados à amostra e misturados por 10 min usando um agitador magnético a 500 rpm. As amostras foram centrifugadas por 5 min a  $8400 \times g$  e uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi transferida para uma placa de Petri previamente tarada. Após evaporação da água durante 5 h em estufa a 105 °C, a massa do resíduo sólido foi determinada. Os resultados foram expressos em gramas de pó solúvel por 100 g de água ( $n = 3$ ).

##### **4.15.3.2 Análise do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico da luz (DLS)**

O diâmetro e a distribuição do tamanho de partícula dos pós obtidos foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando o equipamento Zeta Sizer nano series ZS90 (Malvern). As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente (25 °C), utilizando um ângulo de incidência do laser de 90°. O diâmetro e a distribuição do tamanho das partículas foram determinados por DLS associado à mobilidade eletroforética utilizando o mesmo equipamento. Para a realização de ambas as medidas, os extratos secos foram ressuspensos em água

ultrapura (10 mg/mL). As medidas foram feitas em triplicata e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.15.3.3 Análise qualitativa por UPLC-DAD**

A comparação do perfil cromatográfico qualitativo dos extratos secos obtidos foi realizada por UPLC-DAD, conforme método validado descrito no item 4.8.2. Foi realizada uma comparação entre os tempos de retenção e a área dos picos referentes aos marcadores químicos definidos (item 4.5.2), obtidos após a adição dos adjuvantes.

#### **4.15.3.4 Análise morfológica dos pós por MEV**

A avaliação da morfologia e tamanho das partículas do extrato seco obtido com diferentes proporções de dióxido de silício coloidal foi realizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando equipamento Jeol modelo JSM – 840A (Centro de Microscopia, UFMG). Cerca de 1 mg do pó foi dispersa em água, seguida da deposição de uma gota em placa metalizada. Após secagem, a amostra foi fixada com ouro por aproximadamente 5 minutos e, em seguida, analisada por microscopia eletrônica de varredura.

#### **4.15.3.5 Determinação da umidade por Karl Fischer**

A análise de umidade foi realizada pelo técnico administrativo Dr. Mateus Araújo Castro e Souza do Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG usando um titulador Karl Fischer 785 Titrino Plus Metrohm empregando 100 mg de pó ( $n = 3$ ). Inicialmente, os frascos de vidro para pesagem dos pós foram mantidos em estufa à 105 °C por 2 horas, e reservados em dessecador até temperatura ambiente antes da pesagem, para evitar a adesão de umidade do ambiente.

A determinação de umidade pelo método volumétrico, baseou-se na determinação de água com reagente de “Karl Fischer” segundo descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019). O teor de umidade foi estimado tomando-se por base a quantidade de reagente (com seu respectivo fator de correção) necessária para titular a água presente na alíquota da amostra ensaiada.

Para a padronização do reagente Karl Fischer (KF), adicionou-se, ao frasco de titulação, volume de metanol suficiente para cobrir o eletrodo. Titulou-se a umidade residual do metanol adicionando-se volume suficiente do reagente de KF para

consumir todo o resíduo de água presente no solvente. Com o auxílio de uma seringa de vidro, foram adicionadas duas gotas de água ao frasco de reação. A massa de água utilizada foi calculada pela diferença entre a massa inicial da seringa, cheia com água, e a massa após a dispensação das duas gotas no frasco de titulação. A agitação magnética permaneceu ligada durante toda a análise. Em seguida, a titulação da água acrescentada foi iniciada. Reagente de KF foi adicionado até que fosse atingido o ponto final eletrométrico. A determinação do título do reagente foi realizada em quadruplicata. O título do reagente foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$T = P/V$$

Onde:

T = título do reagente de KF (mg de água/mL de reagente)

P = massa de água (em mg)

V = volume, em mL, do reagente de KF

Adicionou-se, ao frasco de titulação, a amostra contida em frasco de vidro do tipo *vial* e homogeneizou-se por 30 segundos. A massa da amostra empregada na análise foi calculada pela diferença entre a massa inicial do frasco contendo a amostra e o frasco vazio. A agitação magnética permaneceu ligada durante toda a análise. Em seguida, a titulação foi iniciada. Reagente de KF foi adicionado até que fosse atingido o ponto final eletrométrico. A análise foi realizada em triplicata. O teor de água nas amostras foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de água (\%)} = (V \times T \times 100) / m$$

Onde:

V = volume, em mL, do reagente de KF

T = título do reagente de KF determinado na etapa de padronização

m = massa da amostra, em mg

#### 4.15.3.6 Fluidez do pó

A propriedade de fluxo dos extratos secos obtidos foi determinada pelas densidades aparente e compactada, cálculos de propriedades de fluxo pela Razão de Hausner (HR), Índice de Carr (CI) e ângulo de repouso, cujos métodos são descritos na sequência.

#### 4.15.3.6.1 Determinação da densidade aparente e compactada

As densidades aparentes ( $D_a$ ) e compactada ( $D_c$ ) dos pós obtidos foram determinadas usando o densímetro, de acordo com o método descrito pela *United States Pharmacopeia* (USP) 31 (2020), com algumas modificações. Porções de 1 g dos extratos secos foram pesados em uma proveta de 10 mL e compactados manualmente por ação mecânica repetida 500 vezes e, em seguida, por 1000 vezes sendo então calculados os valores de densidade, conforme equações descritas abaixo:

$$D_a = \frac{M}{V_o}$$

$$D_c = \frac{M}{V_f}$$

Onde:

$M$  = massa do pó (g)

$V_o$  = volume inicial medido na proveta

$V_f$  = volume final medido na proveta

$D_a$  = densidade aparente

$D_c$  = densidade compactada

Os valores de densidade aparente e compactada obtidos foram usados para calcular o índice de Carr e a razão de Hausner, segundo as equações descritas abaixo, conforme a USP 31 (2020):

$$\text{Índice de Carr (\%)} = 100 \times [(D_a - D_c) / D_c]$$

$$\text{Razão de Hausner} = D_a / D_c$$

Onde:

$D_a$  = densidade aparente

$D_c$  = densidade compactada

#### 4.15.3.6.2 Determinação do ângulo de repouso

Para determinação da fluidez dos pós obtidos foi determinado o ângulo de repouso, conforme metodologia descrita na USP 31 (2020) e realizado por Ermis e Karasu (2020). Nessa determinação, foi utilizado um funil de vidro fixado firmemente em uma argola posicionada em um suporte. O funil foi posicionado a uma altura de 10

cm sobre a superfície plana da bancada. Uma porção de 5 gramas da amostra foi despejada no funil, em triplicata, e deixada fluir por gravidade para formar uma pilha na superfície do balcão. O ângulo de repouso foi então calculado dividindo-se a altura (h) pelo raio (r), encontrando-se o valor de inclinação e posteriormente calculando a tangente inversa, conforme indicado na equação:

$$\tan(\alpha) = h/r$$

Onde:

$\alpha$ : ângulo de repouso

h: altura

r: raio

O comportamento dos fluxos dos pós obtidos foi avaliado com base nos dados fornecidos na **Tabela 11** (ERMIS; KARASU, 2020 e USP31, 2020).

**Tabela 11.** Propriedades de fluxo e relação com ângulo de repouso e razão de Hausner

| Razão de Hausner | Ângulo de repouso (°) | Propriedade do fluxo |
|------------------|-----------------------|----------------------|
| 1,00-1,11        | <25                   | Excelente            |
| 1,12-1,18        | 25-30                 | Bom                  |
| 1,19-1,25        | 30-38                 | Satisfatório         |
| 1,26-1,34        | 38-45                 | Ruim                 |
| 1,35-1,45        | 45-55                 | Muito ruim           |
| 1,46-1,59        | >55                   | Coeso                |

**Fonte:** ERMIS; KARASU, 2020.

#### 4.15.4 Adição de excipiente para otimização do pó obtido

Após a avaliação das propriedades de fluxo do pó dos extratos secos obtidos, de acordo com a USP 31, avaliou-se se os parâmetros estavam adequados ou não para posterior encapsulação do extrato para administração por via oral. Procedeu-se à adição de celulose microcristalina 100 de 1 a 10% m/m nos extratos secos que não apresentaram propriedades farmacotécnicas adequadas para encapsulação. Avaliou-se a densidade do extrato seco obtido após homogeneização da celulose microcristalina por diluição geométrica (GUARJADO-FLORES et al., 2015).

#### 4.16 Obtenção da formulação em escala de bancada

Como o extrato seco EtOH 50% contendo 25% m/m de Aerosil® apresentou maior rendimento, boa solubilidade do pó em água e melhor fluidez do pó, esse extrato foi selecionado para a produção da formulação. A formulação em escala e bancada foi produzido com 900 g da droga vegetal DV2 de *E. macrophyllus*. A droga vegetal foi pulverizada e tamisada (850 µm) e posteriormente extraída por percolação com solução hidroetanólica a 50% na proporção de 1:150 mL (droga vegetal / solvente extrator). A percolação foi realizada por 6 dias consecutivos, com o intervalo de 24 horas entre as coletas das soluções extrativas com fluxo de coleta de 5,3 mL/min, conforme padronizado no item 4.15.1. Após o término da extração, os extratos foram reunidos e foi adicionado massa de Aerosil® equivalente a concentração final de 25% m/m Aerosil® no extrato seco. O etanol presente na solução extrativa foi evaporado em evaporador rotatório e a água restante foi seca em *spray dryer* conforme descrito no item 4.15.2 e condições finais descritas na **Tabela 12**. O rendimento de secagem foi calculado após a secagem do extrato em *spray dryer* e o extrato seco obtido foi armazenado em dessecador.

**Tabela 12.** Condições padronizadas para secagem do extrato por *spray dryer* para obtenção do lote do extrato padronizado.

| Condição experimental           | Valor |
|---------------------------------|-------|
| Fluxo do ar m <sup>3</sup> /min | 38    |
| Temperatura do ar de entrada °C | 160   |
| Temperatura do ar de saída ° C  | 102   |
| Fluxo de secagem mL/min         | 6     |

Posteriormente, foi adicionado ao lote do extrato seco 10% m/m de celulose microcristalina (100) pelo método de diluição geométrica, conforme Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019). Procedeu-se à caracterização da formulação obtida pela quantificação dos teores de marcadores químicos (item 4.9), tamanho de partículas por DLS (item 4.15.2.2), morfologia por MEV (item 4.15.2.4), teor de água por Karl Fischer (item 4.15.2.5) e fluidez do pó (item 4.15.2.6).

#### 4.17 Análises estatísticas

Os resultados de massa e rendimento obtidos nos ensaios extrativos (item 4.5) bem como os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados por ANOVA *one-way* (comparação entre grupos diferentes) seguido de pós-teste de Newman-Keuls e Dunnet's usando o software *Prism GraphPad* 6.0 (GraphPad

Software Inc., EUA). Os resultados foram expressos com média  $\pm$  DP e considerados significativamente distintos quando  $p < 0,05$ .

Os resultados dos ensaios *in vitro* foram avaliados por ANOVA *one-way* (comparação entre grupos diferentes) e *two-way* (análises dos dados obtidos dentro de um mesmo grupo) seguida de pós-teste de Tukey e Dunnet's para comparações múltiplas empregando o software GraphPad Prism, versão 6.0. Os resultados foram expressos com média  $\pm$  DP e considerados significativamente distintos quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizadas análises com extratos preparados com diferentes drogas vegetais de *E. macrophyllus* visando identificar variações qualitativas e quantitativas na composição química e na resposta biológica *in vitro* induzida pelos extratos sobre a liberação de TNF (item 4.10) e atividade antioxidante (item 4.11). Adicionalmente, realizou-se a caracterização genética molecular de *E. macrophyllus* visando obter subsídios para diferenciá-la de outras espécies de *Echinodorus*, principalmente *Echinodorus grandiflorus*. Especialmente duas espécies medicinais do gênero *Echinodorus* são mais conhecidas popularmente no Brasil como chapéu-de-couro – *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*. Ambas possuem uso tradicional como anti-inflamatório e antiartrítico (LORENZI & MATOS, 2002) e apresentam características botânicas e composições químicas semelhantes (LEITE et al., 2007).

Estudos anteriores indicam dificuldades na diferenciação de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* (MARQUES et al., 2017); portanto, realizamos a análise das drogas vegetais de *E. macrophyllus* obtidas de fontes distintas (DV1, DV2 e DVMus) e incluímos uma amostra de *E. grandiflorus* (EG) para fins de comparação. A fim de evidenciar semelhanças e diferenças entre as drogas vegetais, as análises foram realizadas com os extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50%, obtidos para cada uma delas, conforme descrito na sequência.

### 5.1 Caracterização química dos extratos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

Os extratos (EtOH 96° GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50%) foram obtidos por sonicação (item 4.5.1) das drogas vegetais e empregados para avaliação da variabilidade química intraespecífica, empregando diferentes lotes da espécie *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus), e interespecífica, empregando a espécie *E.*

*grandiflorus* (EG). Os extratos obtidos com EtOH 70% e EtOH 50% apresentaram maior rendimento extrativo, aproximadamente de 50% m/m (**Tabela 3**).

A RDC nº14 da ANVISA define marcador químico como componente ou classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2013). A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) apresenta definição semelhante, na qual marcadores químicos são constituintes quimicamente definidos ou grupos de constituintes de um medicamento à base de plantas que são de interesse para fins de controle de qualidade, independentemente de possuírem alguma atividade terapêutica. Idealmente, os marcadores químicos devem ser componentes que contribuem para os efeitos terapêuticos de um fitoterápico (LI et al., 2008).

Para definição dos marcadores químicos de *E. macrophyllus*, foi realizada a caracterização química dos diferentes extratos obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS em perfil exploratório (item 4.5). A identificação dos constituintes químicos foi realizada inicialmente nos extratos EtOH 70%, devido a maior complexidade do perfil cromatográfico em comparação com os demais extratos obtidos. A análise foi realizada empregando as substâncias de referência ácidos *cis*- (**16**) e *trans*-aconítico (**17**), homoorientina (**18**), swertisina (**19**) e ácido chicórico (**20**) nas condições cromatográficas estabelecidas e comparação de seus tempos de retenção e máximos de absorção no UV registrados por DAD com os picos registrados nos cromatogramas (**Figura 7 e 8**). A identidade dos marcadores químicos foi posteriormente confirmada por análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS (item 4.5), no modo de ionização negativo. Estas análises possibilitaram definir cinco marcadores químicos para *E. macrophyllus* (**Tabela 13 e Figura 8**).

Dois outros constituintes dos extratos foram identificados putativamente pela análise por UPLC-DAD-ESI-MS/MS e incluídos como marcadores químicos: ácido cafeoil-feruloil-tartárico (**21**) e ácido diferuloil-tartárico (**22**). A substância **21** produziu o ânion desprotonado  $[M-H]^-$  em  $m/z$  487 Da no modo de ionização negativo, juntamente com íons produto em  $m/z$  149 Da  $[M - 338]^-$ , atribuído ao ácido tartárico, em  $m/z$  193 Da  $[M - 294]^-$ , creditado à unidade feruloil, e em  $m/z$  311 Da  $[M - 176]^-$  resultante da perda da unidade cafeoil (**Anexo 1**). A identificação desta substância por UPLC-DAD-ESI-MS/MS em fração do extrato etanólico de *E. macrophyllus* foi descrita por Silva e colaboradores (2022), sendo relatada a presença do pico do íon

desprotonado  $[M-H]^-$  em  $m/z$  487 Da. Até o momento, não foi relatado o isolamento dessa substância da espécie.

Por sua vez, o composto **22** produziu o íon desprotonado em  $m/z$  501  $[M-H]^-$  no modo de ionização negativo, que, juntamente com os íons produtos observados em  $m/z$  149  $[M - 352]^-$ , atribuído ao ácido tartárico, e em  $m/z$  325  $[M - 176]^-$ , creditado à perda de uma das unidades feruloil, permitiu inferir tratar-se de um ácido diferuloil-tartárico (**Anexo 1**). Até o momento, a identificação ou isolamento desta substância não foi relatada para *E. macrophyllus*. Cabe destacar, no entanto, o isolamento de diversos derivados do ácido hidroxicinâmico a partir de *E. grandiflorus*, tais como derivados do ácido cafeoil-feruloil-tartárico e derivados do ácido cinamoiltartárico (SCHINITZLER et al., 2007). As análises realizadas por UPLC-DAD-ESI-MS/MS também possibilitaram identificar outros constituintes como ácido tartárico (**23**), swertiajaponina (**24**) e isovitexina (**25**), com a produção dos íons moleculares em  $m/z$  325  $[M-H]^-$ ,  $m/z$  461  $[M-H]^-$  e  $m/z$  431  $[M-H]^-$ , respectivamente, no modo de ionização negativo.

Os ácidos *cis*- e *trans*-aconítico (TR: 1,19 e 1,56 minutos, respectivamente) e chicórico (Tr = 3,9 min) foram identificados anteriormente em *E. grandiflorus* (GARCIA et al., 2016), no entanto a presença dessas substâncias é relatada para *E. macrophyllus* pela primeira vez neste trabalho. Ainda, a orientina (Tr = 3,7) foi encontrada em ambas as espécies vegetais (GOSENZA, 2010). Esses dados indicam a dificuldade de diferenciação entre as espécies *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* baseada apenas na análise de marcadores químicos. Dias e colaboradores (2013), ao analisarem diferentes drogas vegetais comercializadas como *E. grandiflorus*, ressaltaram a necessidade de estudos químicos e farmacológicos adicionais para estabelecer marcadores ativos para espécies de *Echinodorus* já que identificaram uma variabilidade química entre os espécimes de *E. grandiflorus*, afirmando a dificuldade na padronização química da espécie.

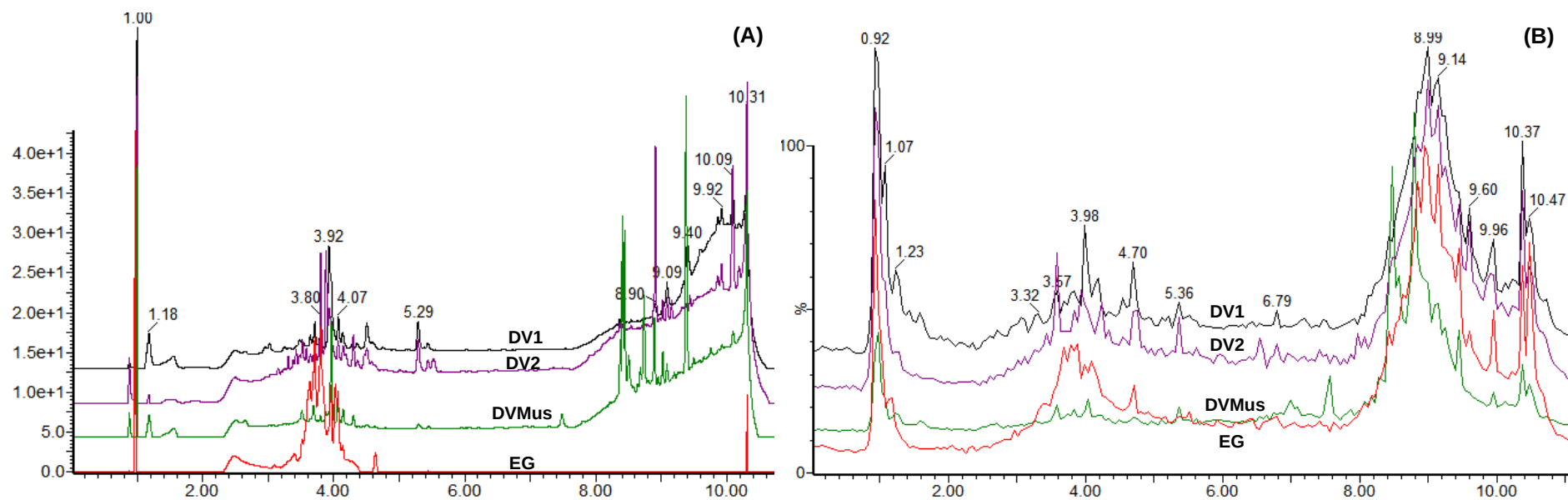
Dentre os compostos identificados nos extratos de *E. macrophyllus*, homoorientina (GONSENZA, 2010), vitexina, isovitexina (TANUS-RANGEL et al., 2010), swertisina (FERNANDES et al., 2022) e ácido cafeoil-feruloil-tartárico (SILVA et al. 2022) foram previamente relatados, enquanto a ocorrência de todos os outros constituintes é aqui descrita pela primeira vez. Por outro lado, todos eles já foram previamente relatados como constituintes de *E. grandiflorus* (SCHNITZLER, 2005;

SCHNITZLER et al., 2007; GARCIA et al., 2016; SANTOS et al., 2017), corroborando assim a similaridade na composição química dessas espécies.

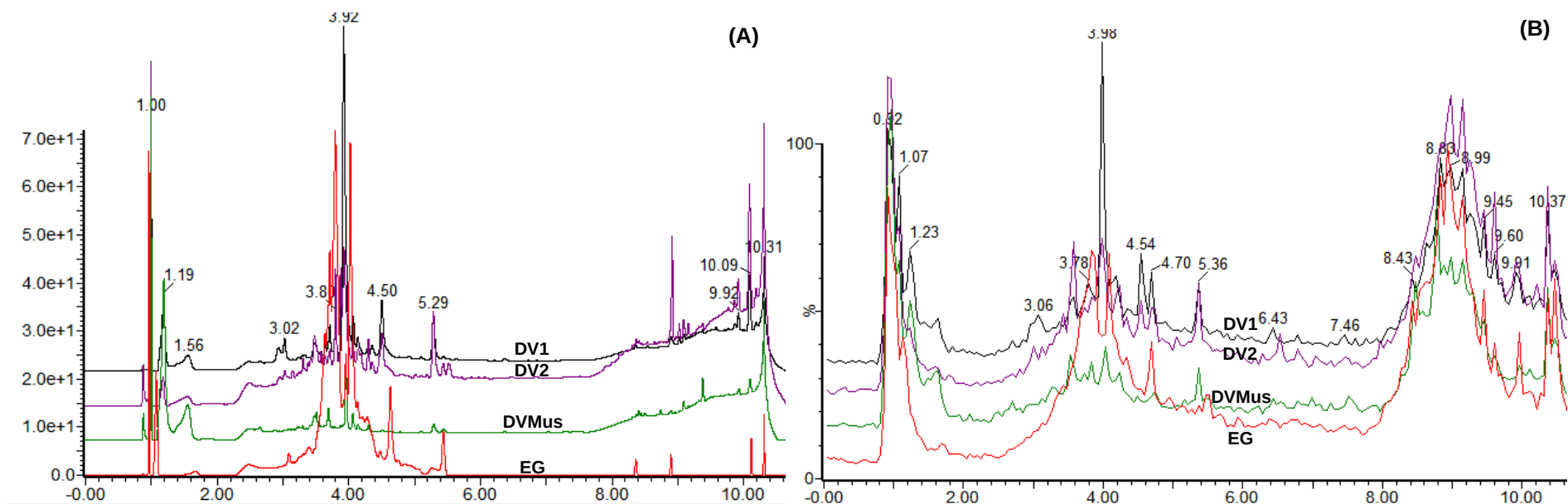
De maneira geral, os extratos analisados apresentaram picos comuns a todos, com os mesmos tempos de retenção, tanto nos cromatogramas registrados no DAD ou no MS. No entanto, a intensidade dos picos variou de acordo com a proporção de etanol utilizado na obtenção dos extratos. Portanto, as mesmas substâncias **(16-22)** foram detectadas e identificadas nos extratos em concentrações diferentes. Os perfis cromatográficos obtidos com detecção no DAD **(Figura 7A)** e no modo de ionização negativo do espectrômetro de massas **(Figura 7B)** indicam semelhanças entre o extrato de *E. grandiflorus* e aqueles registrados para as drogas vegetais de *E. macrophyllus* **(Figura 7)**. Desta forma, as análises qualitativas realizadas não possibilitaram diferenciar as amostras de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* avaliadas.

**Figura 7.** Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS para os extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e de *E. grandiflorus* (EG). (A) Detecção por DAD. (B) Detecção por ESI-MS no modo scan.

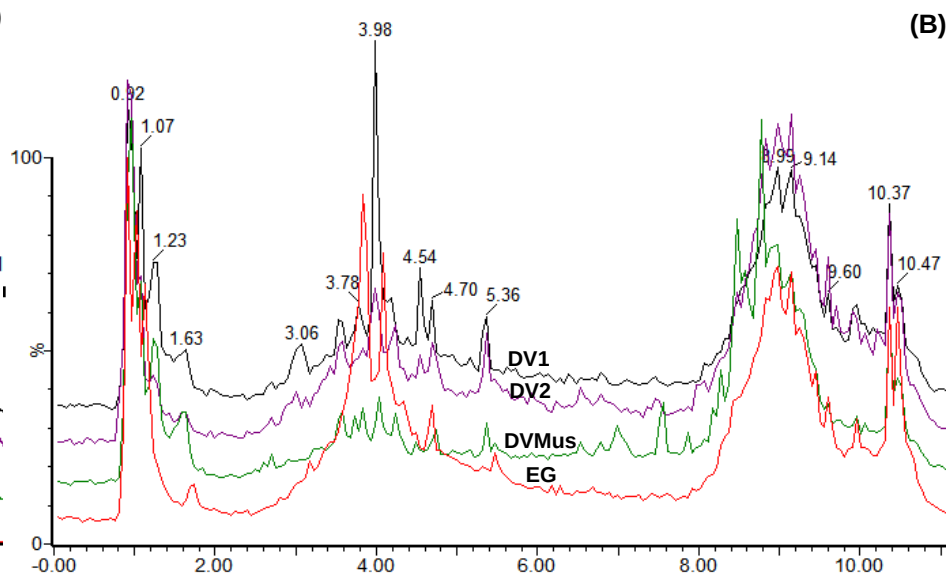
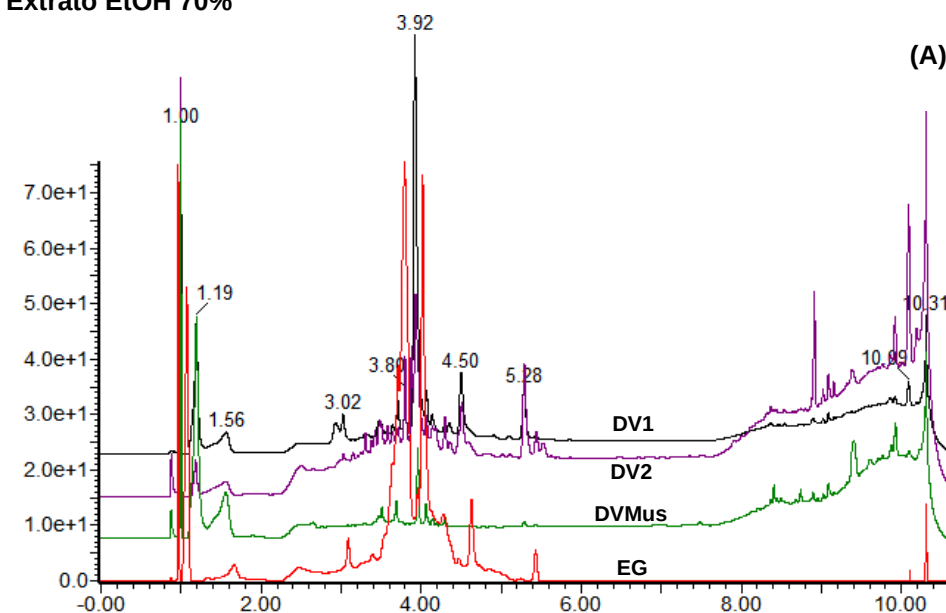
**Extrato EtOH 96°GL**



**Extrato EtOH 90%**



## Extrato EtOH 70%



## Extrato EtOH 50%

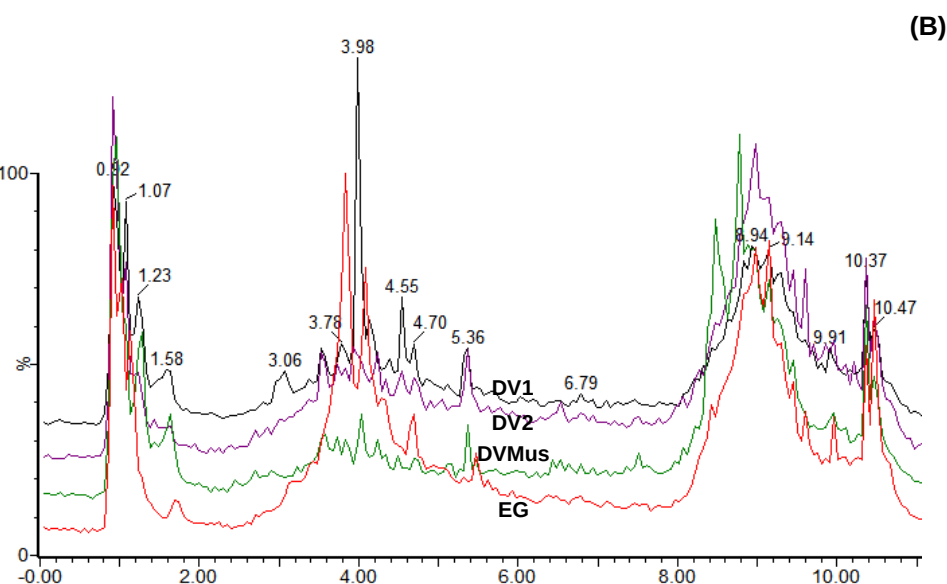
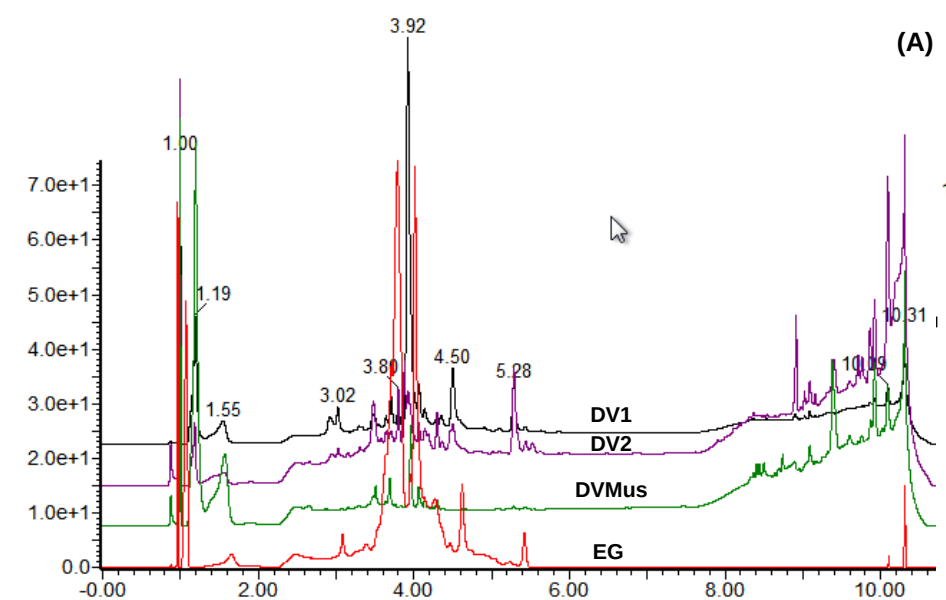


**Figura 8.** Picos correspondentes aos marcadores químicos identificados e caracterizados nos extratos EtOH 70% de folhas de *Echinodorus macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e de *Echinodorus grandiflorus* a partir de análises por UPLC-DAD-ESI-MS. Pico 1 e 2: ácidos *cis*- e *trans*-aconítico. Pico 3: ácido fertárico. Pico 4: homoorientina. Pico 5: swertisina. Pico 6: isovitexina. Pico 7: swertiajaponina. Pico 8: ácido chicório. Pico 9: ácido cafeoil-feruloil-tartárico. Pico 10: ácido diferuloil-tartárico. (A) Cromatograma registrado no DAD; (B) cromatograma registrado no modo *scan* com ionização ESI-.

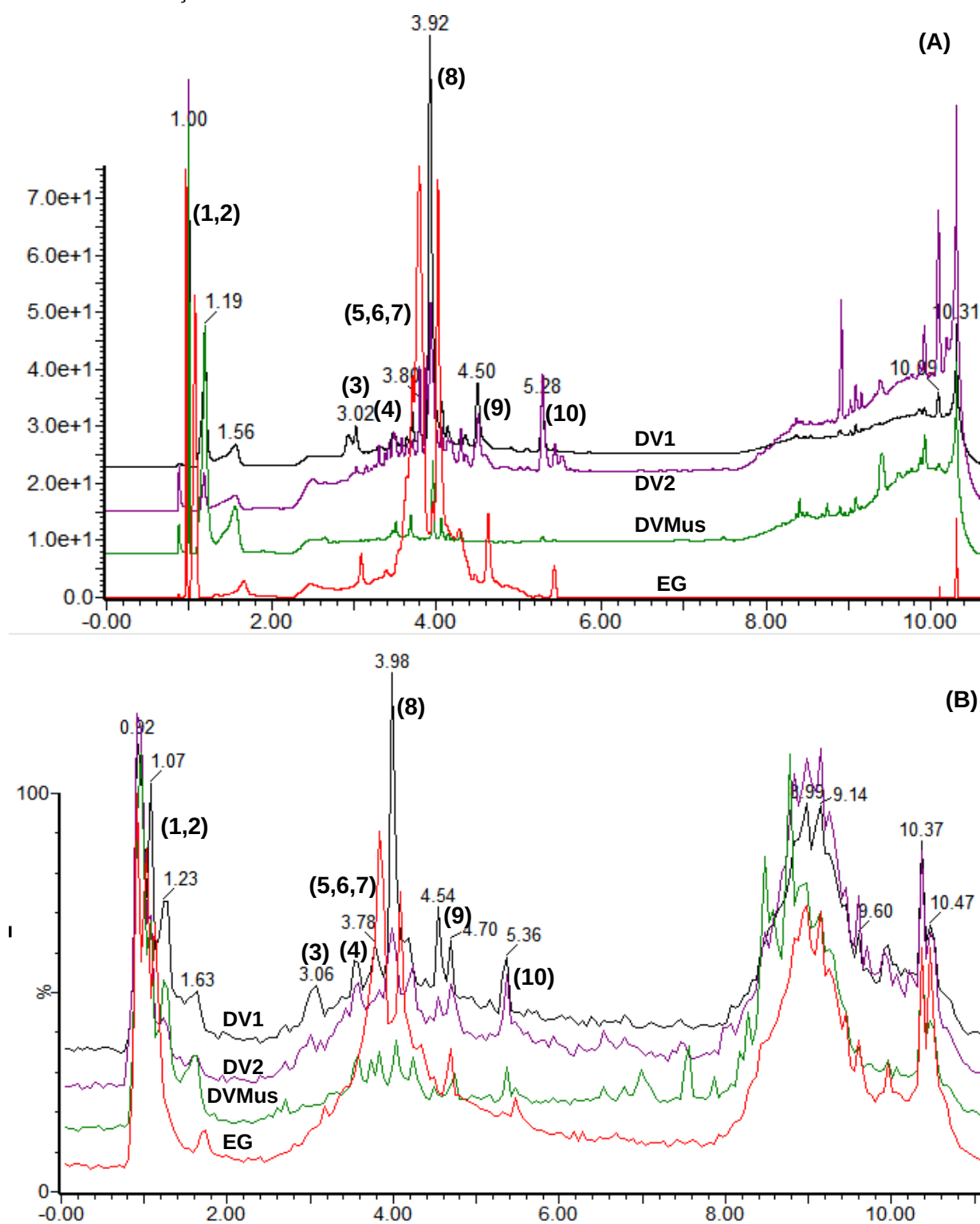
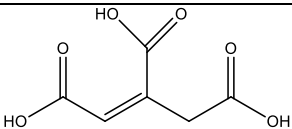
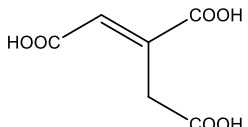
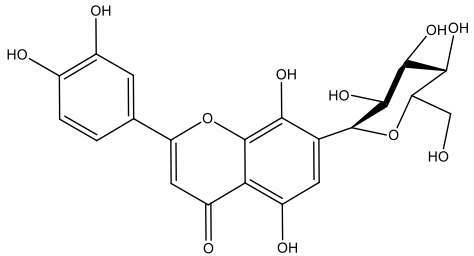
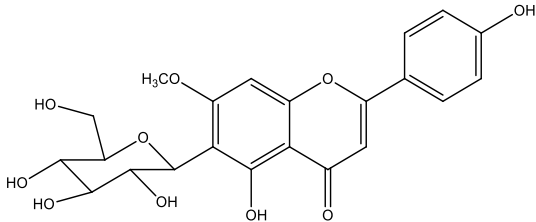
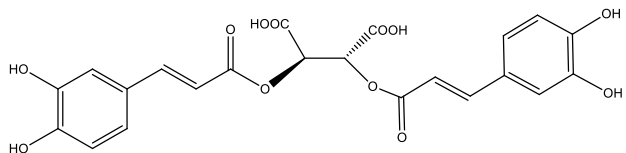
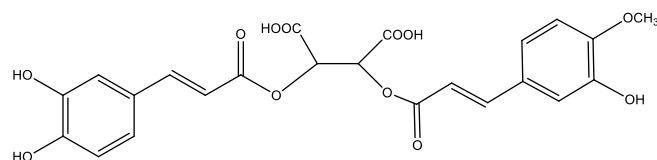


**Tabela 13.** Constituintes caracterizados nos extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de folhas de *Echinodorus macrophyllus*, a partir de análises por UPLC-DAD-ESI-MS.

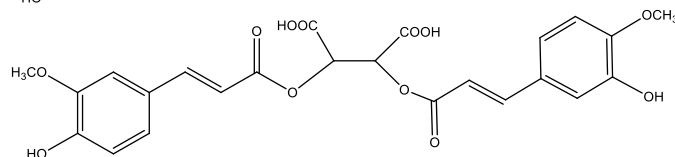
| Substância                         | Estrutura química                                                                    | Tempo de retenção (min) | $\lambda_{\max}$ (nm) | $m/z$ (ESI <sup>-</sup> ) | Massa molar (g/mol) |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| Ácido <i>cis</i> -aconítico (16)   |    | 1,2                     | 215                   | 173                       | 174,11              |
| Ácido <i>trans</i> -aconítico (17) |    | 1,6                     | 215                   | 173                       | 174,11              |
| Homoorientina (18)                 |    | 3,7                     | 216, 270, 348         | 447                       | 448,4               |
| Swertisina (19)                    |   | 3,8                     | 218, 270, 333         | 445                       | 446,4               |
| Ácido chicórico (20)               |  | 3,9                     | 218, 329              | 473                       | 474,4               |

Ácido cafeoil-feruloil-tartárico  
(21)



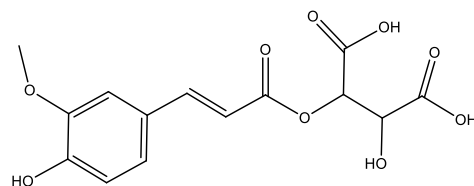
4,6      219, 328      487      488,12

Ácido di-feruloil-tartárico  
(22)



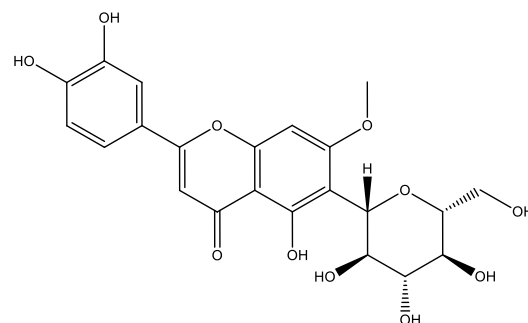
5,3      218, 328      501      502,4

Ácido fertárico  
(23)



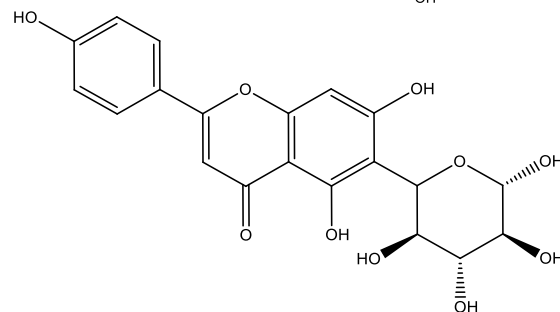
3,0      219, 328      325      326,25

Swertiajaponina  
(24)



3,7      218, 270,  
333      461      462,4

Isovitexina  
(25)



3,6      218, 270,  
333      431      432,4

Em um estudo para definir marcadores químicos de espécies de *Echinodorus* foram analisados onze extratos de *E. grandiflorus* e *E. scaber*, preparados com materiais vegetais coletados de locais diferentes, visando identificar o marcador químico responsável pelo efeito antinociceptivo (STRADA et al., 2017). O perfil químico dos extratos obtidos por UPLC-DAD foi comparado e os componentes vitexina, isovitexina, isoorientina e vitexina-2-O-ramnosídeo foram identificados. A isovitexina foi encontrada em todas as amostras analisadas, em diferentes concentrações, e foi definida como marcador ativo relacionado à atividade antinociceptiva de *E. scaber* e *E. grandiflorus*. Cabe ressaltar, que a escolha da isovitexina como marcador foi realizada apenas com o detector UV-DAD, que apresenta limitações como dificuldade de detecção de alguns constituintes dos extratos, ou a não detecção de substâncias devido ausência de cromóforos (PATEL et al., 2010).

No presente trabalho foi possível determinar sete marcadores químicos (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, ácido chicórico, swertisina, ácido cafeoil-feruloil-tartárico e diferuloil-tartárico), que foram quantificados, conforme descrito na sequência, visando a comparação entre as duas espécies vegetais. A isovitexina foi identificada por UPLC-DAD-ESI-MS/MS neste trabalho; no entanto, não foi utilizada como marcador devido à baixa concentração nas amostras, um fator limitante para a quantificação nos extratos obtidos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*.

## 5.2 Quantificação dos marcadores químicos por UPLC-DAD

Visando obter dados sobre a composição química quantitativa dos extratos produzidos, na sequência do trabalho realizou-se a quantificação por UPLC-DAD dos marcadores químicos definidos, ácidos *cis*- (**16**) e *trans*-aconítico (**17**), homoorientina (**18**), swertisina (**19**), ácido chicórico (**20**), ácido cafeoil-feruloil-tartárico (**21**) e diferuloil-tartárico (**22**), nos extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% das diferentes drogas vegetais DV1, DV2, DVMus e EG. Para tanto, um método analítico foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de todos os marcadores.

### 5.2.1 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método analítico para quantificação dos marcadores foi realizado com o extrato EtOH 70% de DV2. Inicialmente, os extratos e as soluções das SQR foram analisados no perfil exploratório (item 4.5.2). Conforme demonstrado na **Figuras 7 e 8**, os picos dos marcadores químicos no extrato EtOH 70% não

apresentam resolução adequada para quantificação. Além disso, cabe ressaltar a co-eluição e sobreposição de alguns picos que demonstraram a necessidade de ampliação do tempo de análise e alteração no gradiente de eluição. Na sequência, foram avaliadas as condições do método cromatográfico por HPLC proposto por Garcia e colaboradores (2016) para análise de extratos de *E. grandiflorus*. Foram realizadas modificações para adaptar o método para UPLC e algumas condições foram mantidas como a utilização de gradiente linear (6) e côncavo (7), o fluxo de 0,3 mL/min, temperatura de 40 °C e volume de injeção de 5 µL. Os cromatogramas foram registrados em 210 nm e no modo MaxPlot. Também foram obtidos cromatogramas em 220 nm para melhor visualização da separação dos ácidos *cis*- e *trans*- aconítico e em 350 nm para os flavonoides e derivados do ácido tartárico.

A primeira condição cromatográfica (**Tabela 4**) avaliada após a modificação do método de Garcia e colaboradores (2016) apresentou melhor separação dos picos, com redução da sobreposição e co-eluição de constituintes (**Figura 9A**). No entanto, não foi possível obter resolução satisfatória entre os picos 4 e 5 para quantificação. Assim, foram realizados ajustes na inclinação do gradiente e tempo de análise visando favorecer a separação adequada para quantificação. Portanto, modificações no tempo de análise e gradiente foram realizadas, obtendo-se o cromatograma da **Figura 9B**. Nessa condição (B), todos os picos de interesse apresentaram boa resolução, sendo promissora para a validação do método analítico. Conforme mencionado anteriormente, o desenvolvimento do método foi realizado com o extrato EtOH 70% e, para confirmar a aplicabilidade das condições desenvolvidas, todos os extratos foram analisados. Pode-se observar que o extrato EtOH 90% apresentou picos duplicados, sobrepostos e com baixa resolução (**Figura 10A**), indicativo do excesso de massa (2 mg/mL) ou deposição e acúmulo da massa na coluna, que pode estar relacionado com a quantidade de amostra injetada. Além disso, o extrato EtOH 90% apresenta maior quantidade de material graxo, favorecendo a deposição. Assim, foi reduzido o volume de injeção de 5 para 3 µL, e obteve-se um cromatograma com melhor resolução para o EtOH 90% (**Figura 10B**) bem como para o extrato EtOH 70% (**Figura 9C**). O alargamento de pico decorrente da massa de analito injetada já foi descrita por Stoll e colaboradores (2017) que demonstrou que o volume de injeção e a massa injetada estão diretamente proporcionais a efetividade da resolução dos picos. Portanto, foi mantido o volume de injeção de 3 µL para o desenvolvimento do método.

**Figura 9.** Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) nas condições cromatográficas A, B e C. Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.8.2 (Tabela 67). Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*-aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.

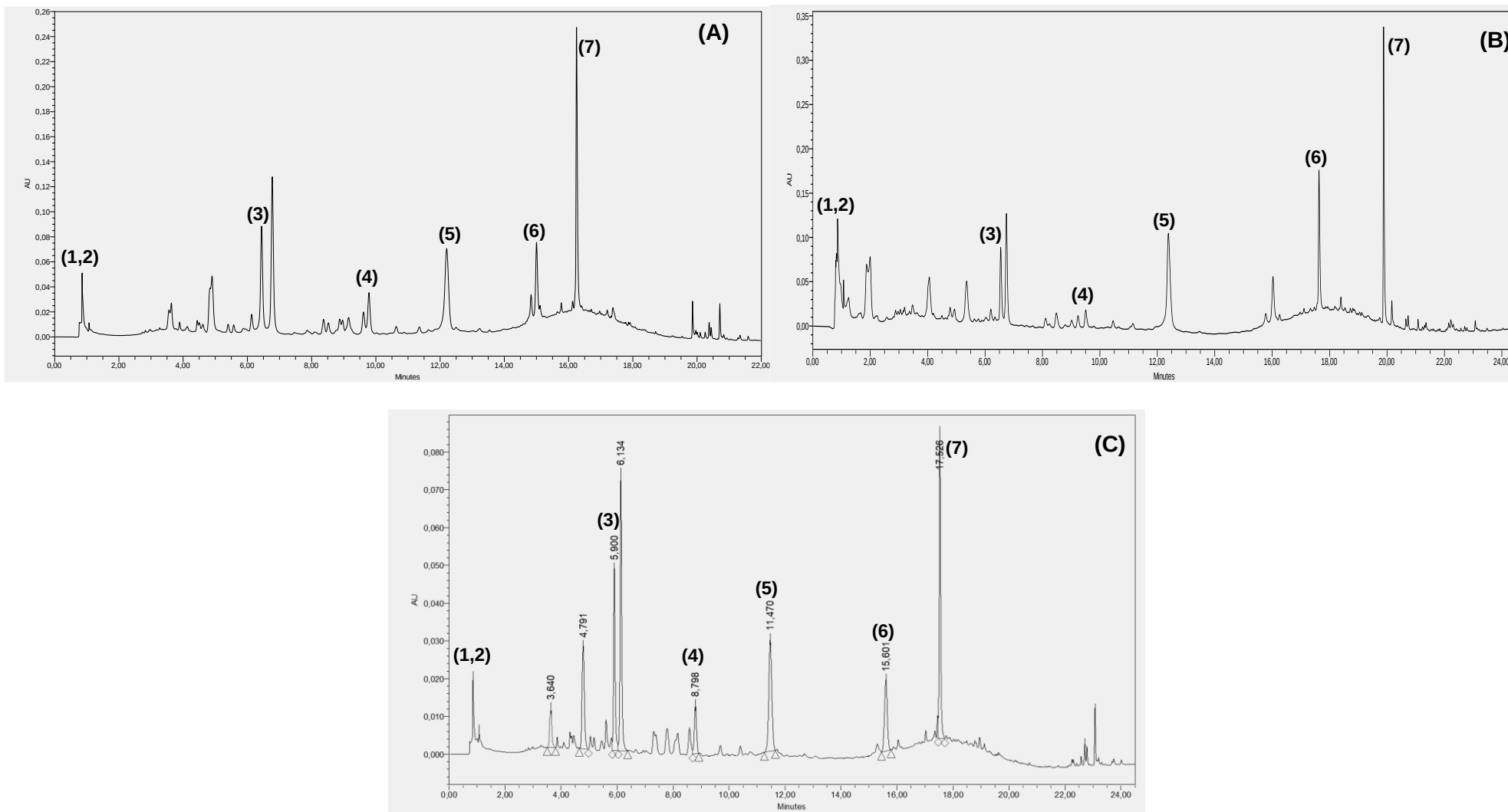
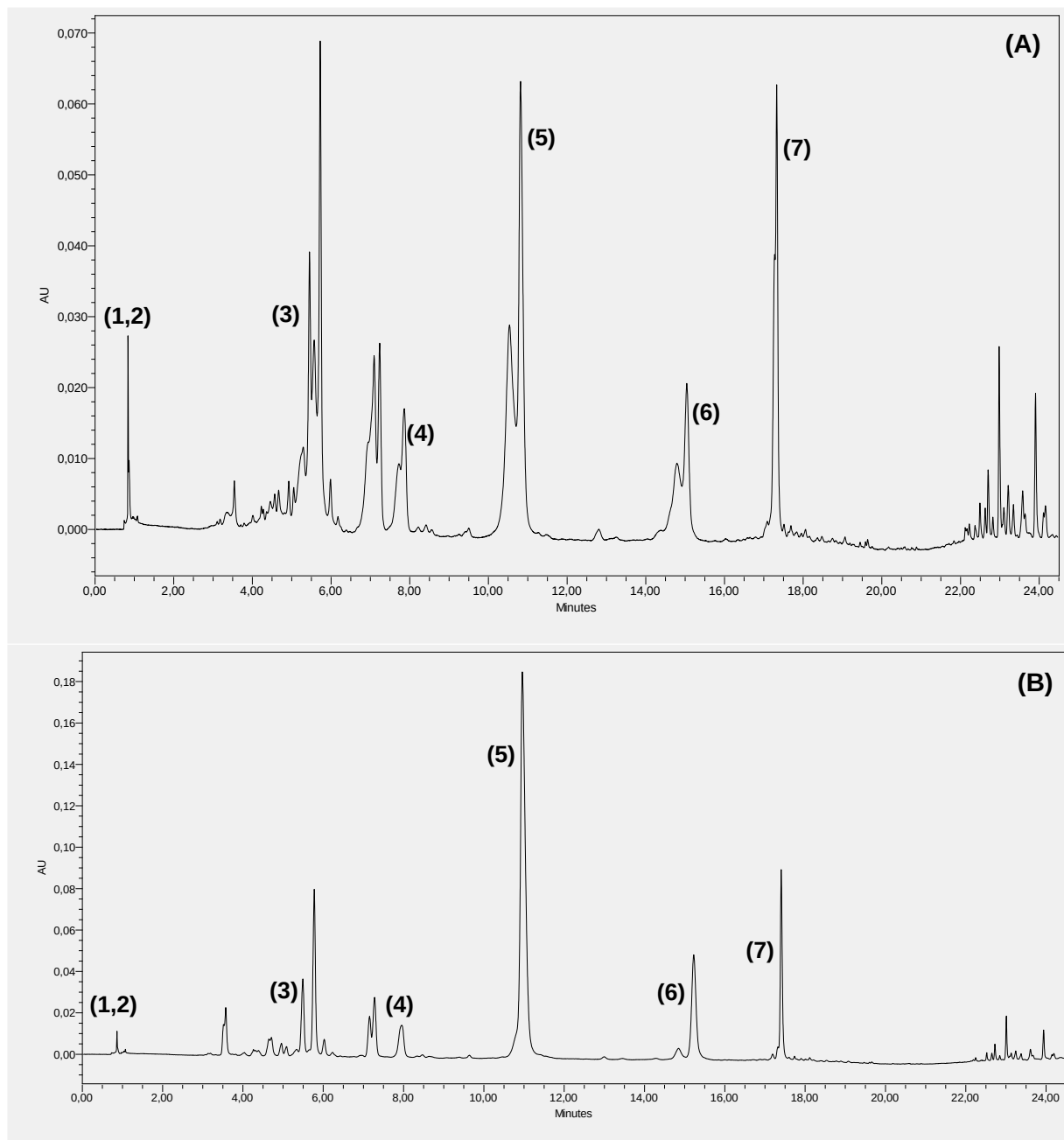


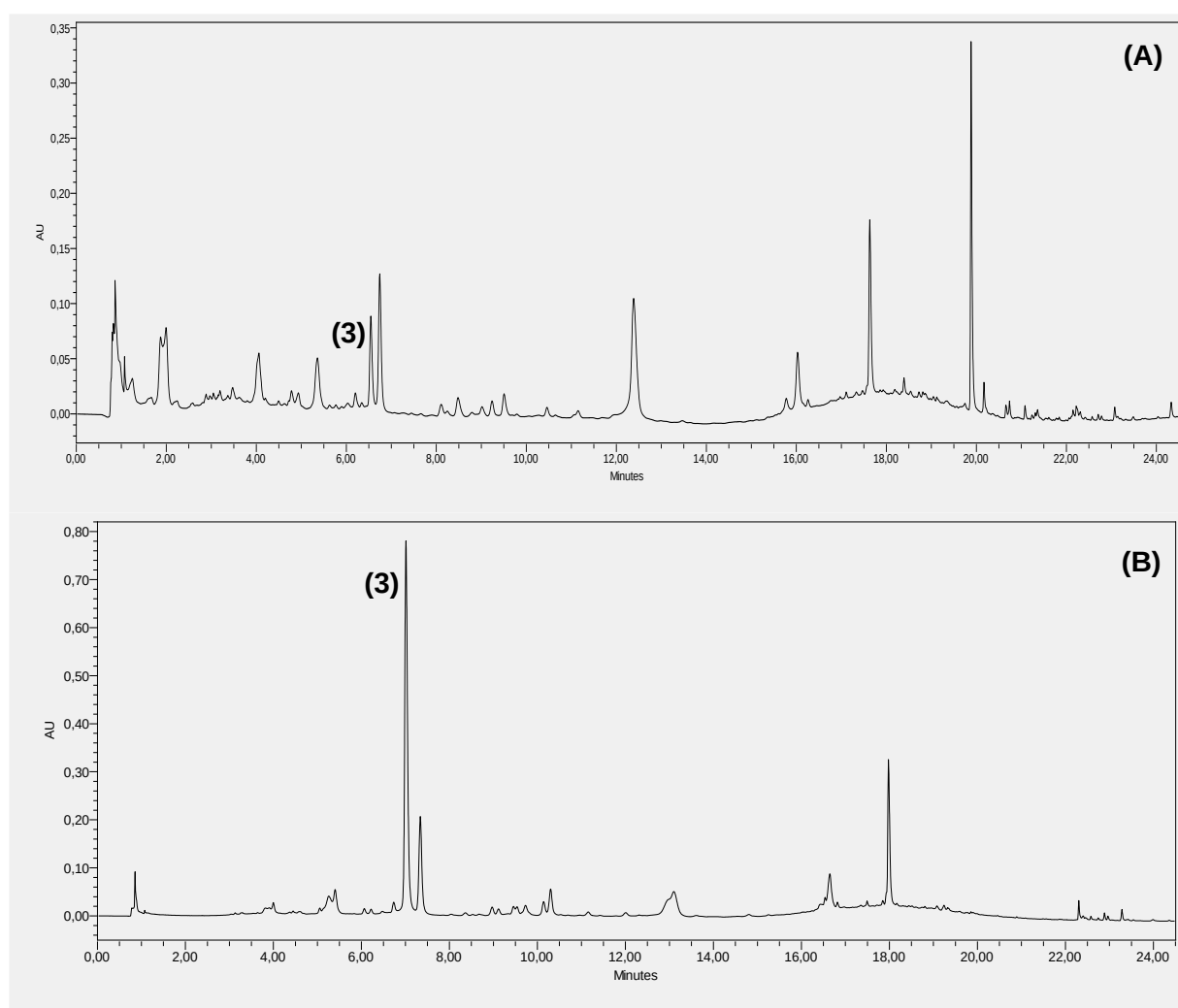
**Figura 10.** Cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, para o extrato EtOH 90% de *E. macrophyllum* (DV2) nas condições cromatográficas B (A) e C (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*-aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.



Durante o desenvolvimento do método analítico, os picos foram analisados conjuntamente com as soluções das SQR, pela comparação do tempo de retenção e absorção no UV. Liu e colaboradores (2022) identificaram por UPLC-FR no extrato de *Lophatherum gracile*, os isômeros homoorientina (Tr = 7,71 min) e orientina (Tr = 9,11), com diferentes tempos de retenção. Sendo assim, foi realizada a co-injeção do extrato

EtOH 70% com a solução de homoorientina para confirmar que o pico se tratava efetivamente da homoorientina ou o seu isômero orientina, já que possuem mesmo cromóforo e massa molecular. Observou-se que o constituinte presente no extrato realmente é a homoorientina, conforme demonstrado na **Figura 11**.

**Figura 11.** Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD, para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) na condição experimental C. Extrato EtOH 70% (A) e extrato EtOH 70% com adição de homoorientina (0,5 mg/mL) (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental item 4.8.2. Pico 3: homoorientina. Detecção em 350 nm.

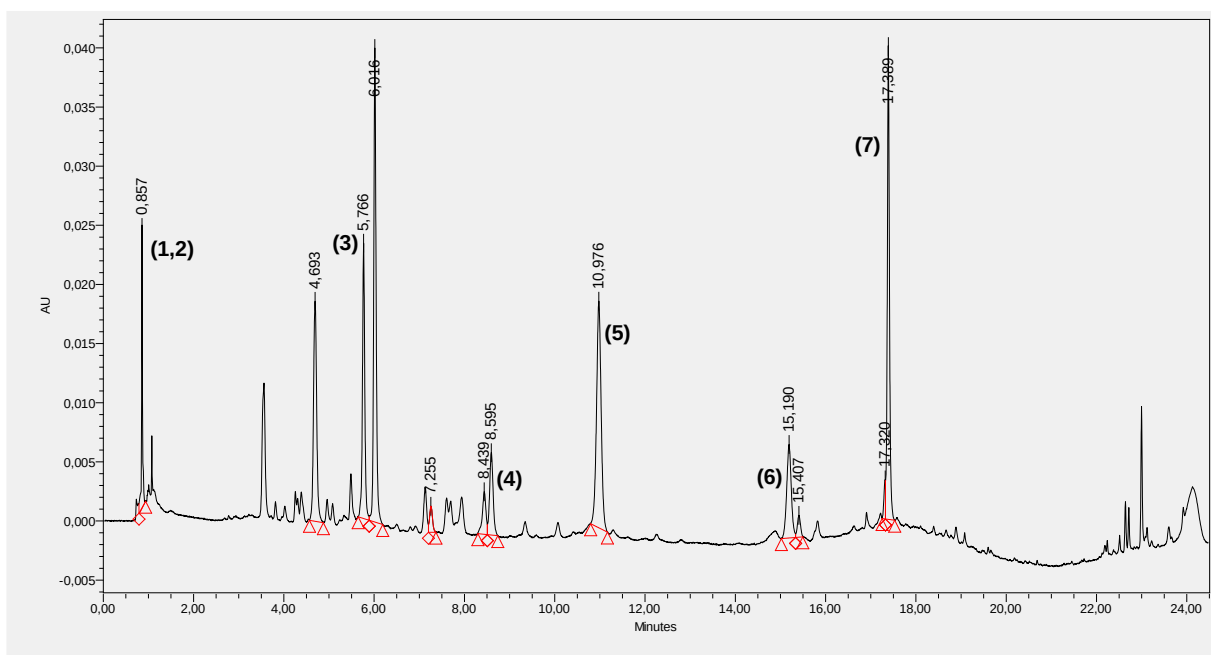


### 5.2.2 Validação do método analítico por UPLC-DAD

A condição cromatográfica estabelecida (**Figura 12**) para a análise dos sete marcadores de interesse (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, ácido chicórico, swertisina, ácido cafeoil-feruloil-tartárico e diferuloil-tartárico) em extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* foi validada seguindo os critérios do ICH (*International*

Conference on Harmonisation) e da Resolução RDC nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ICH, 2006; BRASIL, 2017). A validação do método foi realizada para o extrato EtOH 70%, eleito por representar maior complexidade em comparação com os demais. Para as análises, os extratos EtOH 96°GL e EtOH 90% foram solubilizados em MeOH e os extratos EtOH 70% e EtOH 50% foram dissolvidos em MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), conforme preconizado por Garcia e colaboradores (2016). Cabe ressaltar que os ácidos *cis*- e *trans*-aconítico foram quantificados conjuntamente e que os ácidos cafeoil-feruloil-tartárico e diferuloil-tartárico foram quantificados com base na curva analítica do ácido chicórico, uma vez que não existem SQR comercialmente disponíveis dos mesmos.

**Figura 12.** Cromatograma obtido por UPLC-DAD, para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) na condição experimental desenvolvida (C). Condições experimentais: vide item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*- aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.



### 5.2.2.1 Teste de adequabilidade do sistema

A confiabilidade da condição analítica estabelecida foi avaliada por testes de adequabilidade do sistema, compreendendo a avaliação da resolução (*R<sub>s</sub>*), fator de cauda (*T*), números de pratos teóricos (*N*), fator de retenção (*k*) e repetibilidade, avaliada pelo DPR do tempo de retenção, para cada pico de interesse (*n* = 6). Os

resultados foram expressos como valor médio de seis determinações e estão apresentados na **Tabela 14**, juntamente com os limites recomendados pelo FDA (2011) e por Snyder e colaboradores (1997).

**Tabela 14.** Resultados do teste de adequabilidade do sistema para os marcadores químicos de *E. macrophyllus*.

| Analito                                       | Fator de retenção (k) | Fator de cauda USP | Número de pratos teóricos (N) | RSD dos valores de tempo de retenção (%) | Resolução (Rs) |
|-----------------------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------------------|----------------|
| Ácidos <i>cis</i> - e <i>trans</i> -aconítico | 0,5                   | 1,07               | 5656                          | 0,12                                     | 1,87           |
| Homoorientina                                 | 4,5                   | 1,29               | 7480                          | 0,07                                     | 3,41           |
| Swertisina                                    | 7,2                   | 1,02               | 6441                          | 0,40                                     | 1,50           |
| Ácido chicórico                               | 9,4                   | 1,19               | 6756                          | 0,08                                     | 1,55           |
| Ácido cafeoil-feruloil-tartárico              | 13,4                  | 1,13               | 2147                          | 0,22                                     | 2,65           |
| Ácido di-feruloil- tartárico                  | 15,4                  | 1,05               | 6857                          | 0,07                                     | 2,00           |
| Valores recomendados FDA (2011)               | k > 2,0               | T < 2              | >2000                         | < 1,0%                                   | Rs > 2.0       |

Condição experimental: vide item 4.8.2.

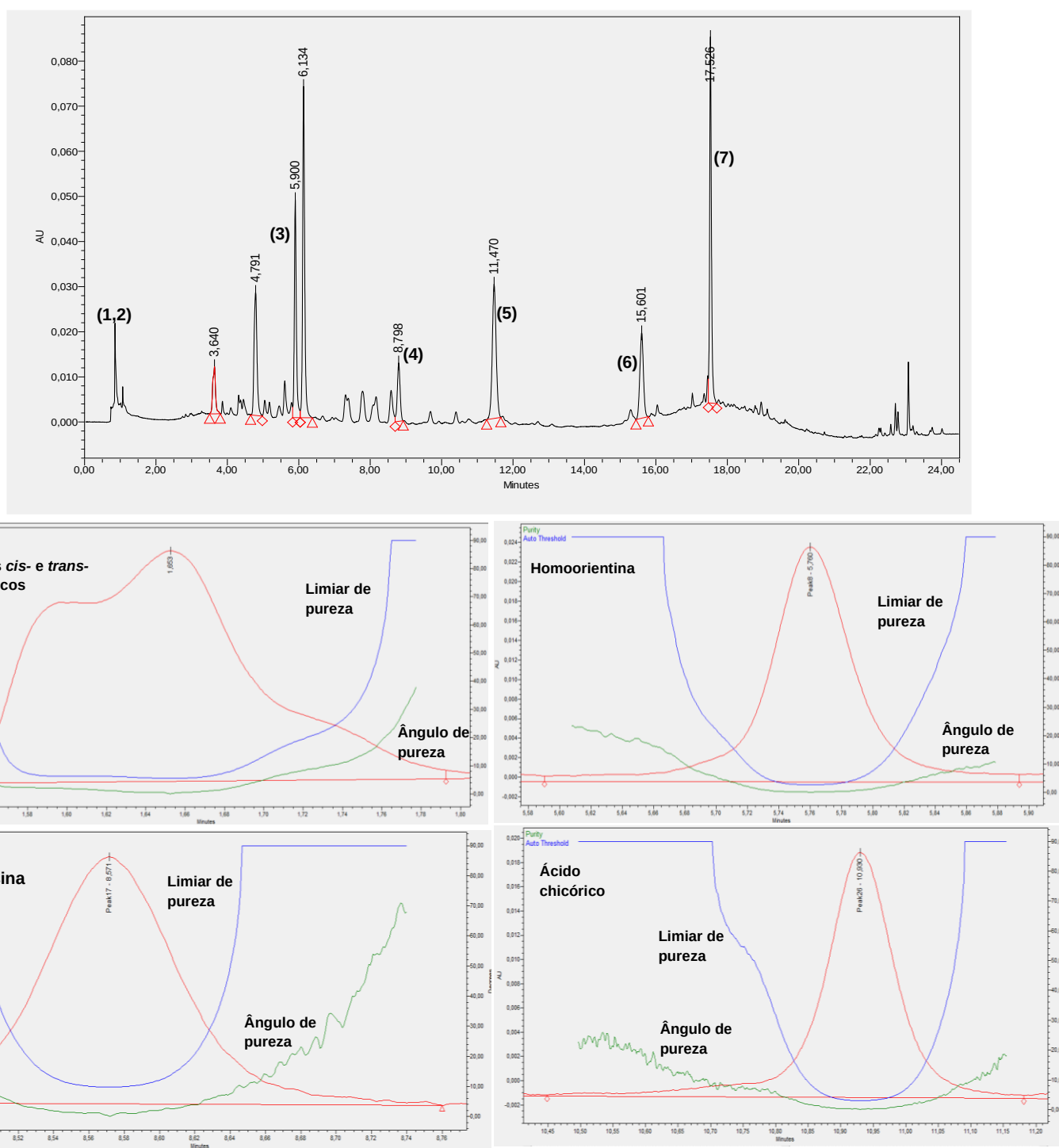
Todos os valores determinados estão de acordo com os recomendados, exceto a resolução obtida para swertisina (Rs = 1,50), do ácido chicórico (Rs = 1,55) e dos ácidos *cis*- e *trans*-aconíticos (Rs = 1,87). No entanto, considerando tratar-se de matriz biológica, esses valores podem ser aceitos, pois testes de adequabilidade do sistema apresentam limites menos rigorosos para matrizes biológicas (BROADHURST et al., 2018). Alguns autores consideram Rs de 1,5 adequada para análises quantitativas e não recomendam valores muito superiores, que podem gerar aumento desnecessário no tempo de análise (AOAC, 2002). Ainda, segundo a FDA (2011) são considerados valores de  $k > 2,0$ , no entanto, Snyder e colaboradores (1997) consideram  $k$  entre 0,5-20 são recomendados para matrizes complexas.

### 5.2.2.2 Seletividade

A seletividade da condição cromatográfica estabelecida foi avaliada para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* pela análise do ângulo de pureza e do limiar de pureza. Na **Figura 13** está ilustrada a seletividade obtida para os marcadores químicos de *E. macrophyllus*, indicada pela homogeneidade dos espectros registrados pelo DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, e análise do ângulo de pureza e limiar de pureza. O pico foi considerado com pureza espectral quando o valor

de limiar de pureza foi maior que do ângulo de pureza, conforme recomendado pelos softwares Empower da Waters e adotado em trabalhos anteriores (OLIVEIRA, LACERDA; BONELLA, 2012; MAHAJAN et al., 2022) (**Figura 13 e Tabela 15**).

**Figura 13.** Avaliação da seletividade a partir da análise dos ângulos de pureza e limiar de pureza dos cromatogramas obtidos por UPLC-DAD para o extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (DV2) na condição experimental desenvolvida (C). Condições experimentais: vide item 4.8.2. Pico 1 e 2: ácido *cis*- e *trans*- aconítico, Pico 3: homoorientina, Pico 4: Swertisina, Pico 5: ácido chicórico, Pico 6: ácido cafeoil-feruloil-tartárico e Pico 7: diferuloil-tartárico. Detecção em MaxPlot.



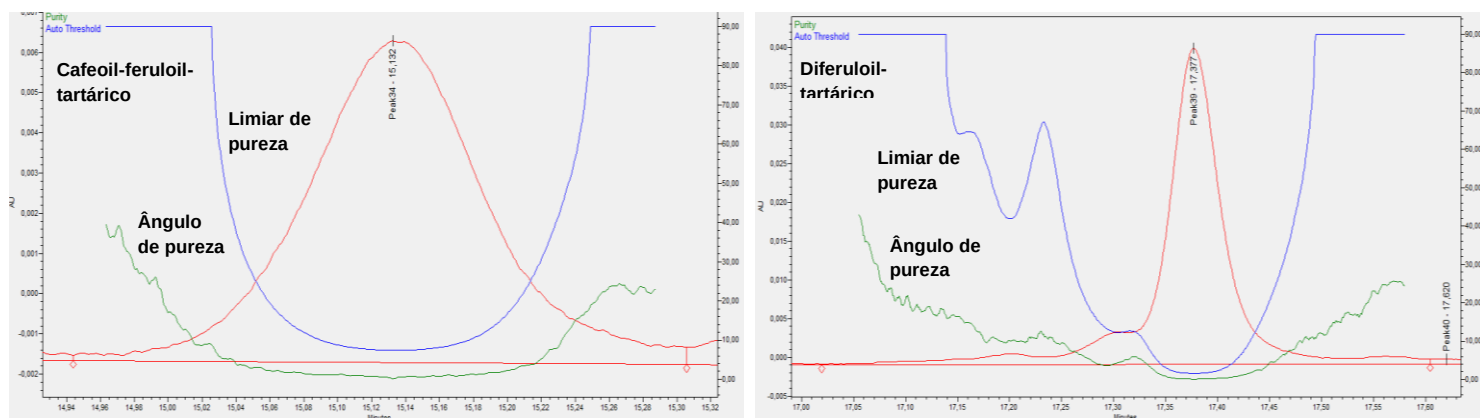


**Tabela 15.** Análise dos tempos de retenção, ângulo de pureza e limiar de pureza para determinação da seletividade.

| Analito                                         | Tempo de retenção (minutos) | Ângulo de pureza | Limiar de pureza |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|
| Ácidos <i>cis</i> - e <i>trans</i> - aconíticos | 1,65                        | 2,54             | 7,01             |
| Homoorientina                                   | 5,76                        | 1,25             | 5,24             |
| Swertisina                                      | 8,57                        | 2,64             | 15,38            |
| Ácido chicórico                                 | 10,93                       | 1,14             | 6,46             |
| Cafeoil-feruloil-ácido tartárico                | 15,13                       | 2,22             | 11,28            |
| Di-feruloil-ácido tartárico                     | 17,38                       | 1,26             | 4,28             |

Demonstrou-se, assim, que a condição cromatográfica estabelecida foi seletiva para os constituintes químicos de interesse (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, swertisina, ácido chicórico, ácidos cafeoil-feruloil-tartárico e diferuloil-tartárico). A seletividade do método garante que as determinações quantitativas dos marcadores químicos nos extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* não estarão sujeitas a interferências de outros componentes da matriz.

### 5.2.2.3 Linearidade

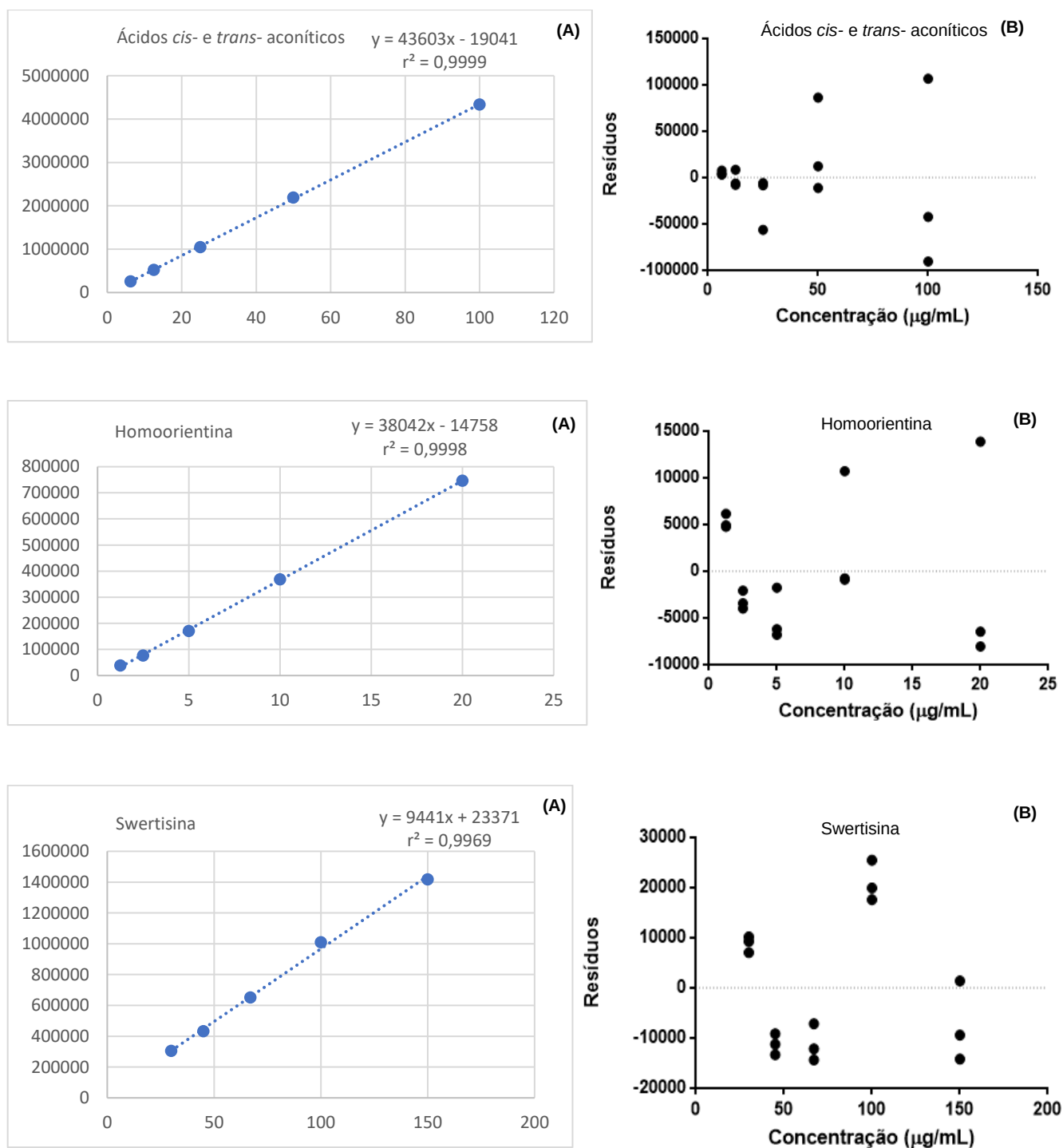
Foram construídas curvas analíticas com a mistura dos ácidos *cis*- e *trans*-aconítico (em mesma concentração), homoorientina, swertisina e ácido chicórico. As faixas de concentração foram definidas após a injeção das soluções referência a 20 µg/mL e comparação com os picos correspondentes nos extratos a serem quantificados e estão dispostas na **Tabela 16**. Foram obtidas três curvas analíticas em três dias consecutivos para cada marcador químico e, demonstrada a estatística entre elas por ANOVA, Ryan Joiner (normalidade), Durbin-Watson (independência dos resíduos) e Brown-Forsythe, conforme descrito na sequência. Com dos dados obtidos, foi construída uma curva única ( $n = 9$ ) conforme demonstrado na **Figura 14**.

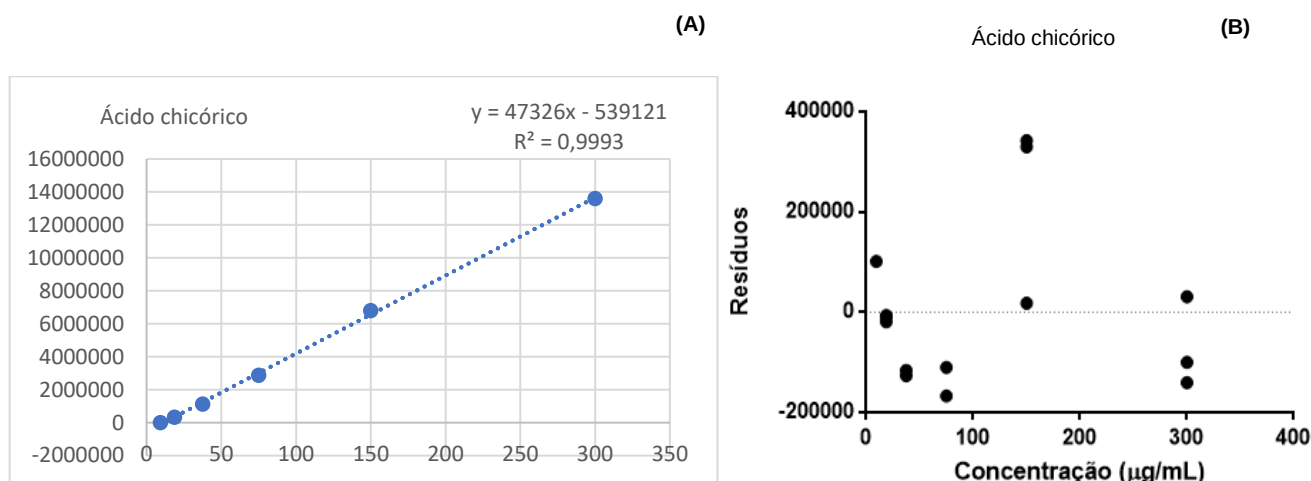
**Tabela 16.** Concentração injetada, áreas médias ( $n = 3$ ) e desvio padrão relativo das áreas dos marcadores químicos nas curvas analíticas, em três dias de análise.

| Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Dia 1                              |         | Dia 2                              |         | Dia 3                              |         |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|
|                                      | Área<br>média<br>( $\times 10^4$ ) | DPR (%) | Área<br>média<br>( $\times 10^4$ ) | DPR (%) | Área<br>média<br>( $\times 10^4$ ) | DPR (%) |
| <b>Ácido cis e trans-aconítico</b>   |                                    |         |                                    |         |                                    |         |
| 6,25                                 | 261125,7                           | 2,5     | 257758,7                           | 0,45    | 256618,3                           | 0,32    |
| 12,5                                 | 534477,0                           | 3,1     | 518141,3                           | 0,55    | 519590,7                           | 1,17    |
| 25,0                                 | 1062819,0                          | 0,87    | 1065202,0                          | 0,54    | 1014792,0                          | 0,68    |
| 50,0                                 | 2247424,0                          | 1,31    | 2173403,0                          | 0,48    | 2149917,0                          | 1,81    |
| 100,0                                | 4448056,0                          | 0,68    | 4298825,0                          | 0,77    | 4250670,0                          | 0,60    |
| <b>Homoorientina</b>                 |                                    |         |                                    |         |                                    |         |
| 1,25                                 | 38954,3                            | 1,55    | 37719,3                            | 0,56    | 37548,7                            | 0,88    |
| 2,5                                  | 78267,7                            | 1,37    | 76912,7                            | 2,02    | 76365,0                            | 1,37    |
| 5,0                                  | 173698,7                           | 2,41    | 168658,7                           | 1,57    | 169255,7                           | 0,60    |
| 10,0                                 | 376384,7                           | 1,97    | 364911,0                           | 1,43    | 364753,3                           | 0,31    |
| 20,0                                 | 759976,7                           | 2,26    | 739620,3                           | 1,22    | 738033,3                           | 0,08    |
| <b>Swertisina</b>                    |                                    |         |                                    |         |                                    |         |
| 30,0                                 | 303109                             | 0,51    | 305309                             | 0,25    | 306260,3                           | 0,20    |
| 45,0                                 | 431289                             | 0,19    | 433411,3                           | 0,42    | 435457,7                           | 0,56    |
| 67,0                                 | 648153,7                           | 0,39    | 650377,7                           | 0,24    | 655360,7                           | 0,26    |
| 100,0                                | 1006974                            | 0,16    | 1009275                            | 0,37    | 1014842                            | 0,28    |
| 150,0                                | 1470372                            | 0,32    | 1475158                            | 0,40    | 1485970                            | 0,06    |
| <b>Ácido chicórico</b>               |                                    |         |                                    |         |                                    |         |
| 9,4                                  | 7456                               | 3,29    | 7534                               | 3,61    | 7599,7                             | 2,25    |
| 18,8                                 | 3435551                            | 3,75    | 331307                             | 3,44    | 341185,7                           | 2,18    |
| 37,5                                 | 1110926                            | 0,78    | 1121462                            | 0,92    | 1120469                            | 0,69    |
| 75,0                                 | 2844810                            | 2,18    | 2901868                            | 1,39    | 2873139                            | 2,36    |
| 150,0                                | 6579260                            | 2,52    | 6903519                            | 1,08    | 6891153                            | 0,98    |
| 300,0                                | 13690297                           | 1,92    | 13519042                           | 0,35    | 13559345                           | 0,71    |

Legenda: DPR: desvio padrão relativo

**Figura 14.** Curvas analíticas (A,  $n = 9$ ) com a distribuição dos resíduos (B), coeficiente de determinação e equação das retas obtidas para os marcadores químicos definidos, obtidos no Excel® e Prisma.





Todos os dados obtidos das curvas analíticas foram processados e analisados estatisticamente conforme indicado pela RDC 166 da ANVISA, empregando o software Action Start. As curvas construídas indicaram relação linear entre a massa injetada das substâncias ( $\mu\text{g}$ ) *versus* as áreas dos picos correspondentes. Observou-se que para as quatro curvas construídas (ácidos *cis*- e *trans*- aconítico, homoorientina, swertisina, e ácido chicórico) obteve-se coeficientes de determinação ( $r^2$ ) entre 0,9940 e 0,9990. Assim, os valores encontrados se encontram dentro das faixas de concentração estudadas, e o método apresentou linearidade adequada (BRASIL, 2017).

Na sequência, os dados das curvas analíticas foram submetidos à análise de normalidade, independência dos resíduos, cálculo do coeficiente de correlação ( $r$ ) e teste F da Anova, empregando os testes estatísticos indicados na **Tabela 17**.

Inicialmente para a análise de normalidade e correlação, foi empregado a análise de Ryan-Joiner com o intuito de analisar a distribuição normal dos dados e dos resíduos de correlação obtidos nas curvas analíticas em triplicata. Observou-se que os dados seguem uma distribuição normal por meio da estatística de Ryan-Joiner, pois o valor de  $p$  deste teste para todos os marcadores foi superior a 0,05; logo não se rejeita a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%, ou seja, os resíduos seguem a distribuição normal.

Posteriormente, para analisar a independência dos resíduos e verificar a existência de autocorrelação residual na análise de regressão foi realizado o teste de Durbin-Watson (KING, 1981). Na análise dos resíduos de todos os marcadores não foram detectadas dependência das observações, uma vez que os valores de  $p$  deste teste foram superiores a 0,05 (**Tabela 17, Figura 14B**). Portanto, não se rejeita a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

Na sequência foi avaliada a homocedasticidade da variância por meio do teste de Brown-Forsythe. Como os valores de  $p$  foram maiores que 0,05 (**Tabela 17**), não se rejeita a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Dessa forma, os modelos são homocedásticos para todos os marcadores. Uma vez que as premissas do Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) foram atendidas, avaliou-se a adequação dos dados ao modelo linear. Os coeficientes de correlação dos quatro marcadores analisados foram superiores 0,990, o que permite concluir que existe uma relação linear adequada em todos eles (BRASIL, 2017).

Para avaliar se os coeficientes angulares são significativamente diferentes de zero, avaliou-se a significância do modelo utilizando o teste F de ANOVA. Como os valores de  $p$  foram iguais a 0 para todos os marcadores (**Tabela 17**), ou seja, foram inferiores a 0,05, rejeita-se a hipótese nula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%. Portanto, conclui-se que os coeficientes angulares são significativamente diferentes de zero, e o modelo linear é significativo para todos os marcadores, nas faixas de concentração avaliadas. Cabe ressaltar, ainda, que as curvas analíticas obtidas em três dias distintos foram estatisticamente equivalentes ( $p > 0,05$ ) para todos os marcadores avaliados.

**Tabela 17.** Análise de regressão linear para a quantificação de marcadores químicos definidos de *E. macrophyllus* e testes estatísticos para avaliar o modelo de regressão.

| Análise de regressão                                          | Ácido <i>cis</i> -<br>e <i>trans</i> -<br>aconítico | Homoorientina | Swertisina | Ácido<br>chicórico |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|------------|--------------------|
| Coeficiente de correlação ( $r$ )                             | 0,9995                                              | 0,9997        | 0,9891     | 0,9984             |
| Coeficiente de determinação ( $r^2$ )                         | 0,9990                                              | 0,9990        | 0,9990     | 0,9955             |
| Teste F da ANOVA (valor $p$ )                                 | 0                                                   | 0             | 0          | 0                  |
| Teste de Ryan Joiner (valor $p$ ) – Normalidade               | 0,0575                                              | 0,1817        | 0,0792     | 0,1614             |
| Teste Durbin-Watson (valor $p$ ) – independência dos resíduos | 0,8862                                              | 0,5246        | 0,5758     | 0,5375             |
| Teste de Brown-Forsythe (valor $p$ ) – resíduos               | 0,3443                                              | 0,6137        | 0,5168     | 0,4495             |

#### 5.2.2.4 Limite de detecção e quantificação

Os limites de quantificação e detecção estimados pela equação da reta para os ácidos *cis*- e *trans*- aconítico, homoorientina, swertisina e ácido chicórico são descritos na **Tabela 18**. Todos os valores encontrados são inferiores à menor concentração da

curva analítica, demonstrando que o método desenvolvido apresenta sensibilidade adequada para quantificação dos quatro marcadores nas amostras.

**Tabela 18.** Limites de detecção e quantificação dos marcadores químicos definidos.

| Analito                                         | Limite de detecção (µg) | Limite de quantificação (µg) |
|-------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Ácidos <i>cis</i> - e <i>trans</i> - aconíticos | 0,3001                  | 0,9901                       |
| Homoorientina                                   | 0,0651                  | 0,2165                       |
| Swertisina                                      | 0,5845                  | 1,9285                       |
| Ácido chicórico                                 | 0,0147                  | 0,0486                       |

### 5.2.2.5 Precisão

A precisão intradia e interdia foi avaliada conforme descrito na sequência.

#### 5.2.2.5.1 Precisão intradia

A precisão intradia foi avaliada por meio de seis determinações dos teores dos marcadores químicos no extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* ( $n = 6$ ). Os teores e os desvios padrão relativos (DPR) de cada marcador químico foram calculados e estão apresentados na **Tabela 19**.

**Tabela 19.** Teores percentuais e DPR de marcadores químicos no extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* para determinação da precisão intradia do método.

| Amostra        | ACT   | HOM   | SWE   | ACH   | CAF   | DIF   |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1              | 1,179 | 0,143 | 0,084 | 0,738 | 0,632 | 0,593 |
| 2              | 1,270 | 0,142 | 0,083 | 0,735 | 0,631 | 0,590 |
| 3              | 1,255 | 0,143 | 0,080 | 0,739 | 0,634 | 0,590 |
| 4              | 1,259 | 0,143 | 0,085 | 0,751 | 0,632 | 0,591 |
| 5              | 1,259 | 0,142 | 0,090 | 0,743 | 0,633 | 0,590 |
| 6              | 1,259 | 0,143 | 0,091 | 0,748 | 0,641 | 0,591 |
| Teor médio (%) |       |       |       |       |       |       |
| m/m)           | 1,247 | 0,143 | 0,085 | 0,742 | 0,634 | 0,591 |
| DPR (%)        | 2,694 | 0,362 | 4,948 | 0,833 | 0,577 | 0,198 |

**Legenda:** ACT: ácidos *cis*- e *trans*- aconíticos; HOM: homoorientina; SWE: swertisina; ACH: ácido chicórico; CAF: cafeoil-feruloil-ácido tartárico; DIF: diferuloil-ácido tartático; DPR: desvio padrão relativo

A Resolução RDC 166/2017 não estabelece limites para os valores de DPR na avaliação da previsão intradia. Porém, a Instrução Normativa 4 da ANVISA indica que os valores de DPR não devem ultrapassar 15% na validação da precisão de métodos analíticos para a quantificação de marcadores vegetais (BRASIL, 2014b). Adicionalmente, os valores obtidos se encontram dentro do limite preconizado pela RE nº 899/03 (BRASIL, 2003), inferiores a 5%. Desta forma, pode-se considerar que o

método desenvolvido apresentou precisão intradia adequada para os todos os marcadores analisados com valores de DPR obtidos para os marcadores em estudo (0,36 a 4,95%).

#### 5.2.2.5.2 Precisão interdias

A precisão interdias foi avaliada por meio de seis determinações dos teores dos marcadores químicos no extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus*, em dois dias consecutivos, com analistas diferentes ( $n = 12$ ). Também foram calculados os valores de DPR correspondentes (**Tabela 20**).

**Tabela 20.** Teores percentuais e DPR de marcadores químicos no extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* para determinação da precisão interdia do método.

| Dia                | Amostra | ACT   | HOM   | SWE   | ACH   | CAF   | DIF   |
|--------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                  | 1       | 1,179 | 0,143 | 0,084 | 0,738 | 0,632 | 0,593 |
|                    | 2       | 1,270 | 0,142 | 0,083 | 0,735 | 0,631 | 0,590 |
|                    | 3       | 1,255 | 0,143 | 0,080 | 0,739 | 0,634 | 0,590 |
|                    | 4       | 1,259 | 0,143 | 0,085 | 0,751 | 0,632 | 0,591 |
|                    | 5       | 1,259 | 0,142 | 0,090 | 0,743 | 0,633 | 0,590 |
|                    | 6       | 1,259 | 0,143 | 0,091 | 0,748 | 0,641 | 0,591 |
| 2                  | 1       | 1,293 | 0,144 | 0,087 | 0,745 | 0,631 | 0,591 |
|                    | 2       | 1,309 | 0,143 | 0,090 | 0,745 | 0,632 | 0,591 |
|                    | 3       | 1,270 | 0,148 | 0,088 | 0,728 | 0,634 | 0,591 |
|                    | 4       | 1,273 | 0,138 | 0,087 | 0,719 | 0,605 | 0,592 |
|                    | 5       | 1,284 | 0,145 | 0,090 | 0,774 | 0,678 | 0,557 |
|                    | 6       | 1,233 | 0,143 | 0,083 | 0,745 | 0,634 | 0,550 |
| Teor médio (% m/m) |         | 1,261 | 0,143 | 0,087 | 0,743 | 0,635 | 0,585 |
| DPR (%)            |         | 2,603 | 1,547 | 4,272 | 1,798 | 2,523 | 2,633 |

**Legenda:** ACT: ácidos *cis*- e *trans*- aconíticos; HOM: homoorientina; SWE: swertisina; ACH: ácido chicórico; CAF: cafeoil-feruloil-ácido tartárico; DIF: diferuloil-ácido tartático; DPR: desvio padrão relativo

A Resolução RDC 166/2017 da ANVISA não estabelece valores limites para os valores de DPR na avaliação da previsão interdias. No entanto, segundo os critérios da RE 899 da ANVISA, valores de DPR inferiores a 5% indicam precisão interdia adequada para o método (BRASIL, 2003). As médias dos teores entre os dois dias de determinações foram comparadas pelo teste *t* de Student. Os teores não diferiram entre o primeiro e o segundo dia de análise ( $p > 0,05$ ).

#### 5.2.2.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em ensaios de recuperação, a partir da fortificação do extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (2 mg/mL) com massas

conhecidas das SQR. Na **Tabela 21** estão apresentados os resultados dos ensaios de recuperação para todos os marcadores químicos avaliados.

**Tabela 21.** Valores de recuperação dos ácidos *cis*- e *trans*- aconíticos, homoorientina, swertisina e ácido chicórico no extrato EtOH 70% de *E. macrophyllus* (média, n = 3).

| Marcador | Níveis de concentração | Solução <sup>a</sup> | Conc. inicial <sup>b</sup> | Conc. adicionada <sup>c</sup> | Conc. final <sup>d</sup> | Recuperação (%) | DPR (%) |
|----------|------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------|---------|
| ACT      | 1                      | 6,20                 | 25,21                      | 12,50                         | 36,19                    | 96,00           | 3,96    |
|          | 2                      | 12,50                | 25,21                      | 25,00                         | 55,40                    | 110,80          | 4,82    |
|          | 3                      | 25,00                | 25,21                      | 50,00                         | 75,39                    | 100,52          | 3,83    |
| HOM      | 1                      | 0,70                 | 2,88                       | 1,40                          | 4,71                     | 110,20          | 0,79    |
|          | 2                      | 1,40                 | 2,88                       | 2,80                          | 5,44                     | 95,79           | 4,42    |
|          | 3                      | 2,80                 | 2,878                      | 5,60                          | 8,38                     | 98,80           | 2,11    |
| SWE      | 1                      | 0,87                 | 6,68                       | 1,70                          | 8,34                     | 99,48           | 1,92    |
|          | 2                      | 1,75                 | 6,68                       | 3,40                          | 10,88                    | 107,96          | 1,13    |
|          | 3                      | 3,50                 | 6,68                       | 6,80                          | 13,53                    | 100,37          | 2,98    |
| ACH      | 1                      | 3,73                 | 14,88                      | 7,45                          | 22,29                    | 99,87           | 0,71    |
|          | 2                      | 7,45                 | 14,88                      | 14,90                         | 29,95                    | 100,05          | 1,08    |
|          | 3                      | 14,90                | 14,88                      | 29,80                         | 44,19                    | 98,91           | 2,07    |

**Legenda:** <sup>a</sup>volume (μL) padrão estoque (2 mg/mL); <sup>b</sup>concentração não fortificado (μg/mL); <sup>c</sup>concentração adicionada (μg/mL); <sup>d</sup>concentração experimental (μg/mL); ACT: ácidos *cis*- e *trans*-aconíticos; HOM: homoorientina; SWE: swertisina; ACH: ácido chicórico; CAF: cafeoil-feruloil-ácido tartárico; DIF: diferuloil-ácido tartático; DPR: desvio padrão relativo

Foram obtidos valores de recuperação superiores a 100% para alguns níveis de concentração avaliados dos ácidos *cis*- e *trans*-aconítico (110,80%), homoorientina (110,20%) e swertisina (107,96%), enquanto para os demais marcadores químicos a recuperação esteve na faixa de 95,79% a 100,52% nos três níveis de fortificação avaliados. A Resolução RDC 166/2017 não estabelece valores mínimos e máximos para porcentagem de recuperação. A Associação de Químicos Analíticos Oficiais (*Association of Official Analytical Chemists* – AOAC) estabelece critérios de aceitação da porcentagem de recuperação (40% até 120%) em função da concentração do analito na amostra (AOAC, 2012). Para os analitos quantificados nas amostras na faixa 0,01-1%, considera-se o limite de 90-107% de recuperação, o que corresponde à swertisina (0,54% na amostra e 107,96% de recuperação). No entanto, homoorientina (0,23% na amostra e 110,20% de recuperação), se apresentou fora dos limites de recuperação e também os ácidos *cis*- e *trans*-aconíticos (1,8% na amostra e 110,80% de recuperação), cuja AOAC indica que analitos quantificados na faixa de 1-10% devem conter entre 97-103% de recuperação. No entanto, de acordo com a *United States Food and Drug Administration* (US-FDA, 2001) e com a RE nº 899 de 2003 da ANVISA, para amostras complexas, como as amostras vegetais, embora sejam

desejáveis valores de recuperação próximos a 100% para maximizar a sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva para os analitos de interesse de acordo com a análise da variação das replicatas. Portanto, todos os analitos apresentaram recuperação adequada do método (FDA, 2001; BRASIL, 2003).

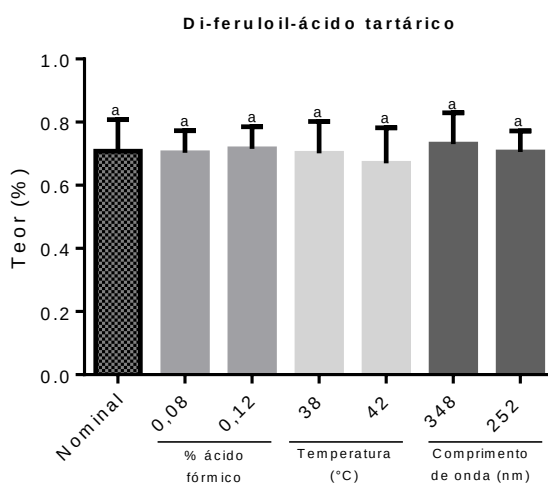
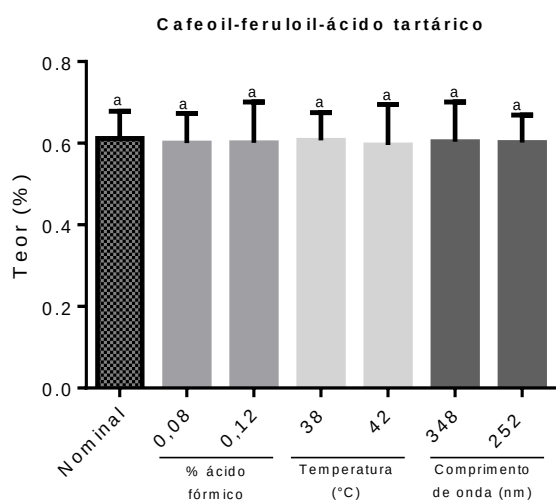
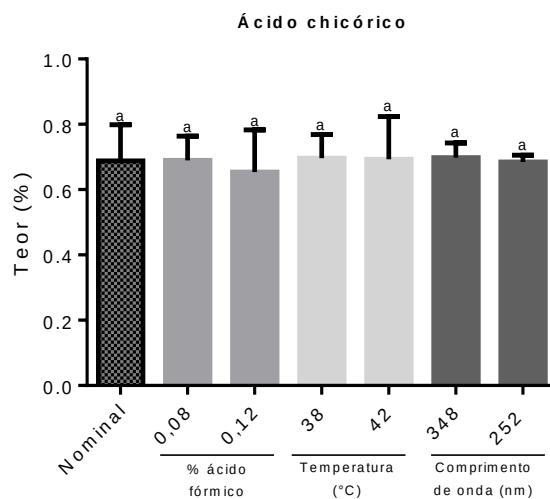
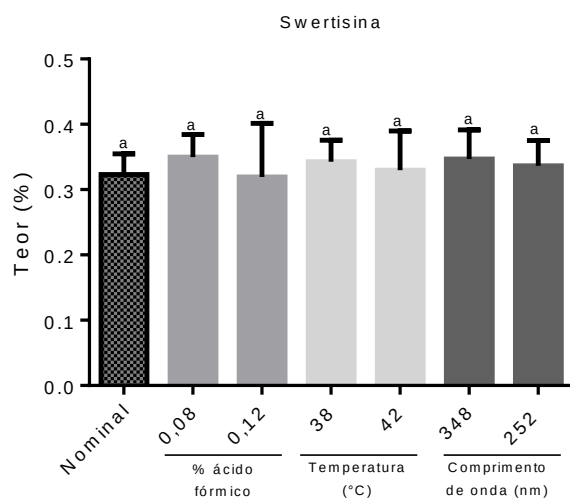
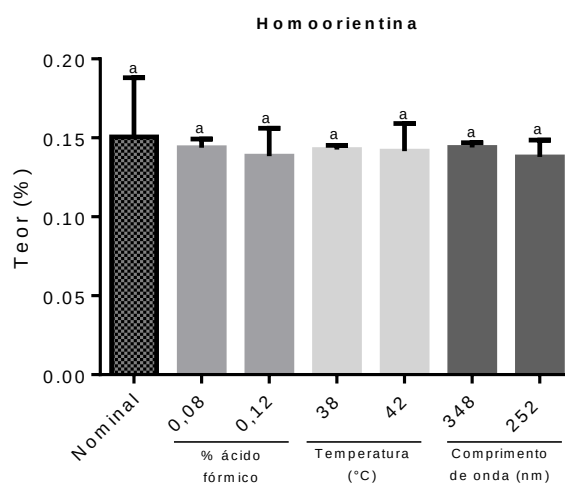
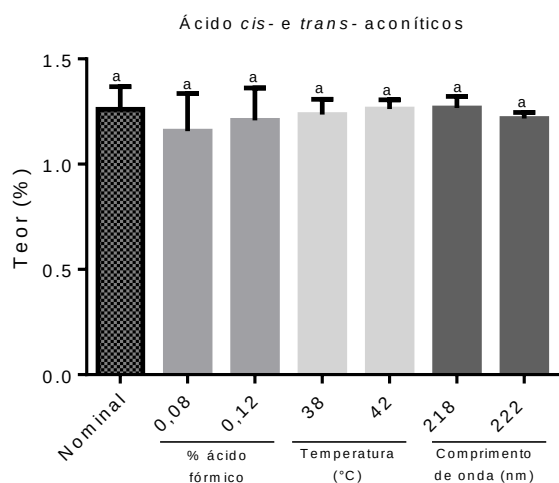
#### 5.2.2.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir da comparação dos teores dos marcadores químicos quantificados no extrato EtOH 70% utilizando as condições cromatográficas estabelecidas (item 4.8.2) e frente a alterações deliberadas na temperatura da coluna (38 e 42 °C), comprimento de onda de detecção (218 e 222 nm para os ácidos *cis*- e *trans*-aconítico e 348 e 352 nm para os flavonoides e derivados do ácido tartárico) e na porcentagem de ácido fórmico na fase móvel (0,08 e 0,12% v/v). Os resultados obtidos no estudo de robustez do método estão representados na **Figura 15**.

Após análise de variância seguida pelo teste de Tukey observou-se que os teores obtidos nas condições cromatográficas alteradas não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) daqueles determinados na condição nominal. Esses resultados asseguram a robustez do método frente a pequenas variações nas condições analíticas estabelecidas, sem comprometer a confiabilidade dos resultados. Pode-se observar que para os ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, swertisina e ácido chicórico, a alteração da concentração de ácido elevou o desvio padrão das amostras; portanto, essa concentração deve ser finamente ajustada para evitar erros de análise no método desenvolvido. No entanto os valores não diferiram estatisticamente da condição nominal, portanto, o método é robusto para esta variável. A interferência da concentração do ácido na robustez de método analítico de quantificação, já foi descrita para os ácidos *cis*- aconítico por Garcia e colaboradores (2016) na validação do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com a espécie *E. grandiflorus*, com redução significativa do teor desse marcador com a alteração da concentração de ácido da fase móvel e do fluxo.

**Figura 15.** Influência da temperatura da coluna, fluxo da fase móvel e porcentagem de ácido fórmico na fase móvel na robustez do método cromatográfico para quantificação de marcadores químicos no extrato EtOH 70% de folhas de *E. macrophyllus* (média,  $n$

= 6). As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si após análise de variância seguida pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



### 5.2.3 Quantificação dos marcadores químicos em extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*

O método de UPLC-DAD desenvolvido e validado foi aplicado na análise de 12 extratos (EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50%) preparados a partir de folhas de três diferentes materiais vegetais de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus), e, também, dos 4 extratos de *E. grandiflorus* (96°GL EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH e 50% EtOH) obtidos a partir de uma única droga vegetal. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 22**.

Conforme esperado, todos os extratos preparados a partir de diferentes drogas vegetais com EtOH 70% e EtOH 50% apresentaram altas concentrações dos compostos polares ácido *cis*- e *trans*-aconítico analisados em conjunto, com variação do conteúdo para as amostras. O extrato EtOH 70% obtido de DV1 ( $8,09 \pm 0,02\%$ ) e DVMus ( $7,47 \pm 0,03\%$ ) apresentou teores semelhantes dos ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, enquanto a maior concentração foi medida no extrato EtOH 50% de *E. grandiflorus* ( $20,12 \pm 0,16\%$ ) (**Tabela 22**).

A homoorientina foi encontrada em todos os extratos preparados com EtOH 70% e EtOH 90%, apresentando teores diversos. Os extratos obtidos de DVMus (EtOH 70%,  $0,02 \pm 0,00\%$ ; EtOH 90%,  $0,04 \pm 0,01\%$ ) apresentaram a menor concentração de homoorientina, enquanto o extrato EtOH 50% de *E. grandiflorus* ( $0,73 \pm 0,01\%$ ) exibiu a maior concentração desse marcador. Já a swertisina foi quantificada em todos os extratos de ambas as espécies, sendo seu maior teor observado em extratos produzidos a partir de *E. grandiflorus* (EtOH 70%,  $3,70 \pm 0,02\%$ ) e a menor concentração em extratos preparados com DV2 de *E. macrophyllus* (EtOH 70%,  $0,08 \pm 0,00\%$ ). Por sua vez, o ácido chicórico foi quantificado em todos os extratos preparados com EtOH 50% e EtOH 90% de DV1 de *E. macrophyllus* (EtOH 50%,  $3,50 \pm 0,06\%$ ) e de *E. grandiflorus* (EtOH 50%,  $6,76 \pm 0,12\%$ ), este último apresentando uma concentração significativamente maior ( $p < 0,05$ ), enquanto o extrato EtOH 50% de DVMus ( $0,57 \pm 0,01\%$ ) apresentou o menor teor de ácido chicórico. Os ácidos cafeoil-feruloil-tartárico e diferuloil-tartárico foram encontrados em todos os extratos, exceto no extrato EtOH 96°GL de DVMus. O extrato EtOH 50% de *E. grandiflorus* apresentou os maiores teores de cafeoil-feruloil-tartárico ( $1,89 \pm 0,04\%$ ) e diferuloil-tartárico ( $1,13 \pm 0,02\%$ ).

Os resultados obtidos na quantificação de marcadores químicos em extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* demonstram a impossibilidade de diferenciação das

espécies baseada nos teores de seus marcadores. Dentre os marcadores químicos qualitativos descritos para *E. grandiflorus* constam na monografia da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição o ácido cafeico, isoorientina e swertiajaponina, já na 6ª Edição (BRASIL, 2019) encontram-se apenas o ácido cafeico e a isoorientina como marcadores químicos qualitativos. Cabe ressaltar que a homoorientina foi aqui descrita pela primeira vez para *E. macrophyllus*.

Fernandes e colaboradores (2022), publicaram recentemente a caracterização química por UPLC-DAD-ESI-MS de uma fração obtida do extrato aquoso de *E. macrophyllus*, detectando a presença de swertisina, swertiajaponina, isoorientina 7,3'-dimetil-éter, swertisina-O-ramnosídeo, isoorientina, isovitexina, isovitexina-O-ramnosídeo e isovitexina-7-O-glicosídeo. Adicionalmente, Silva e colaboradores (2022), demonstraram a caracterização química de fração do extrato etanólico de *E. macrophyllus*, enriquecido em derivados do ácido tartárico, como o ácido cafeoil-feruloil-tartárico. Porém, em nenhum desses estudos as substâncias químicas caracterizadas por UPLC-DAD-ESI-MS foram definidas ou quantificadas como marcadores químicos de *E. macrophyllus*.

Já para a espécie *E. grandiflorus*, Strada e colaboradores (2017) realizaram a quantificação por HPLC-DAD de homoorientina de três diferentes espécimes de *E. grandiflorus*. Os autores relataram teores de homoorientina entre 2,12 – 21,82 µg/mL no extrato hidroetanólico 70%, uma faixa de concentração que engloba a concentração obtida ( $6,99 \pm 0,13$  µg/mL) para este marcador no extrato EtOH 70% no presente trabalho.

Além disso, no trabalho de Garcia e colaboradores (2016) foi realizada a quantificação do teor de ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, respectivamente, em extratos EtOH 96°GL ( $0,460 \pm 0,009\%$ ;  $0,476 \pm 0,018\%$ ), EtOH 70% ( $1,178 \pm 0,006\%$ ;  $7,409 \pm 0,029\%$ ) e EtOH 50% ( $1,029 \pm 0,011\%$ ;  $8,047 \pm 0,115\%$ ) obtidos de *E. grandiflorus*. O teor dos ácidos *cis*- e *trans*-aconíticos não foi determinado nesse trabalho, pois os valores foram inferiores ao limite de quantificação. Já o extrato EtOH 70% apresentou valores correspondentes nos dois trabalhos, e o teor no EtOH 50% aqui relatado, foi vinte vezes maior. Além disso, homoorientina e swertisina e o ácido chicórico foram quantificados nos mesmos extratos, respectivamente: EtOH 96°GL ( $1,614 \pm 0,024\%$ ;  $0,168 \pm 0,004\%$  e  $1,217 \pm 0,018\%$ ); EtOH 70% ( $1,420 \pm 0,021\%$ ;  $0,120 \pm 0,001\%$  e  $1,818 \pm 0,031\%$ ) e EtOH 50% ( $1,177 \pm 0,018\%$ ;  $0,140 \pm 0,002\%$  e  $1,522 \pm 0,019\%$ ).

Em comparação com os teores quantificados, observou-se no geral, menores valores de teor de homoorientina e ácido chicórico, e maiores teores de swertisina.

De uma maneira geral, a análise dos dados da **Tabela 22** sugere que a variação entre as diferentes drogas vegetais de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* é principalmente quantitativa, com variação nos teores dos marcadores quantificados. Pelos dados obtidos, sugere-se que os extratos obtidos de DVMus foram os que apresentaram menor similaridade química quantitativa em comparação com os demais materiais vegetais.

Os dados da análise quantitativa realizada para os diferentes extratos, em conjunto com os dados da avaliação da atividade anti-inflamatória pela redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias (item 5.3), e atividade antioxidante (item 5.4), foram submetidos à análise quimiométrica (item 5.5) visando avaliar se os resultados obtidos permitem ou não a diferenciação das duas espécies de chapéu-de-couro estudadas.

**Tabela 22.** Rendimentos extrativos e teores (média  $\pm$  DP de triplicatas) de marcadores químicos em extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*

| Material vegetal | Extratos   | Teor dos marcadores químicos (% m/m $\pm$ DP) |                                               |                                |                                |                                |                                   |                                |
|------------------|------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|                  |            | Rendimento extrativo (% m/m)                  | Ácidos <i>cis</i> - e <i>trans</i> -aconítico | Homoorientina                  | Swertisina                     | Ácido chicórico                | Ácido cafeoil-feruloil- tartárico | Ácido diferuloil-tartárico     |
| DV1              | EtOH 96°GL | 8,51                                          | 0,491 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup>                | 0,052 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup> | 0,171 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup> | 0,750 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup> | 0,636 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>    | 0,630 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup> |
|                  | EtOH 90%   | 9,98                                          | 2,992 $\pm$ 0,036 <sup>b</sup>                | 0,095 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup> | 0,260 $\pm$ 0,013 <sup>b</sup> | 1,531 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup> | 0,794 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup>    | 0,751 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup> |
|                  | EtOH 70%   | 21,31                                         | 8,094 $\pm$ 0,024 <sup>c</sup>                | 0,164 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup> | 0,382 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup> | 2,853 $\pm$ 0,042 <sup>c</sup> | 0,991 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>    | 0,862 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup> |
|                  | EtOH 50%   | 25,34                                         | 10,333 $\pm$ 0,082 <sup>d</sup>               | 0,190 $\pm$ 0,006 <sup>c</sup> | 0,480 $\pm$ 0,011 <sup>d</sup> | 3,505 $\pm$ 0,059 <sup>d</sup> | 1,081 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup>    | 0,913 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup> |
| DV2              | EtOH 96°GL | 11,14                                         | ND                                            | 0,140 $\pm$ 0,002 <sup>b</sup> | 0,164 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | 0,577 $\pm$ 0,002 <sup>e</sup> | 0,570 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>    | 0,595 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup> |
|                  | EtOH 90%   | 14,40                                         | 2,311 $\pm$ 0,106 <sup>e</sup>                | 0,261 $\pm$ 0,003 <sup>d</sup> | 0,743 $\pm$ 0,015 <sup>e</sup> | 2,408 $\pm$ 0,060 <sup>c</sup> | 0,798 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>    | 0,944 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup> |
|                  | EtOH 70%   | 19,13                                         | 1,263 $\pm$ 0,036 <sup>f</sup>                | 0,141 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup> | 0,082 $\pm$ 0,004 <sup>f</sup> | 0,740 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup> | 0,992 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>    | 0,743 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup> |
|                  | EtOH 50%   | 22,58                                         | 1,244 $\pm$ 0,020 <sup>f</sup>                | 0,083 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup> | 0,172 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | 0,572 $\pm$ 0,001 <sup>e</sup> | 1,089 $\pm$ 0,009 <sup>c</sup>    | 0,690 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup> |
| DVMus            | EtOH 96°GL | 4,07                                          | ND                                            | ND                             | 0,181 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | ND                             | ND                                | 0,578 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup> |
|                  | EtOH 90%   | 19,65                                         | 0,762 $\pm$ 0,030 <sup>g</sup>                | 0,046 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup> | 0,312 $\pm$ 0,015 <sup>c</sup> | 0,612 $\pm$ 0,005 <sup>e</sup> | 0,581 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>    | 0,607 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup> |
|                  | EtOH 70%   | 21,51                                         | 7,473 $\pm$ 0,027 <sup>h</sup>                | 0,020 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | 0,235 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup> | ND                             | 0,574 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>    | 0,585 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup> |
|                  | EtOH 50%   | 22,21                                         | 7,595 $\pm$ 0,080 <sup>h</sup>                | ND                             | 0,244 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup> | 0,576 $\pm$ 0,001 <sup>e</sup> | 0,574 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>    | 0,581 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup> |
| EG               | EtOH 96°GL | 2,97                                          | ND                                            | 0,130 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup> | 1,432 $\pm$ 0,063 <sup>g</sup> | 0,718 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup> | 0,620 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>    | 0,630 $\pm$ 0,034 <sup>a</sup> |
|                  | EtOH 90%   | 11,37                                         | ND                                            | 0,262 $\pm$ 0,005 <sup>d</sup> | 2,742 $\pm$ 0,130 <sup>h</sup> | 1,320 $\pm$ 0,050 <sup>b</sup> | 0,852 $\pm$ 0,017 <sup>b</sup>    | 0,831 $\pm$ 0,026 <sup>c</sup> |
|                  | EtOH 70%   | 22,13                                         | 1,731 $\pm$ 0,063 <sup>i</sup>                | 0,352 $\pm$ 0,006 <sup>e</sup> | 3,701 $\pm$ 0,022 <sup>i</sup> | 4,471 $\pm$ 0,087 <sup>f</sup> | 1,262 $\pm$ 0,008 <sup>c</sup>    | 0,852 $\pm$ 0,014 <sup>c</sup> |
|                  | EtOH 50%   | 22,76                                         | 20,123 $\pm$ 0,161 <sup>j</sup>               | 0,734 $\pm$ 0,007 <sup>f</sup> | 0,452 $\pm$ 0,017 <sup>d</sup> | 6,762 $\pm$ 0,118 <sup>g</sup> | 1,893 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>    | 1,134 $\pm$ 0,017 <sup>d</sup> |

**Legenda:** DP: desvio padrão; DV1: *E. macrophyllus* amostra comercial 1; DV2: *E. macrophyllus* amostra comercial 2; DVMus: amostra de *E. macrophyllus* UFMG; EX.: amostra comercial de *E. grandiflorus*; EtOH 96°GL: extrato de etanol 96°GL; 90%EtOH: 90% extrato hidroetanólico; 70%EtOH: extrato hidroetanólico 70%; 50%EtOH: 50% extrato hidroetanólico.

As diferenças entre as concentrações médias dos extratos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para o conteúdo dos marcadores químicos, letras diferentes dentro das colunas indicam diferenças significativas. ND: não determinado (abaixo do limite de quantificação)

### 5.3 Análise molecular de *E. macrophyllus*

Para garantir a qualidade dos fitoterápicos produzidos, algumas etapas são estabelecidas na Farmacopeia Brasileira, incluindo a correta identificação da espécie vegetal, análise da pureza e confirmação da presença e concentração mínima dos marcadores químicos, conforme descrito no item anterior. Nesse sentido, um dos principais desafios encontrados na produção de fitoterápicos é garantir a identificação inequívoca da espécie vegetal que constitui a matéria-prima que será usada para fabricar o produto. Conforme discutido anteriormente, em muitas situações a identificação e quantificação dos marcadores químicos, associada à avaliação das características botânicas macro e microscópicas, não é suficiente para a identificação inequívoca da espécie. Nesse sentido, empregam-se as análises moleculares, que consistem em obter e analisar uma ou mais regiões curtas e padronizadas de DNA que são utilizadas para identificar uma espécie através do seu código genético (PALHARES, 2015).

Assim, procedeu-se à análise molecular e filogenética de uma amostra de *E. macrophyllus*, visando estabelecer um padrão ouro para a espécie, a ser utilizado para diferenciação de outras espécies de *Echinodorus*, incluindo *E. grandiflorus*. A análise foi realizada com o material vegetal fresco coletado de um exemplar cultivado no Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG (DVMus), previamente identificado como *E. macrophyllus* e tombado no BHCB. Esta análise visou analisar a associação entre sequências do DNA de DVMus e as sequências de *Echinodorus* depositadas do GenBank.

Para as análises, foram realizadas três extrações de DNA do material vegetal obtido, diluídas na razão 1/5, e depositadas no banco de DNA do Laboratório de Biosistemática e Sistemática Molecular de Plantas – LBSMP como 885.1, 885.2 e 885.3. A amostra 885.1 também foi analisada sem diluição (885.1s). Inicialmente, para amplificação dos marcadores ITS e *matK-trnK* foram utilizados os primers ITS 4/5 e *matK* ER/EF (universais e com condições de amplificação bem conhecidas), respectivamente, pois desde 2009 o *Plant Working Group* do projeto *Barcode of Life* estabeleceu que as regiões oficiais para *DNA Barcoding* de plantas são *rbcl* e *matK* (PALHARES, 2015).

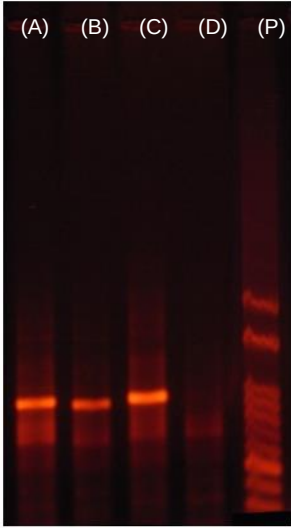
Pôde-se observar que as amplificações com a amostra 885.2 foram as de maior rendimento para as duas reações realizadas, obtendo-se 2160 ng e 3240 ng de DNA amplificado, respectivamente para ITS e *matK* (**Tabela 23**). Portanto, as análises

posteriores com os demais primers utilizados anteriormente como marcadores do gênero *Echinodorus* (*matK* MG1/MG15, *leafy* (Flint2 F1/R1), 5S-NTS (PI/PII), ITS (5S/ER), *psbA-trnH* (*trnH2/psbA*) foram realizadas com a amostra 885.2 diluída 1/2 (885.2s) e 1/5 (885.2).

A reação de amplificação de 885.2 com o primer 5S-NTS, nas duas diluições avaliadas, não forneceu rendimento suficiente para as reações de sequenciamento. As demais reações de amplificação geraram quantidades de DNA suficientes para purificação e posterior sequenciamento. Os *primers* utilizados para amplificação, os rendimentos obtidos de DNA amplificado e as imagens da análise de eletroforese das amostras de DNA amplificado em gel de agarose são apresentados na **Tabela 23**.

Posteriormente, todos os produtos de PCR foram purificados e reanalisados por eletroforese em gel de agarose. Todos os produtos se mostraram puros e com rendimento suficiente para o sequenciamento (**Figura 16**).

**Tabela 23.** Amplificações realizadas com o DNA extraído de DVMus para os *primers* analisados, rendimentos e imagens de PCR dos produtos resultantes das amplificações. (P) Marcador de massa molecular (100 pb Ludwig).

| Primers | Extração   | Rendimento (ng) | Imagem da análise por eletroforese do DNA amplificado                                 |
|---------|------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| ITS 4/5 | 885.1s (A) | 1620            |  |
|         | 885.1 (B)  | 1080            |                                                                                       |
|         | 885.2 (C)  | 2160            |                                                                                       |
|         | 885.3 (D)  | ----            |                                                                                       |
|         | 885.1s (A) | 2700            |                                                                                       |

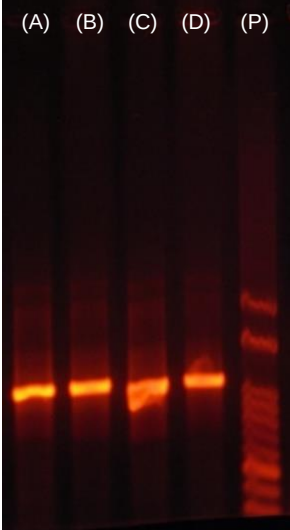
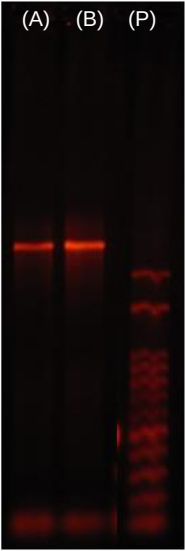
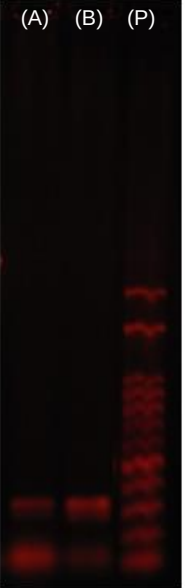
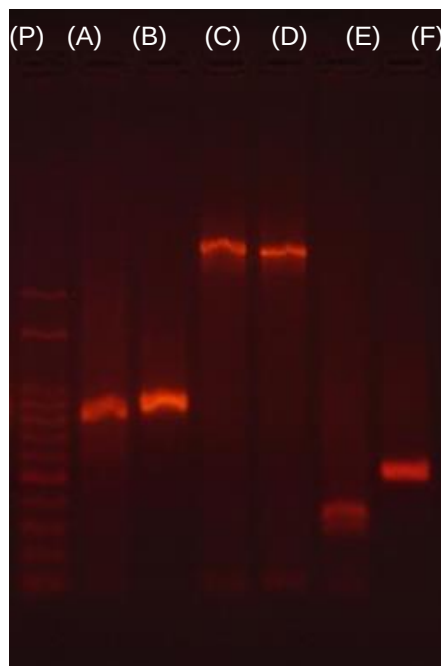
|                      |            |      |                                                                                       |
|----------------------|------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| matK ER/EF           | 885.1 (B)  | 2700 |    |
|                      | 885.2 (C)  | 3240 |                                                                                       |
|                      | 885.3 (D)  | 2700 |                                                                                       |
| matK MG1/MG15        | 885.2s (A) | 1620 |   |
|                      | 885.2 (B)  | 1080 |                                                                                       |
| Leafy (Flint2 F1/R1) | 885.2s (A) | 540  |  |
|                      | 885.2 (B)  | 360  |                                                                                       |



**Figura 16.** Análise dos produtos de PCR purificados das amplificações de DNA para os primers ITS4/5 (A), ITS ER/EF (B), matK ER/EF (C), matK MG1/MG15 (D), leafy Flint2 F1/R1 (E), psbA/trnH2 (F) e o marcador de massa molecular (P).



O banco de dados do BOLD (*Barcode of Life Data System*) de *Echinodorus* é totalmente baseado em sequências do *GenBank* e, portanto, usamos o BLASTN (*nucleotide blast*) na página do NCBI BLAST (JOHNSON et al., 2008) para pesquisar no banco de dados de nucleotídeos e identificar as sequências/taxa com maior identidade com as sequências que geramos de *E. macrophyllus*. A melhor correspondência variou dependendo dos marcadores empregados (**Tabela 24**). Para *psbA-trnH*, *matK-trnK* e *Leafy*, a melhor correspondência foi com *E. paniculatus*, enquanto *ITS* apresentou melhor correspondência com *E. osiris*, mas as diferenças entre os *hits* adicionais foram muito pequenas.

Como não foi possível uma correspondência inequívoca, realizamos análises filogenéticas para verificar quais táxons estavam mais relacionados à amostra sequenciada de *E. macrophyllus* usando os marcadores *ITS*, *5S-NTS*, *Leafy*, *matK-trnK* e *psbA-trnH*. A análise inicial com cada marcador individualmente (dados não mostrados) não detectou nenhum caso de incongruência significativo, então uma matriz combinada foi usada para a análise final.

A **Tabela 25** apresenta as características gerais dos conjuntos de dados e estatísticas de parcimônia juntamente com um resumo dos modelos implementados para cada partição. A árvore de consenso estrito da análise de parcimônia e a árvore de consenso de maioria da análise Bayesiana foram, em sua maior parte, congruentes. Tendo em vista que a última foi melhor resolvida e teve suporte geral

mais forte, ela foi selecionada para apresentação e discussão (**Figura 17**). Nossa análise recuperou três clados principais com alto suporte dentro de *Echinodorus*: clado A (Probabilidade Posteriores (PP) 1.00, *bootstrap* (BP) 100%), clado B (PP 1.00, BP 98%) e clado C (PP 1.00, BP 62%). O clado C, por sua vez, é dividido em três clados principais: um clado formado por *E. grisebachii* e *E. heikobleheri* (clado D, PP 1.00, BP 100%), outro formado por *E. trialatus*, *E. emersus* e *E. scaber* (clado E, PP 1.00, BP 100%) e clado F (PP 1.00, BP 100%), que inclui nossa amostra de *E. macrophyllus* e 20 outros táxons. As relações dentro do clado F foram mal resolvidas e mal suportadas.

Nossa amostra de *E. macrophyllus* foi recuperada como irmã de um clado contendo *E. osiris* e seis outros táxons, mas com baixo suporte (PP 0,85, BP <50%). Em nenhuma das análises, nossa amostra de *E. macrophyllus* foi recuperada próxima da amostra de *E. macrophyllus* do GenBank. Esse resultado provavelmente se deve a uma combinação de fatores. Primeiro, o polimorfismo nucleotídico entre as espécies de *Echinodorus* é muito baixo. As distâncias médias dentro e entre os principais clados identificados na análise filogenética molecular (**Figura 17**) apresentam valores baixos, particularmente dentro dos clados (**Tabela 26**). No clado F, por exemplo, que inclui as amostras de *E. macrophyllus*, a distância média entre as sequências de todos os marcadores foi de apenas 0,007, sendo que para alguns marcadores, como *matK-trnK*, esses valores foram ainda menores (**Tabela 25**). Esses resultados sugerem uma origem e diversificação recentes de alguns grupos de espécies do gênero e indicam que a combinação *matK* e *rbcL*, por exemplo, proposta como padrão para o *DNA barcoding* vegetal (CBOL, 2009), na maioria dos casos não será suficiente para discriminar espécies proximamente relacionadas de *Echinodorus*.

Em segundo lugar, a amostragem de *Echinodorus* em bancos de dados de nucleotídeos, como o GenBank, ainda é pequena em relação à amplitude de distribuição geográfica e variabilidade morfológica do gênero. Para *E. macrophyllus*, por exemplo, com ocorrência em todo o Brasil e na Bolívia (GOVAERTES, 2023), existe apenas uma amostra depositada no GenBank. Finalmente, também não é possível descartar a possibilidade de identificações conflitantes entre nossa amostra e àquelas do GenBank.

Em geral, a identificação de espécies relacionadas e morfologicamente semelhantes de *Echinodorus* é difícil e requer conhecimentos taxonômicos especializados. A utilização de sequências de DNA pode representar um grande

diferencial nesse sentido, principalmente quando se trata da certificação de amostras secas processadas para a indústria, quando a identificação baseada em caracteres morfológicos não é possível. No entanto, isso exigirá maior amostragem populacional e geográfica de espécies e o uso de marcadores mais polimórficos e informativos, como os marcadores nucleares 5S-NTS e *Leafy*, que se mostraram os mais diversificados entre os testados (**Tabela 27**), e, portanto, podem ser bons candidatos para um exame inicial.

**Tabela 24.** Melhores correspondências entre as sequências de *Echinodorus macrophyllus* (MHNJB) e aquelas do banco de dados GenBank usando *Blastn*.

| Marcador         | Melhores combinações               | %<br>Similaridade | Identities<br>Pb | Consulta<br>(%) | Número de<br>Acesso |
|------------------|------------------------------------|-------------------|------------------|-----------------|---------------------|
| ITS              | <i>Echinodorus osiris</i>          | 99,56             | 684/687          | 100             | KT437651            |
|                  | <i>Echinodorus longiscapus</i>     | 99,42             | 683/687          | 100             | KT437653            |
|                  | <i>Echinodorus portoalegrensis</i> | 99,42             | 683/687          | 100             | KT437648            |
| <i>psbA-trnH</i> | <i>Echinodorus barthii</i>         | 99,27             | 682/687          | 100             | KT437652            |
|                  | <i>Echinodorus opacus</i>          | 99,13             | 681/687          | 100             | KT437650            |
|                  | <i>Echinodorus paniculatus</i>     | 100,00            | 463/463          | 100             | HM367285            |
|                  | <i>Echinodorus grandiflorus</i>    | 99,78             | 462/463          | 100             | HM367294            |
|                  | <i>Echinodorus longiscapus</i>     | 99,78             | 462/463          | 100             | HM367292            |
|                  | <i>Echinodorus muricatus</i>       | 99,57             | 462/464          | 100             | DQ786514            |
|                  | <i>Echinodorus cordifolius</i>     | 99,35             | 460/463          | 100             | HM367302            |
| <i>matK-trnK</i> | <i>Echinodorus paniculatus</i>     | 99,85             | 1309/1311        | 100             | OK587808            |
|                  | <i>Echinodorus cordifolius</i>     | 99,85             | 1309/1311        | 100             | OK587807            |
|                  | <i>Echinodorus paniculatus</i>     | 99,85             | 1309/1311        | 100             | EF088097            |
|                  | <i>Echinodorus longiscapus</i>     | 99,77             | 1308/1311        | 100             | EF088112            |
|                  | <i>Echinodorus grandiflorus</i>    | 99,69             | 1307/1311        | 100             | EF088113            |
|                  | <i>Echinodorus cordifolius</i>     | 99,07             | 212/214          | 100             | HM367210            |
| Leafy            | <i>Echinodorus paniculatus</i>     | 99,07             | 212/214          | 100             | EF088144            |
|                  | <i>Echinodorus uruguayensis</i>    | 98,60             | 211/214          | 100             | EF088159            |
|                  | <i>Echinodorus cordifolius</i>     | 98,60             | 211/214          | 100             | EF088172            |
|                  | <i>Echinodorus bracteatus</i>      | 98,60             | 212/215          | 100             | EF088170            |

Legenda: pb: pares de base; consulta: porcentagem de alinhamento da sequência obtida com a disponível no GenBank; % similaridade: dentro do encaixe dos pares de bases é definido a similaridade entre os pares de bases obtidos e as depositadas no GenBank.

**Tabela 25.** Caracterização dos marcadores utilizados nas análises filogenéticas.

| Marcador         | Terminais | Caracteres | VI (%)      | IC   | IR   | Modelos<br>(hLRTs) |
|------------------|-----------|------------|-------------|------|------|--------------------|
| ITS              | 37        | 725        | 100 (13,8%) | 0,71 | 0,8  | GTR+G              |
| 5S-NTS           | 28        | 266        | 98 (36,8%)  | 0,68 | 0,7  | HKY+G              |
| LEAFY            | 43        | 306        | 33 (10,8%)  | 0,93 | 0,95 | K80+G              |
| <i>matK-trnK</i> | 35        | 1311       | 164 (12,5%) | 0,86 | 0,92 | GTR+G              |
| <i>psbA-trnH</i> | 46        | 574        | 108 (18,8%) | 0,81 | 0,91 | GTR+G              |

Combinado 47 3182 503 (15,8%) 0,73 0,82

Legenda: VI = número de caracteres informativos variáveis; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. hLRTs = testes hierárquicos de razão de verossimilhança.

**Tabela 26.** Distâncias médias dentro e entre os principais clados recuperados na análise filogenética. As distâncias médias dentro dos grupos são destacadas em negrito.

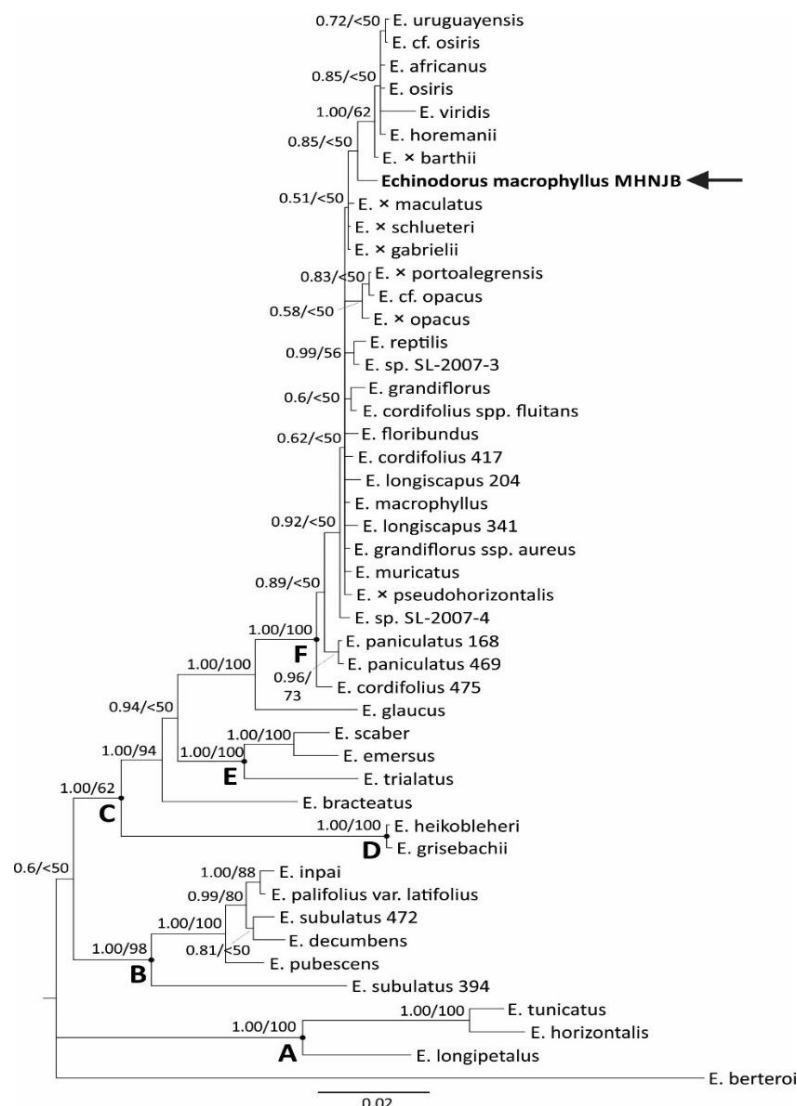
|                         | N  | 1            | 2          | 3            | 4          | 5            | 6            | 7            | 8          |
|-------------------------|----|--------------|------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| 1. Clado F              | 30 | <b>0,007</b> |            |              |            |              |              |              |            |
| 2. <i>E. glaucus</i>    | 1  | 0,029        | <b>n/c</b> |              |            |              |              |              |            |
| 3. Clado E              | 3  | 0,051        | 0,052      | <b>0,026</b> |            |              |              |              |            |
| 4. <i>E. bracteatus</i> | 1  | 0,042        | 0,050      | 0,046        | <b>n/c</b> |              |              |              |            |
| 5. Clado D              | 2  | 0,071        | 0,073      | 0,073        | 0,068      | <b>0,001</b> |              |              |            |
| 6. Clado B              | 6  | 0,065        | 0,067      | 0,065        | 0,059      | 0,078        | <b>0,022</b> |              |            |
| 7. Clado A              | 3  | 0,094        | 0,089      | 0,090        | 0,090      | 0,095        | 0,092        | <b>0,037</b> |            |
| 8. <i>E. berteroi</i>   | 1  | 0,109        | 0,112      | 0,109        | 0,107      | 0,121        | 0,111        | 0,134        | <b>n/c</b> |

Legenda: N: indica o número de terminais em cada grupo. n/c: casos em que não foi possível estimar distâncias evolutivas.

**Tabela 27.** Distâncias médias aos pares para cada marcador dentro dos principais clados recuperados na análise filogenética.

|         | ITS   | 5S-NTS | LEAFY | <i>matK-trnK</i> | <i>psbA-trnH</i> | combinado |
|---------|-------|--------|-------|------------------|------------------|-----------|
| Clado F | 0,008 | 0,062  | 0,015 | 0,003            | 0,004            | 0,007     |
| Clado E | 0,033 | 0,067  | 0,047 | 0,012            | 0,025            | 0,026     |
| Clado D | 0,003 | 0,004  | 0,000 | 0,000            | 0,000            | 0,001     |
| Clado B | 0,043 | 0,167  | 0,019 | 0,008            | 0,015            | 0,022     |
| Clado A | 0,019 | 0,127  | 0,029 | 0,025            | 0,058            | 0,037     |

**Figura 17.** Consenso de maioria de 50% da análise Bayesiana da matriz combinada ITS, 5S-NTS, LEAFY *matK-trnK* e *psbA-trnH*. Os números próximos aos nós representam as probabilidades posteriores (PP) da análise bayesiana e as porcentagens *bootstrap* (BP) da análise de parcimônia, respectivamente. Os principais clados discutidos no texto são indicados pelas letras de A a F. A amostra sequenciada de *E. macrophyllus* está destacada em negrito e por uma seta. Os nomes genéricos de todas as espécies de *Echinodorus* estão abreviados.



A identificação em nível de espécie não foi possível para *E. macrophyllus* utilizando os marcadores descritos neste trabalho, considerando a quantidade atual de sequências de referência de espécies (códigos de barras de DNA vouchers) depositados no *GenBank*, além de nenhuma das sequências depositadas ser de espécimes brasileiros. O número reduzido de sequências genéticas disponíveis nos bancos associado à diversidade genética dentro de um mesmo gênero foi discutida por Palhares e colaboradores (2015) e apontadas como fatores dificultadores para determinação de um código genético para plantas medicinais, acarretada a dificuldade de identificação das espécies vegetais baseada em análises moleculares. Ainda, os autores apontam a dificuldade em diferenciar espécies intimamente relacionadas e a necessidade de identificação de novos *primers*, obtenção de novas sequências e o desenvolvimento de tecnologias mais estreitas para análise de espécies vegetais de mesmo gênero.

A despeito das dificuldades supracitadas, o emprego de análise molecular para identificação inequívoca de espécies de plantas medicinais é considerado inovadora para o controle de qualidade da produção de fitoterápicos e os dados disponíveis na literatura sobre essa metodologia são ainda incipientes (PALHARES et al., 2015). Cabe ressaltar, ainda, que essa abordagem é inédita para as espécies conhecidas como chapéu-de-couro, que possuem mesmo uso tradicional para tratamento de artrites e reumatismo. Os resultados aqui relatados não indicam diferenças marcadores analisados que possibilitem diferenciar *E. macrophyllus* de *E. grandiflorus* ou de outras espécies de *Echinodorus*.

#### **5.4 Avaliação *in vitro* do potencial efeito anti-inflamatório de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus***

Tendo em vista que as análises realizadas indicaram similaridade nos teores de marcadores químicos de *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, bem como semelhanças genéticas entre elas, impossibilitando a diferenciação inequívoca das espécies, avaliou-se o potencial efeito anti-inflamatório das mesmas, visando identificar eventuais diferenças. Para tanto, extratos preparados com diferentes drogas vegetais de folhas de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e de *E. grandiflorus* foram avaliados em ensaio *in vitro* de inibição da liberação de TNF por células THP-1 estimuladas por LPS.

Nenhum dos extratos ensaiados foi citotóxico para as células THP-1 na concentração de 60 µg/mL, apresentando viabilidade celular superior a 90% nos métodos da SRB e MTT. Adicionalmente, os extratos e a dexametasona (Dx), empregada como controle positivo, não induziram a liberação de TNF na ausência do estímulo inflamatório (LPS), indicando ausência de efeito pró-inflamatório.

Os diferentes extratos obtidos dos três materiais vegetais, apresentaram resultados similares para inibição da liberação de TNF em células THP-1 estimuladas por LPS na concentração 60 µg/mL (**Figura 18**). Nenhum dos extratos obtidos com EtOH 90% apresentou redução significativa desta citocina, exceto o obtido para DV1. Já para o extrato obtido com EtOH 96 °GL apenas o obtido de DV2 promoveu 44,11% ± 2,09 de inibição. Todos os extratos obtidos com EtOH 70% e EtOH 50% induziram redução da liberação de TNF, sendo obtidos os seguintes valores de percentuais de inibição para EtOH 70% (DV1: 61,89% ± 2,98; DV2: 27,78 ± 5,47 e DVMus: 34,43 ± 4,69) e EtOH 50% (DV1: 46,57 ± 10,15; DV2: 24,77 ± 0,35; DVMus: 26,11 ± 2,41).

Nas análises estatísticas realizadas entre os grupos, observa-se que os extratos EtOH 70% e EtOH 50%, preparados a partir de DV2, induziram inibição de TNF similar àquela dos extratos preparados com DVMus, os quais diferiram dos resultados obtidos com o extrato EtOH 70% e EtOH 50% de DV1. Por sua vez, a redução da secreção de TNF promovida pelos extratos preparados com DV1 diferiu dos demais extratos obtidos a partir de DV2 e DVMus. Cabe ressaltar, ainda, que os extrato EtOH 70% e EtOH 50% de DV1 e DVMus se mostraram mais ativos, sem diferenças estatísticas na comparação entre esses dois grupos.

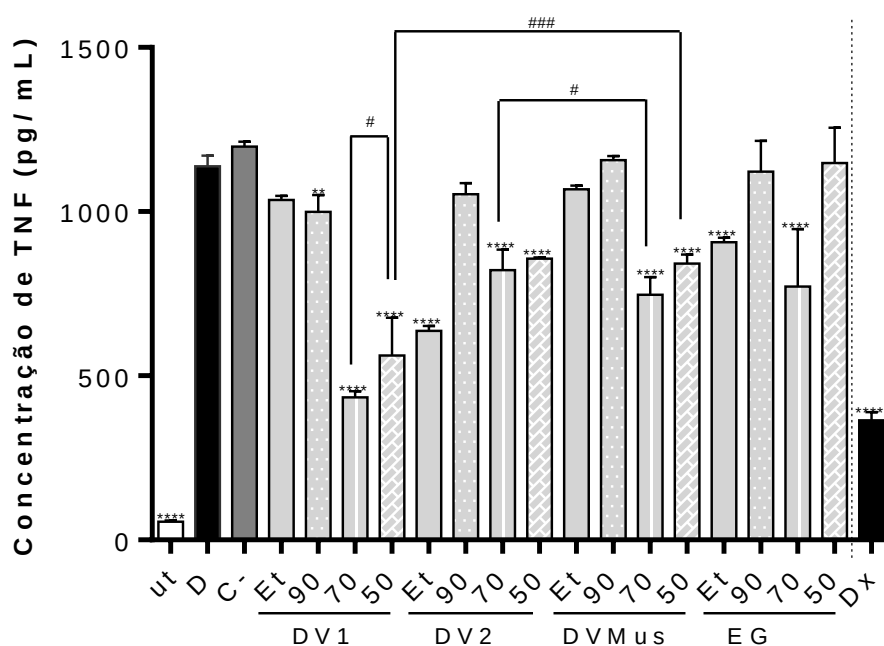
Já para *E. grandiflorus*, o extrato EtOH 96°GL apresentou redução significativa de TNF ( $20,38\% \pm 0,50$ ), enquanto o extrato EtOH 70% reduziu  $32,18\% \pm 6,18$  da liberação do mediador pró-inflamatório. De maneira semelhante à observada para *E. macrophyllus*, o extrato EtOH 90% de *E. grandiflorus* não reduziu significativamente a excreção de TNF. Diferentemente de todos os extratos EtOH 50% obtidos para *E. macrophyllus*, o extrato EtOH 50% desta espécie não apresentou redução significativa de TNF.

A avaliação da inibição da liberação de TNF pelos extratos EtOH 70% e EtOH 50% de *E. grandiflorus* foi previamente relatada por nosso grupo de pesquisa (GARCIA et al., 2016). Neste estudo, os autores identificaram inibição da liberação de TNF de  $100 \pm 0,0\%$  e  $66,7 \pm 5,0\%$ , respectivamente para os extratos EtOH 50% e EtOH 70%, avaliados na concentração de  $30 \mu\text{g/mL}$ . No entanto, neste trabalho foi encontrado um valor de  $32,18\% \pm 6,18$  para o extrato EtOH 70% e redução na significativa de TNF no extrato EtOH 50%, diferentemente do relatado por Garcia e colaboradores (2016). Essa diferença de atividade pode estar relacionada à menor concentração de C-glicosídeos flavônicos como a homoorientina, pois nesse trabalho foi quantificado menor teor de homoorientina ( $0,73 \pm 0,007\%$ ) em comparação com o trabalho de Garcia e colaboradores (2016) ( $1,17 \pm 0,018\%$ ), e os autores correlacionaram a atividade anti-inflamatória principalmente com a presença desses compostos.

Em geral, os extratos que apresentaram maior atividade inibitória sobre a secreção de TNF (70% EtOH e 50% EtOH) foram aqueles com maior teor de ácidos aconíticos e derivados do ácido tartárico. Esses dados corroboram os achados de Silva e colaboradores (2022), que identificaram a diminuição nos níveis de TNF e IL- $1\beta$  após tratamento com uma fração enriquecida em derivados do ácido tartárico de *E. macrophyllus* em modelo *in vivo* de inflamação aguda induzida por bolsa de ar.

Nesse contexto, apenas a avaliação da atividade biológica de inibição do TNF isoladamente não é suficiente para diferenciar as espécies, pois ambas apresentam composição química e dados de redução do TNF semelhantes.

**Figura 18.** Inibição da liberação de TNF em células THP-1 estimuladas com LPS induzida pelos extratos de folhas de *E. macrophyllus* preparados com drogas vegetais distintas (DV1, DV2 e DVMus) e *E. grandiflorus* (EG). Os dados representam a média  $\pm$  DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. \* Indica a diferença significativa com o grupo controle de células tratadas com o solvente DMSO e estimuladas com LPS (C-) (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , #### $p < 0,0001$ ####, ANOVA, pós-teste de Dunnett). Ut: células não tratadas; D: células + LPS (1 ng/mL/poço); C-: solvente DMSO + LPS (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); Et: extrato etanólico 96°GL; 90: extrato hidroetanólico a 90%; 70: extrato hidroetanólico a 70%; 50: extrato hidroetanólico a 50%.



### 5.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*

A relação entre a atividade anti-inflamatória e a atividade antioxidante já foi demonstrada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Assim, visando explorar as atividades biológicas das espécies conhecidas como chapéu-de-couro, avaliamos a

atividade antioxidante dos extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e de *E. grandiflorus* (EG) nos modelos *in vitro* de DPPH (item 4.11.1), co-oxidação do  $\beta$ -caroteno (item 4.11.2) e inibição da produção de ROS (item 4.11.3). Adicionalmente, esta avaliação almejou identificar eventuais diferenças nas respostas biológicas induzidas por *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*.

Os extratos preparados a partir de DV1 de *E. macrophyllus* foram consideravelmente mais ativos no ensaio de DPPH que aqueles obtidos com DV2 e DVMus, com valores de  $EC_{50}$  inferiores a 200  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o extrato EtOH 50% o mais ativo ( $CE_{50} = 109,6 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ ) (**Tabela 28**). Por outro lado, somente o extrato EtOH 70% de *E. grandiflorus* resultou em valor de  $CE_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$  ( $135,2 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$ ). Silva e colaboradores (2022) avaliaram o potencial antioxidante de frações derivadas do extrato aquoso de *E. macrophyllus* (400  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo método DPPH, resultando em redução de cerca de 70% do radical DPPH induzido pelas frações, comparado com os controles positivos ácido gálico (87,8% de inibição, 4,17 mM) e ácido ascórbico (82–84,2% de inibição, 4,17 mM). Ainda, essas frações com propriedade antioxidante apresentaram maior redução de células inflamatórias em modelos *in vivo*, portanto, os autores correlacionaram a ação antioxidante como um mecanismo anti-inflamatório fundamental para os resultados encontrados. Adicionalmente, Lunardi e colaboradores (2014) relataram a captura de  $41,3 \pm 1,1\%$  de radicais DPPH induzida pelo extrato aquoso (0,8% m/v) de *E. grandiflorus*. Os dados relatados na literatura corroboram com a redução do DPPH pelos extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* que variaram entre 13,9 – 76,1%.

Quanto ao ensaio de co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno / ácido linoleico, os extratos DV2 de *E. macrophyllus* foram menos ativos que os demais, sendo que apenas o extrato EtOH 50% apresentou  $CI_{50}$  inferior a 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $23,9 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ ). No entanto, os extratos preparados a partir de DV1 e DVMus foram ativos no modelo, com exceção do extrato EtOH 96°GL de DV1, que apresentou  $CI_{50}$  maior que 200  $\mu\text{g/mL}$ . Para todas as drogas vegetais, os extratos mais ativos foram EtOH 50% ( $40,1 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ , DV1 e  $17,7 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ , DV2). Todos os extratos de *E. grandiflorus* foram ativos neste modelo, com  $CI_{50}$  inferior a 200  $\mu\text{g/mL}$ , sendo o extrato EtOH 50% o mais ativo ( $CI_{50} 6,8 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ) (**Tabela 28**).

**Tabela 28.** Atividade antioxidante de extratos de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e *E. grandiflorus* (EG) avaliada *in vitro* nos modelos de captura dos radicais DPPH e co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e efeito de extratos selecionados sobre ROS produzidas por células THP-1 estimuladas por LPS.

| Droga vegetal | Extrato    | DPPH (CE <sub>50</sub> $\mu$ g/mL $\pm$ DP) | $\beta$ -caroteno (CI <sub>50</sub> $\mu$ g/mL $\pm$ DP) | ROS (% redução)             |
|---------------|------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| DV1           | EtOH 96°GL | > 200 <sup>a</sup>                          | > 200 <sup>a</sup>                                       | NA                          |
|               | EtOH 90%   | 140,2 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>                | 44,4 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>                              | NA                          |
|               | EtOH 70%   | 139,2 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>                | 41,7 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>                              | NA                          |
|               | EtOH 50%   | 109,6 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>                | 40,1 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>                              | 8,8 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>  |
| DV2           | EtOH 96°GL | > 200 <sup>a</sup>                          | > 200 <sup>a</sup>                                       | NA                          |
|               | EtOH 90%   | > 200 <sup>a</sup>                          | > 200 <sup>a</sup>                                       | NA                          |
|               | EtOH 70%   | > 200 <sup>a</sup>                          | > 200 <sup>a</sup>                                       | NA                          |
|               | EtOH 50%   | > 200 <sup>a</sup>                          | 23,9 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>                              | 15,2 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup> |
| DVMus         | EtOH 96°GL | 180,8 $\pm$ 1,5 <sup>d</sup>                | 22,6 $\pm$ 1,6 <sup>c</sup>                              | NA                          |
|               | EtOH 90%   | > 200 <sup>a</sup>                          | 36,0 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>                              | NA                          |
|               | EtOH 70%   | > 200 <sup>a</sup>                          | 32,8 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>                              | NA                          |
|               | EtOH 50%   | > 200 <sup>a</sup>                          | 17,7 $\pm$ 1,5 <sup>d</sup>                              | 17,1 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup> |
| EG            | EtOH 96°GL | > 200 <sup>a</sup>                          | 8,7 $\pm$ 1,5 <sup>e</sup>                               | NA                          |
|               | EtOH 90%   | > 200 <sup>a</sup>                          | 11,9 $\pm$ 1,4 <sup>f</sup>                              | NA                          |
|               | EtOH 70%   | 135,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>                | 8,3 $\pm$ 1,1 <sup>e</sup>                               | NA                          |
|               | EtOH 50%   | > 200 <sup>a</sup>                          | 6,8 $\pm$ 1,5 <sup>g</sup>                               | 19,4 $\pm$ 6,7 <sup>d</sup> |

**Legenda:** DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; NA: não analisado; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50%; EC<sub>50</sub>: concentração efetiva de 50%; DP: desvio padrão; DV1: *E. macrophyllus* amostra comercial 1; DV2: *E. macrophyllus* amostra comercial 2; DVMus: amostra de *E. macrophyllus* UFMG; EG.: amostra comercial de *E. grandiflorus*; EtOH 96°GL: extrato de etanol 96°GL; EtOH 90%: extrato hidroetanólico 90%; EtOH 70%: extrato hidroetanólico 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico 50%. As diferenças entre as concentrações médias dos extratos foram analisadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes dentro das colunas indicam diferenças significativas.

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados relatos de avaliação da atividade antioxidante de espécies do gênero *Echinodorus* no modelo de co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno / ácido linoleico, demonstrando o ineditismo dos dados aqui relatados.

Entre os extratos obtidos com as diferentes drogas vegetais de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*, aqueles preparados com EtOH 50% foram os que apresentaram maior potencial antioxidante, o que possivelmente está relacionado ao maior teor de flavonoides-C-glicosilados e derivados do ácido tartárico, conforme relatado no item 5.1.4. Esses dados corroboram com diversos relatos de revisões na literatura que indicam a ação antioxidante de derivados fenólicos (RANI et al., 2018; GASPAROTTO et al., 2019).

É importante ressaltar as limitações associadas aos ensaios *in vitro* de atividade antioxidante. Relatos na literatura indicam que a avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH não deve ser considerada isoladamente pois ele

é pouco discriminativo, podendo ocorrer reações inespecíficas de complexação com diversos constituintes químicos de matrizes vegetais, especialmente compostos fenólicos, ao eliminar radicais ao doar elétrons de hidroxilas fenólicas (BIBI-SADEER et al., 2020). Já o modelo de co-oxidação de  $\beta$ -caroteno / ácido linoleico avalia a inibição da peroxidação lipídica, sendo um modelo mais complexo, que permite avaliar diferentes mecanismos de ação antioxidante (AMORATI et al., 2015). Cabe destacar que ambos os modelos são relevantes na avaliação do potencial antioxidante de amostras complexas (PIETRO et al., 2012).

Para investigar o potencial antioxidante *in vitro* de amostras de interesse é importante utilizar diferentes modelos, sendo recomendado uso de três modelos distintos. Assim, além do método de captura dos radicais DPPH e co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, no presente trabalho avaliamos a redução da liberação de ROS em cultura de células em condições pró-inflamatórias (GEORGIANA-MUNTEANU; APETREI, 2021).

Uma vez que os extratos preparados com EtOH 50% a partir de *E. macrophyllus* (DV1, DV2 e DVMus) e *E. grandiflorus* apresentaram atividade antioxidante no ensaio de co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, em comparação com os demais extratos oriundos das mesmas drogas vegetais, eles foram selecionados para posterior avaliação biológica. Sendo assim, estes extratos tiveram seu efeito avaliado sobre a produção de ROS por células THP-1 estimuladas com LPS. A inibição da produção de ROS em condições pró-inflamatórias induzida pelos extratos foi pouco expressiva, sendo a maior inibição induzida pelo extrato de *E. grandiflorus* ( $19,4 \pm 6,7\%$ ), enquanto a menor inibição foi observada para o extrato obtido de DV1 ( $8,8 \pm 6,6\%$ ), conforme mostrado na **Tabela 28**. A inibição da produção de ROS também está associada com compostos fenólicos (CONFORTI; MENICHINI, 2011; ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al. 2019). Substâncias dessa classe estão presentes em maior concentração nos extratos EtOH 50% selecionados para avaliação, que justificaria a inibição de ROS encontrada, mesmo que não significativa.

Os dados de atividade antioxidante e inibição da liberação de TNF descritos neste trabalho são inéditos para *E. macrophyllus*. Investigações demonstram que a produção de espécies reativas de oxigênio é desencadeada pelo próprio funcionamento do organismo e/ou por estímulos ambientais. Quando ocorre um desequilíbrio entre as espécies reativas produzidas e as defesas antioxidantes naturais do organismo, desencadeia-se o estresse oxidativo, que contribui para o

desenvolvimento de um estado inflamatório crônico adjacente a diversas doenças, como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios oculares, artrite, obesidade, doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais (ARULSELVAN et al., 2016).

Doenças inflamatórias crônicas caracterizam-se pela interação entre variados fatores, sejam celulares, como os neutrófilos, e/ou moleculares, como as citocinas e o sistema do complemento. É sabido que espécies reativas de oxigênio contribuem para a acentuação do processo inflamatório, pois podem iniciar a cascata de sinalização intracelular que aumenta a expressão gênica pró-inflamatória, ocasionado os casos de inflamação na artrite (BISWASS, 2016). No entanto, a causa das doenças inflamatórias crônicas é multifatorial, e está associada à migração de neutrófilos para a cavidade articular e ao aumento de citocinas. Portanto, terapias que atinjam múltiplos alvos, como os produtos naturais, configuram importante alternativa no desenvolvimento de novos tratamentos para a AR (PAOLIELLO-PASCHOALATO et al., 2015). Dessa forma, substâncias capazes de reduzir a liberação de ROS podem contribuir com a redução da fisiopatologia da AR e da OA. Ainda, a ação antioxidante também pode se dar de forma indireta, ao aumentar o sistema antioxidante enzimático do organismo realizado pelas enzimas superóxido dismutases (SOD), contribuindo com o efeito antioxidante por diferentes mecanismos (BIRBEN et al., 2012).

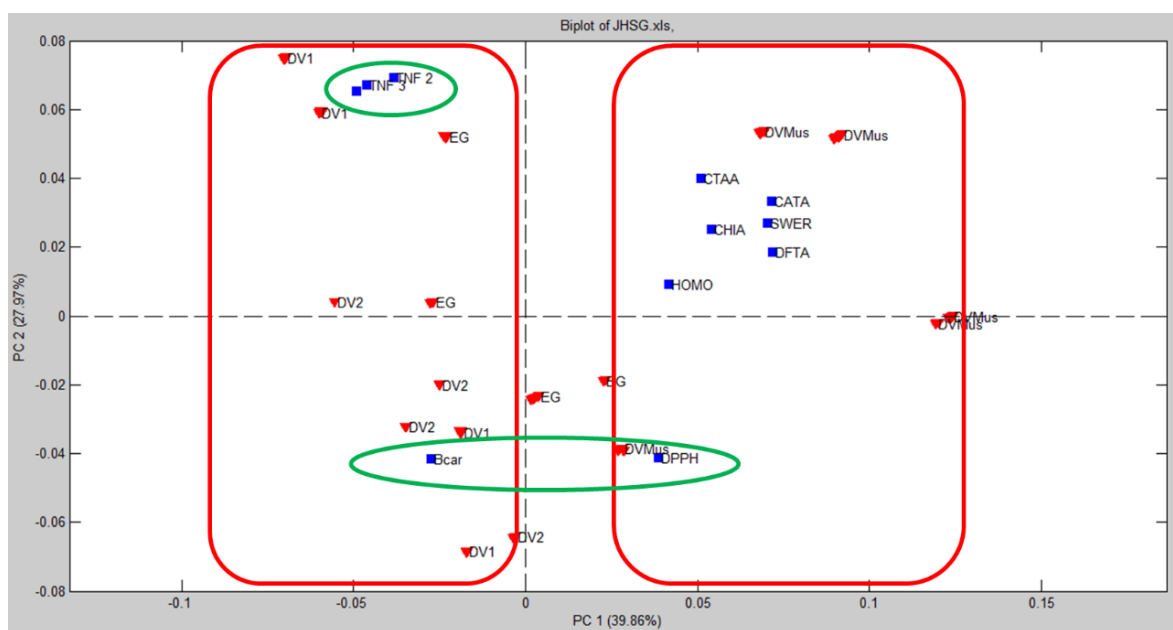
## 5.6 Análises quimiométricas

Tendo em vista que os resultados dos teores de marcadores químicos (item 5.1.4) e atividades biológicas *in vitro* (itens 5.3 e 5.4) dos extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* não possibilitaram a diferenciação das amostras, um modelo exploratório de classificação não supervisionada de Análise de Componente Principal (PCA) foi construído para investigar as similaridades entre as espécies. Para tanto, os extratos foram alocados nas linhas e os marcadores químicos (ácido *cis*- e *trans*-aconítico, CTAA; homoorientina, HOMO; swertisina, SWER; ácido chicórico, CHA; ácido cafeoil-feruloil-tartárico, CATA; e ácido diferuloil-tartárico, DFTA) foram colocados nas colunas, juntamente com os dados dos ensaios biológicos (peroxidação lipídica no ensaio de co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, Bcar; captação do radical DPPH, DPPH; e inibição da liberação de TNF, TNF), gerando uma matriz de dimensões 144 × 11. Os dados foram pré-processados por escalonamento

automático para fornecer pesos iguais para todas as variáveis investigadas em ambos os métodos (BRO; SMILDE, 2014).

Os resultados obtidos para o modelo PCA são representados na **Figura 19** como um *biplot* de PC1 × PC2. Um biplot é uma representação gráfica que mostra simultaneamente as relações entre pontuações (descrevendo amostras) e cargas (descrevendo variáveis). Um modelo com dois PCs foi responsável por 67,83% dos dados totais de variância. Neste modelo, nenhuma amostra apresentou resíduos Q acima do limite ao nível de confiança de 95%, indicando ausência de *outliers*. PC1 foi responsável por 39,86% da variância e discriminou amostras de DVMus (pontuações positivas) de DV1/DV2 (pontuações negativas), sendo esses dois agrupamentos representados por retângulos vermelhos na **Figura 19**.

**Figura 19.** *Biplot* fornecido pelo modelo de PCA construído para *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* com base na composição química quantitativa e atividade biológica *in vitro* dos extratos. Triângulos vermelhos representam *loadings* / amostras e quadrados azuis representam *scores* / variáveis.



Legenda: ácido *cis*- e *trans*-aconítico: CTAA; homoorientina: HOMO; swertisina: SWER; ácido chicórico: CHA; ácido cafeoil-feruloil-tartárico: CATA; e ácido diferuloil-tartárico: DFTA; Bcar: peroxidação lipídica no ensaio de co-oxidação β-caroteno/ácido linoléico; DPPH: captação do radical DPPH; TNF: inibição da liberação de TNF.

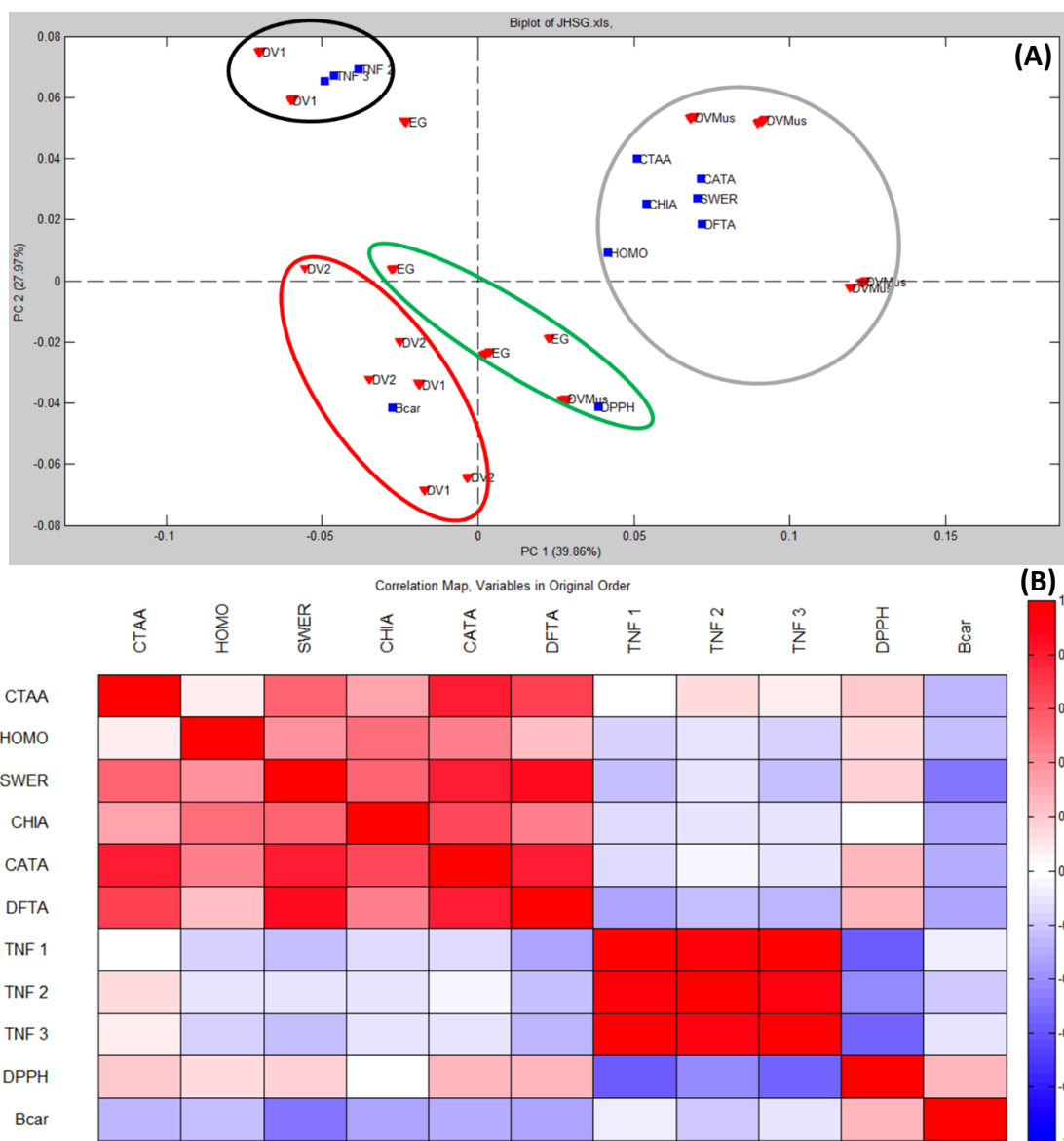
As amostras EG não foram claramente discriminadas pelo modelo de PCA, mesmo quando se considerou PC3 na análise (responsável por 10,8% da variância dos dados; resultados não mostrados) e, portanto, não foi possível atribuir sua

similaridade a nenhuma das amostras avaliadas de *E. macrophyllus*. Portanto, a análise de PC1 deste modelo permitiu concluir que a variação intraespecífica entre as diferentes drogas vegetais de *E. macrophyllus* é maior do que a variação interespecífica entre as duas espécies. Por sua vez, as atividades anti-inflamatória (TNF) e antioxidante (DPPH/Bcar) foram descritas por PC2 (27,97%), com cargas positivas e negativas, respectivamente, identificadas pelos círculos verdes.

Na **Figura 19**, as amostras foram agrupadas em função dos scores / amostras em PC1. Visando uma melhor visualização das interrelações, a **Figura 20A** mostra o mesmo *biplot* PCA da **Figura 19**, mas com *clusters* marcados em função das cargas / variáveis. Conforme ilustrado nesta figura, a inibição da liberação de TNF está relacionada a DV1, sugerindo uma correlação positiva entre essas variáveis (vide elipse preta). O *biplot* também indica que a atividade antioxidante Bcar é mais fortemente associada a DV2 (elipse vermelha), enquanto a atividade antioxidante DPPH é fracamente correlacionada com EG (elipse verde). Por sua vez, os marcadores químicos (CTAA, HOMO, SWER, CHA, CATA e DFTA) estão positivamente correlacionados com DVMus (círculo cinza na **Figura 20A**), o que é consistente com as concentrações usualmente maiores desses constituintes nos extratos oriundos desta droga vegetal.

Um *heatmap* também foi gerado para caracterizar a relação entre as variáveis analisadas (**Figura 20B**). A inibição da liberação de TNF apresentou correlações positivas fracas com CTAA (TNF-1  $r = 0,0198$ ; TNF-2  $r = 0,1543$ ; e TNF-3  $r = 0,0732$ ), que, por sua vez, se correlacionou moderadamente com atividade antioxidante DPPH ( $r = 0,2149$ ). A atividade antioxidante DPPH apresentou correlações fracas/moderadas com todos os marcadores químicos testados: HOMO ( $r = 0,1545$ ), SWER ( $r = 0,1654$ ), CHIA ( $r = 0,303$ ), CATA ( $r = 0,2755$ ) e DFTA ( $r = 0,2507$ ). Por outro lado, esses marcadores químicos correlacionaram negativamente com a atividade antioxidante Bcar: CTAA  $r = -0,2709$ ; HOMO,  $r = -0,2344$ ; SWER,  $r = -0,4801$ ; CHIA,  $r = -0,3293$ ; CATA,  $r = -0,2847$ ; DFTA,  $r = -0,3321$ . Esses resultados aparentemente controversos podem estar relacionados às diferenças nos ensaios antioxidantes empregados, uma vez que o DPPH é baseado na captação de radicais, enquanto o teste de  $\beta$ -caroteno é baseado na inibição da peroxidação lipídica, provocando respostas distintas por parte dos constituintes dos extratos (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

**Figura 20.** O mesmo *biplot* PCA da Figura 19 mostrando agrupamentos de variáveis. Triângulos vermelhos representam pontuações e quadrados azuis representam cargas. (B) *Heatmap* de teores de marcadores químicos e atividade biológica. CATA, ácidos *cis*- e *trans*-aconítico; HOMO, homoorientina; SWER, swertisina; CHIA, ácido chicórico; CATA, ácido cafeoil-feruloil-tartárico; TNF 1, 2 e 3 (inibição da liberação de TNF); Bcar, peroxidação lipídica no ensaio de co-oxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico; e DPPH, ensaio de captação de radicais DPPH.



Legenda: ácido *cis*- e *trans*-aconítico: CTAA; homoorientina: HOMO; swertisina: SWER; ácido chicórico: CHA; ácido cafeoil-feruloil-tartárico: CATA; e ácido diferuloil-tartárico: DFTA. Bcar: ensaio antioxidante cooxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

A inibição da peroxidação lipídica é considerada um método mais complexo e seletivo para identificar compostos antioxidantes do que o DPPH (PIETRO et al., 2012). Já o ensaio de DPPH pode responder inespecificamente a vários compostos e

deve ser analisado associado a outro teste antioxidante (BIBI-SADEER et al., 2020). Dados da literatura indicaram baixa correlação entre os resultados do teste DPPH e outros ensaios antioxidantes (KOLEVA et al., 2002) como foi observado aqui para a baixa correlação positiva com o ensaio de  $\beta$ -caroteno ( $r = 0,2690$ ).

Os resultados de PCA demonstraram claramente as semelhanças na composição química quantitativa e nas atividades biológicas dos extratos de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*, o que está de acordo com relatos anteriores (GILBERT et al., 2022). A PCA não foi capaz de discriminar *E. grandiflorus* das amostras de *E. macrophyllus* analisadas. Os marcadores químicos analisados mostraram correlação mais forte com DVMus, o que levou à discriminação entre espécimes de *E. macrophyllus* (DVMus versus DV1 e DV2). Esses mesmos marcadores químicos, cujos carregamentos estão na parte positiva de PC1, não apresentaram correlação significativa com os extratos de *E. grandiflorus*. Portanto, podemos sugerir que *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* não podem ser discriminados pela quantificação desses marcadores químicos e pelas atividades biológicas avaliadas neste estudo.

Nossos resultados também demonstraram que os dois lotes comerciais de *E. macrophyllus* (DV1 e DV2) possuem teores semelhantes dos marcadores químicos ensaiados e induzem atividades biológicas semelhantes. Por sua vez, o modelo PCA indicou que DVMus difere de DV1 e DV2 pela concentração de marcadores químicos. Tal diferença pode ser atribuída ao fato de que DVMus foi coletado de um único espécime cultivado, enquanto DV1 e DV2 são lotes comerciais produzidos pela coleta de vários espécimes, cultivados em diferentes ambientes, o que pode afetar seus perfis químicos (PANG et al., 2021).

## **5.7 Ensaios extrativos para obtenção de extrato padronizado de *E. macrophyllus***

Os ensaios extrativos foram realizados para definir as condições de obtenção do extrato padronizado de *E. macrophyllus* a ser empregado no desenvolvimento da formulação farmacêutica. Os ensaios foram realizados em triplicata, com um único lote da droga vegetal adquirida de fonte comercial (DV1).

### **5.7.1 Ensaios extrativos**

O ensaio extrativo teve como finalidade avaliar diferentes métodos de extração e solventes extratores para identificar o método que leve a maior rendimento extrativo, visando o desenvolvimento do extrato padronizado e sua aplicação em processos

industriais futuros. Para realização do ensaio extrativo foram escolhidos como solventes o etanol comercial e soluções hidroetanólicas devido a extração da maioria dos constituintes químicos e facilidade de aplicação comercial. Ainda, realizamos o ensaio com acetato de etila para fins de comparação. Os rendimentos extrativos para os ensaios realizados em triplicata estão dispostos na **Tabela 29**.

**Tabela 29.** Rendimentos e massas dos extratos secos obtidas nos ensaios extrativos realizados com *E. macrophyllus* (DV1). Os ensaios extrativos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram analisados por ANOVA comparando-se todos os extratos de todos os grupos por *one way*, com posterior teste de Dunnett para comparação múltipla dos extratos produzidos para cada método extrativo. Nível de significância do teste estatístico foi  $p < 0,05$ . Para os valores obtidos de massa e rendimento extrativo, letras diferentes (a, b e c) representam as diferenças significativas.

| Extratos   | Processo extrativo      | Média massa (g)   | DP massa | Média rendimento (%) | DP rendimento |
|------------|-------------------------|-------------------|----------|----------------------|---------------|
| EtOH 96°GL | Percolação (P)          | 1,71 <sup>a</sup> | 0,14     | 8,6 <sup>a</sup>     | 0,72          |
| EtOH 90%   |                         | 1,95 <sup>a</sup> | 0,74     | 9,8 <sup>a</sup>     | 3,72          |
| EtOH 70%   |                         | 4,16 <sup>b</sup> | 0,21     | 20,8 <sup>b</sup>    | 1,07          |
| EtOH 50%   |                         | 4,43 <sup>b</sup> | 0,25     | 22,1 <sup>b</sup>    | 1,26          |
| AcOEt      |                         | 0,52 <sup>c</sup> | 0,09     | 2,6 <sup>c</sup>     | 0,47          |
| EtOH 96°GL | Maceração estática (ME) | 1,31 <sup>a</sup> | 0,51     | 6,5 <sup>a</sup>     | 2,59          |
| EtOH 90%   |                         | 2,44 <sup>a</sup> | 0,67     | 12,2 <sup>a</sup>    | 3,34          |
| EtOH 70%   |                         | 3,22 <sup>a</sup> | 0,26     | 16,1 <sup>a</sup>    | 1,31          |
| EtOH 50%   |                         | 4,09 <sup>b</sup> | 1,46     | 20,5 <sup>b</sup>    | 7,38          |
| AcOEt      |                         | 0,61 <sup>c</sup> | 0,05     | 3,1 <sup>c</sup>     | 0,23          |
| EtOH 96°GL | Maceração dinâmica (MD) | 1,22 <sup>a</sup> | 0,66     | 6,1 <sup>a</sup>     | 3,35          |
| EtOH 90%   |                         | 2,62 <sup>a</sup> | 0,81     | 13,1 <sup>a</sup>    | 4,01          |
| EtOH 70%   |                         | 3,53 <sup>b</sup> | 0,19     | 17,6 <sup>b</sup>    | 0,95          |
| EtOH 50%   |                         | 4,13 <sup>b</sup> | 0,83     | 20,7 <sup>b</sup>    | 4,15          |
| AcOEt      |                         | 0,48 <sup>c</sup> | 0,06     | 2,4 <sup>c</sup>     | 0,31          |

Legenda: P: percolação; ME: maceração estática; MD: maceração dinâmica; EtOH 96°GL: extrato etanólico; EtOH 90%: extrato hidroetanólico 90%; EtOH 70%: extrato hidroetanólico 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico 50%; AcOEt: extrato em acetato de etila

Em relação ao tempo de extração, o método de maceração dinâmica foi o mais rápido (8 horas) em comparação com a percolação e a maceração estática com renovação de solvente (7 dias). Apesar de mais rápida, na maceração dinâmica é necessária uma etapa de filtragem, assim como na maceração estática, para obtenção do derivado vegetal. Em soluções com altas concentrações de água, esse processo foi dificultado e resultou em perda de material durante o processo devido ao

intumescimento do pó. Além disso, esse método não é o mais viável do ponto de vista industrial, devido ao aumento do número de etapas, com custo adicional, aumento do tempo na produção, além da perda de material durante o processo (KATIIYAR et al., 2012). Esses fatores descritos para a maceração dinâmica foram destacados por Calixto (2000) como limitantes para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos pela indústria farmacêutica.

Os extratos hidroetanólicos a 70% e a 50% foram os que apresentaram maior massa e rendimento. Dentre as técnicas extrativas empregadas, a percolação levou a um maior valor numérico de massa e de rendimento desses extratos em comparação com os métodos de maceração estática com renovação de solvente e maceração dinâmica. No entanto, apenas o extrato EtOH 70% apresentou esse aumento com diferença estatística entre esses. Por outro lado, os rendimentos extrativos mais baixos foram observados para os extratos preparados com acetato de etila e etanol 96 °GL (**Tabela 29**).

Além de ser a uma técnica extrativa que apresentou altos valores de rendimento dentre as avaliadas neste trabalho, a percolação atende as necessidades de produção da indústria farmacêutica, pois permite a obtenção de grandes volumes de extratos vegetais. Na percolação é possível processar grandes quantidades de material sólido com grandes volumes de líquido extrator, de forma contínua e com esgotamento do material vegetal, visando obter o extrato rapidamente e com maior eficiência extrativa (NAVIGLIO et al., 2019).

Os resultados obtidos nos ensaios extrativos indicam que os compostos majoritários presentes no material vegetal de *E. macrophyllus* são de característica hidrofílica, já que o maior rendimento extrativo foi observado para os extratos obtidos com solução extratora com maior proporção de água. Esses dados corroboram os achados de Silva e colaboradores (2016), que realizaram um estudo químico do extrato aquoso de folhas de *E. macrophyllus*, e evidenciaram majoritariamente a presença de flavonoides, evidenciando o maior rendimento de extratos com maior proporção de água. Outros autores também analisaram o rendimento e a composição química de diferentes extratos obtidos de *E. macrophyllus*, utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e extrato hidroetanólico a 75% como solventes extratores. O último apresentou o maior rendimento (1,25%*m/m*) e nele foram identificados metabólitos polares como flavonas e flavonóis (TANUS-RANGEL, 2010).

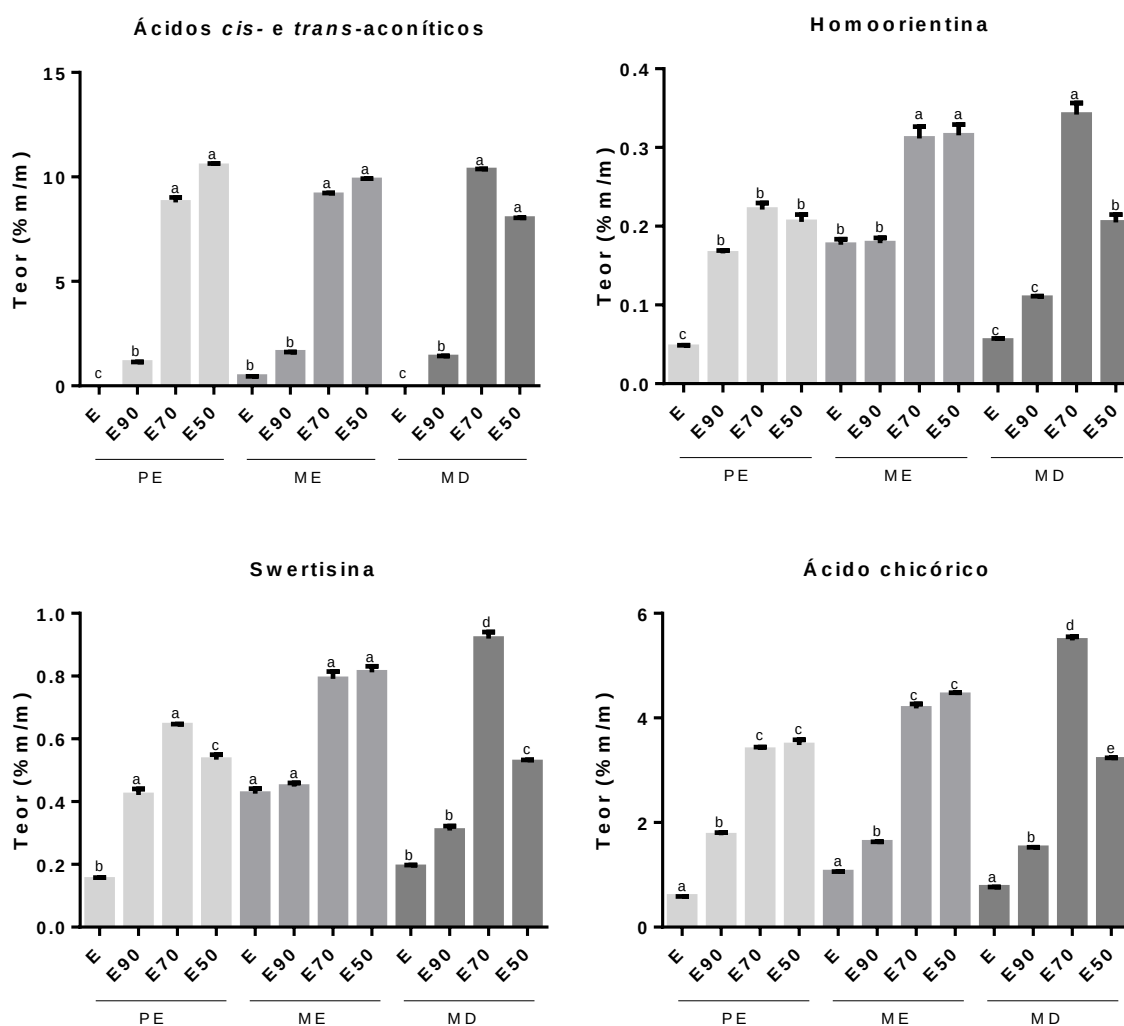
Pinto e colaboradores (2007) obtiveram 8,9%*m/m* de rendimento extrativo para o extrato aquoso de folhas de *E. macrophyllus*. Este rendimento extrativo se mostrou menor que o obtido por Silva (2011), que também realizou o preparo de extrato aquoso de folhas de *E. macrophyllus* com 12,7 %*m/m* de rendimento. A diferença entre os dois métodos extrativos é que o primeiro realizou o processo de filtração em papel de filtro e o segundo em funil de Buchner, demonstrando como o processo de filtração pode interferir no rendimento extrativo. Outros autores relataram rendimentos extrativos para extratos de *E. macrophyllus* preparados com solventes menos polares, obtendo baixos rendimento, caso do extrato hexânico (1,1%*m/m* de rendimento extrativo) (FERNANDES et al., 2019).

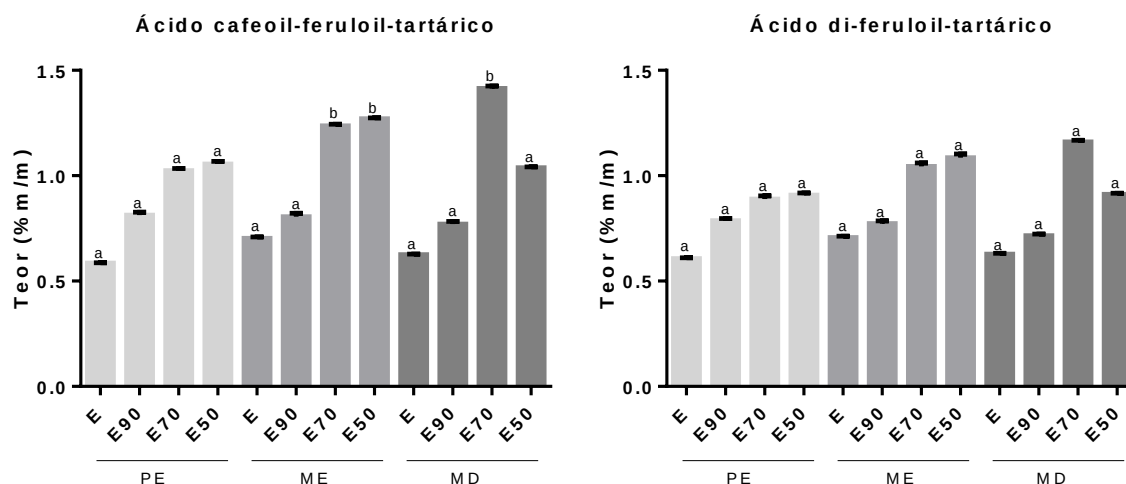
#### **5.7.2 Quantificação de marcadores químicos nos extratos obtidos nos ensaios extrativos com *E. macrophyllus***

Adicionalmente à análise de rendimento dos extratos resultantes dos ensaios extrativos (item 5.6.1), foi realizada a quantificação o teor dos marcadores químicos nos diferentes extratos produzidos. Cabe ressaltar que devido ao baixo rendimento obtido não foi possível quantificar os extratos obtidos com acetato de etila.

Pode-se observar que os extratos EtOH 70% e EtOH 50% apresentaram aos maiores teores dos ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, para todos os métodos extrativos empregados. Observou-se diferença significativa no teor de homoorientina nos extratos EtOH 70% e EtOH 50% de acordo com o método extrativo empregado. Um maior teor do marcador foi obtido no extrato EtOH 50% preparado por maceração estática ( $0,31 \pm 0,01\%$ ) e maceração dinâmica ( $0,34 \pm 0,02\%$ ), enquanto o menor teor foi obtido no extrato EtOH 70% preparado por percolação ( $0,22 \pm 0,01\%$ ). Para swertisina e ácido chicórico, o extrato EtOH 50% também apresentou variação no teor dos dois marcadores, sendo o maior teor de swertisina observado no método de maceração estática ( $0,81 \pm 0,02\%$ ). Já o ácido cafeoil-feruloil-tartárico apresentou maior concentração nos extratos EtOH 70% ( $1,24 \pm 0,01\%$ ) e EtOH 50% ( $1,27 \pm 0,03\%$ ) obtidos por maceração estática e EtOH 50% ( $1,41 \pm 0,01\%$ ) por maceração dinâmica, com diferença estatística entre os outros métodos e solventes extratores avaliados. Por sua vez, o ácido di-feruloil-tartárico, não houve diferença estatística no teor (1-2%) de acordo com os métodos extrativos empregados e os diferentes solventes extratores, conforme demonstrado na **Figura 21**.

**Figura 21:** Teores de marcadores químicos (ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, homoorientina, swertisina, ácido chicórico, ácido cafeoil-feruloil-ácido tartárico e ácido diferuloil-ácido tartárico) quantificados em extratos obtidos nos ensaios extrativos com *E. macrophyllus* (DV1) empregando diferentes solventes e métodos extrativos. A quantificação do teor de marcadores químicos foi realizada em triplicata e os resultados obtidos foram analisados por ANOVA comparando-se todos os extratos de todos os grupos por *one way*, utilizando o teste de Dunnett como pós-teste para comparação múltipla. Nível de significância do teste estatístico foi  $p < 0,05$ . Para os valores de teores dos marcadores químicos, letras diferentes (a, b, c, d e e) dentro das colunas indicam diferenças significativas entre os teores quantificados. E: extrato etanólico 96°GL; E90: extrato hidroetanólico a 90%; E70: extrato hidroetanólico a 70%; E50: extrato hidroetanólico a 50%. ME: maceração estática; MD: maceração dinâmica; PE: percolação.





No presente estudo, de forma geral, os maiores teores dos marcadores químicos quantificados foram obtidos nos extratos EtOH 50% e EtOH 70%. Essa observação vai de encontro aos resultados relatados anteriormente para *E. grandiflorus* (GARCIA et al., 2016). Ao quantificar flavonoides e derivados do ácido tartárico em diferentes extratos de *E. grandiflorus*, os autores observaram maiores teores dos marcadores químicos nos extratos EtOH 70% e EtOH 50%. Esses achados podem ser justificados pela polaridade desses constituintes, que possuem característica mais polar devido a presença de diversas hidroxilas, sendo extraídos de maneira mais eficiente em solventes com maiores teores de água (SILVA et al., 2021). Portanto, com base nos teores de marcadores químicos quantificados, sugere-se que os extratos EtOH 50% e EtOH 70% sejam os mais promissores do ponto de vista químico para o desenvolvimento da formulação. No entanto, para seleção do melhor extrato a ser padronizado para o desenvolvimento da formulação, foi realizada a avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, conforme descrito na sequência, visando selecionar o extrato mais ativo.

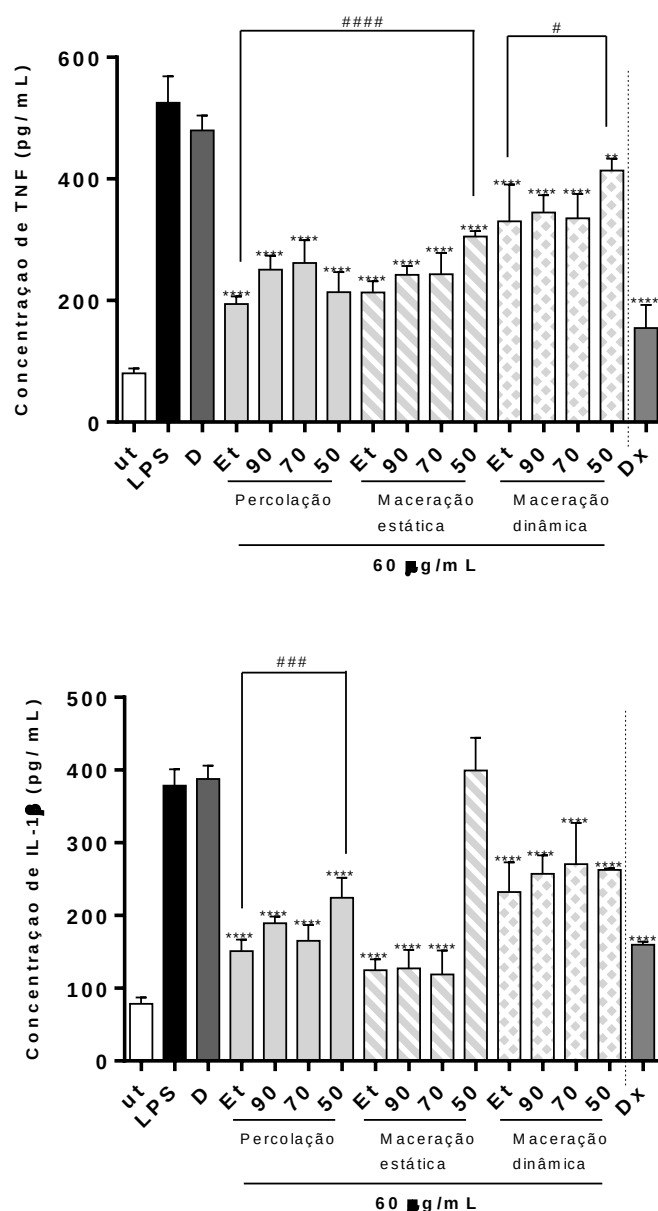
### 5.7.3 Atividade *in vitro* dos extratos obtidos no ensaio extrativo sobre mediadores pró-inflamatórios

No ensaio extrativo foram empregados diferentes métodos e solventes extratores para obter extratos com composições químicas diferentes, que podem afetar a resposta biológica. Assim, foi realizada a avaliação da atividade desses extratos na redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  em células THP-1 estimuladas por LPS. Dentre os extratos avaliados, apenas aqueles obtidos com EtOAc se apresentaram citotóxicos para as células THP-1 no método de SRB,

apresentando valores inferiores a 90% de viabilidade celular (MD:  $75,02 \pm 0,71$ ; ME:  $70,70 \pm 0,66$ ; P:  $88,54 \pm 1,02$ ). Portanto, os extratos em acetato de etila foram considerados inelegíveis para avaliação da redução de citocinas pró-inflamatórias em células THP-1 previamente estimuladas com LPS. A citotoxicidade do extrato em acetato de etila pode estar associada à presença de diterpenos e triterpenos, já descritos para a espécie. A citotoxicidade de compostos dessas classes já foi relatada por diversos autores como Medanha e colaboradores (2013).

Na avaliação da redução de liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$  por células THP-1 previamente estimuladas com LPS, pode-se observar que os extratos obtidos por maceração estática com renovação de solvente e por percolação, apresentaram atividade similar (**Figura 22**). Este método extrativo foi o mais rápido, realizado em três ciclos de 30 minutos, diferentemente dos demais métodos, nos quais o processo extrativo durou 7 dias. Portanto, o tempo de contato entre o material vegetal e o solvente extrator pode não ter sido suficiente para a extração dos constituintes químicos que estão relacionados com a atividade biológica. Esse fato já foi relatado em vários estudos, inclusive por Zhang, Lin e Ye (2018), que demonstraram que a eficiência extrativa é diretamente proporcional à duração do processo, até que seja alcançado o equilíbrio entre a concentração do soluto dentro e fora do material sólido. Portanto, o tempo de duração de cada ciclo utilizado nesse trabalho pode ter sido insuficiente para o alcance do equilíbrio necessário para a extração dos componentes químicos.

**Figura 22.** Atividade inibitória da liberação de TNF e IL-1 $\beta$  em células THP-1 estimuladas com LPS induzida por extratos de folhas *E. macrophyllus* (DV1), preparados por percolação, maceração dinâmica e maceração estática. Os dados representam a média  $\pm$  DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. \*Indica a diferença significativa com o grupo controle de células tratadas com o solvente DMSO e estimuladas com LPS (C-) (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  ####,  $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). Ut: células não tratadas; LPS: células +LPS; D: solvente DMSO + LPS (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); Et: extrato etanólico 96°GL; 90: extrato hidroetanólico a 90%; 70: extrato hidroetanólico a 70%; 50: extrato hidroetanólico a 50%.



No que se refere à redução da liberação de TNF e IL-1 $\beta$  pelos diferentes extratos avaliados, os extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% apresentaram atividade similar. No entanto, o extrato EtOH 50% obtido por maceração estática não induziu redução significativa da liberação de IL-1 $\beta$ . Os demais extratos apresentaram redução da liberação de IL-1 $\beta$  acima de 50%, sendo obtidos os seguintes valores de inibição percentual para os extratos preparados por percolação (EtOH 96°GL:  $61,0 \pm 4,1$ ; EtOH 70%:  $57,4 \pm 5,5$ ; EtOH 50%:  $42,1 \pm 7,1$ ) e por maceração estática (EtOH:  $67,8 \pm 3,8$ ; EtOH 70%:  $69,4 \pm 8,5$ ). Já para a redução dos níveis de TNF, os seguintes valores de porcentagem de redução foram obtidos para percolação (EtOH 96°GL:  $63,0 \pm 2,3$ ; EtOH 70%:  $50,1 \pm 7,1$ ; EtOH 50%  $59,3 \pm 6,3$ ) e maceração estática (EtOH

96°GL:  $59,4 \pm 3,5$ ; EtOH 70%:  $53,7 \pm 6,7$ ; EtOH 50%:  $46,8 \pm 5,6$ ). Cabe ressaltar que não houve diferença estatística na resposta induzida por todos os extratos obtidos pelos métodos extrativos de percolação e maceração estática. No entanto, os extratos preparados por maceração dinâmica reduziram em menor extensão a liberação destes mediadores pró-inflamatórios, com resultados estatisticamente diferentes dos outros dois métodos (P e ME).

Como mencionado anteriormente, os extratos obtidos por percolação apresentaram rendimento extrativo, duração do processo extrativo e percentual de redução de mediadores pró-inflamatórios *in vitro* e composição química semelhantes aos resultados observados para os extratos obtidos por maceração estática. No entanto, a percolação possui maior viabilidade de aplicação para desenvolvimento em escala industrial, como destacado previamente. Portanto, os extratos obtidos por percolação foram selecionados para realizar os estudos posteriores com as diferentes drogas vegetais e realizar a comparação entre a composição química e atividade biológica das mesmas, visando o desenvolvimento da formulação.

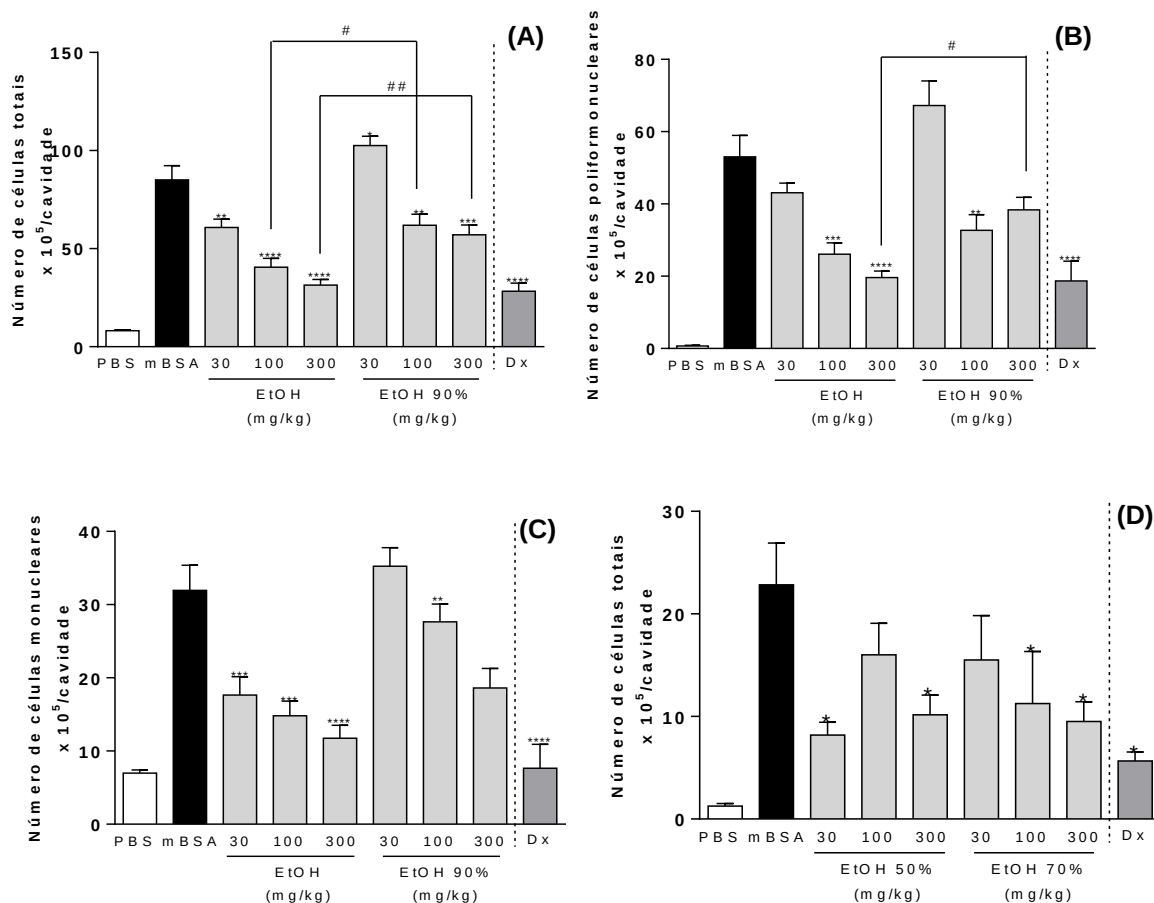
#### **5.7.4 Avaliação dos extratos obtidos por percolação em modelo de artrite aguda induzida por antígeno (AIA agudo)**

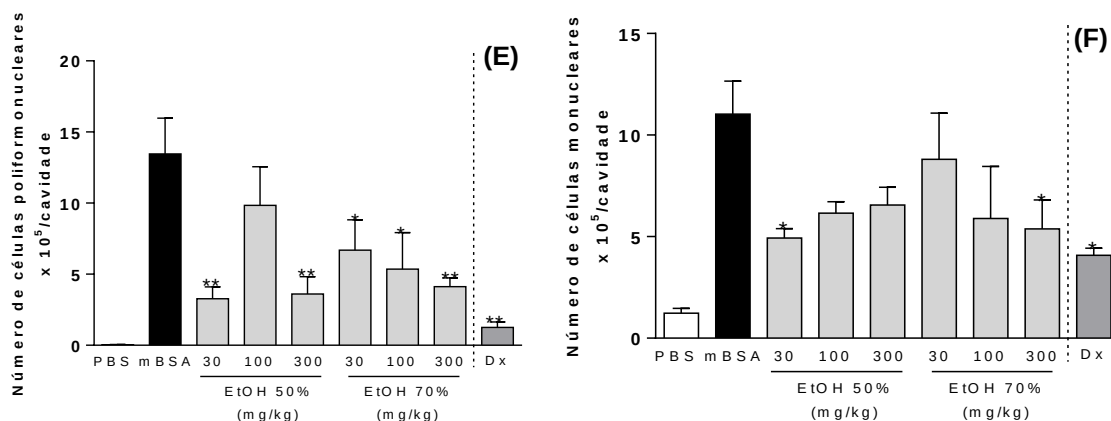
Os extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50%, obtidos pelo método de percolação, os quais não apresentaram citotoxicidade *in vitro* nas células THP-1, foram avaliados em modelo agudo de artrite induzida por antígeno (AIA). Foram utilizados animais da linhagem C57BL/6 e os ensaios foram realizados conforme descrito por Queiroz-Junior e colaboradores (2011). Os extratos foram administrados por via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg.

O extrato EtOH 90% não reduziu a o número de células totais, polimorfonucleares ou mononucleares para a cavidade intra-articular (**Figura 23**). Já os extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% promoveram redução significativa da migração de células para o sítio da inflamação (**Figura 23**). O extrato EtOH 96°GL reduziu significativamente o recrutamento de células totais ( $51,9 \pm 15,4\%$ ), neutrófilos ( $64,9 \pm 16,6\%$ ) e monócitos ( $65,9 \pm 15,7$ ) na dose de 300 mg/kg. Nessa mesma dose, os extratos EtOH 70% e EtOH 50% reduziram o número de células inflamatórias totais para a cavidade interarticular em comparação ao grupo desafiado (EtOH 70%:  $64,6 \pm 14,5\%$  de inibição; EtOH 50%:  $63,2 \pm 9,1\%$  de inibição). Esses extratos também promoveram maior redução no recrutamento de monócitos e neutrófilos: EtOH 70%

( $61,5 \pm 22,1\%$  e  $77,2 \pm 14,1\%$ , respectivamente) e EtOH 50% ( $53,7 \pm 13,8\%$  e  $79,5 \pm 9,8\%$ , respectivamente).

**Figura 23.** Atividade anti-inflamatória de extratos EtOH 96°GL, EtOH 90%, EtOH 70% e EtOH 50% de folhas *E. macrophyllus* (DV1) em modelo de AIA agudo. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). Para o extrato EtOH 50% (300 mg/kg,  $n = 4$ ). (A) células totais EtOH 96°GL e EtOH 90%; (B) poliformonucleares EtOH 96°GL e EtOH 90%; (C) mononucleares EtOH 96°GL e EtOH 90%; (D) células totais EtOH 70% e EtOH 50%; (E) polimorfonucleares EtOH 70% e EtOH 50%; (F) mononucleares EtOH 70% e EtOH 50%. \*Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 90%: extrato hidroetanólico a 90%; EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico a 50%.



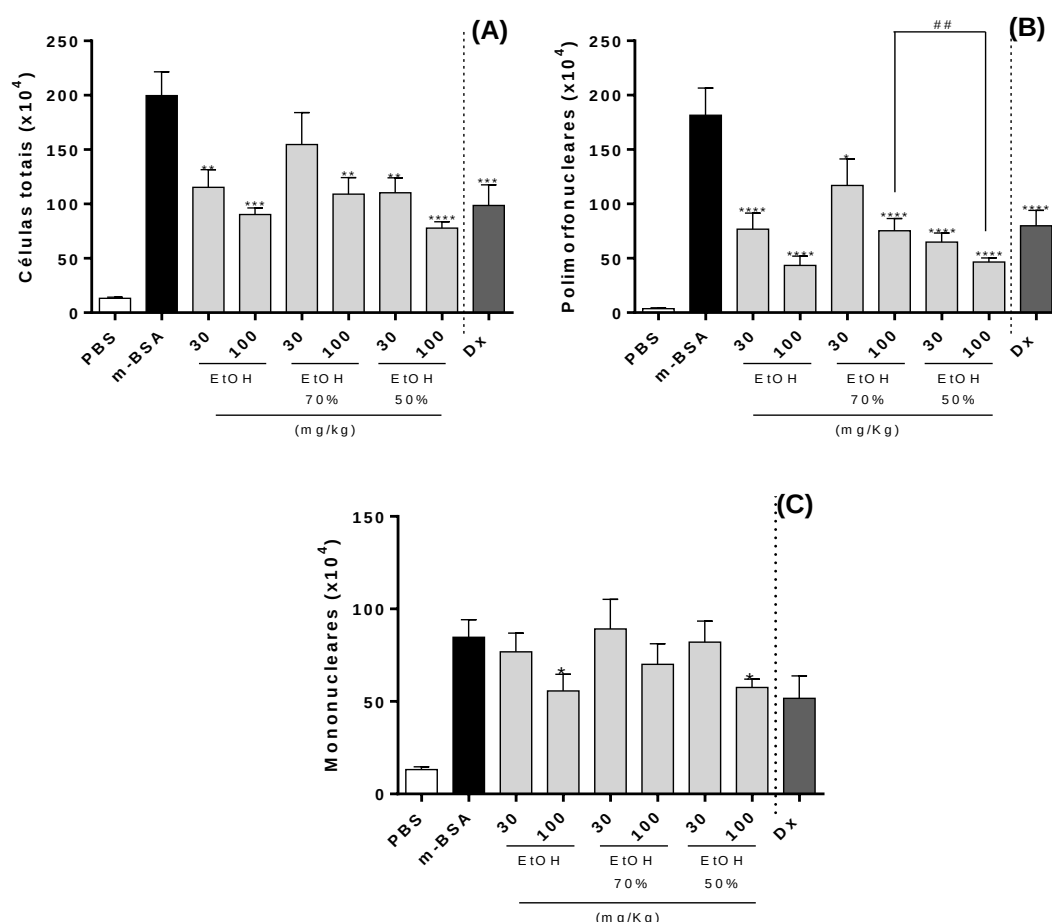


Os extratos EtOH 70% e EtOH 50% apresentaram valores de redução similar; no entanto, o extrato EtOH 70% promoveu uma maior redução da migração de monócitos em comparação ao extrato EtOH 50% na dose de 300 mg/kg, além da maior redução de polimorfonucleares na articulação na dose de 100 mg/kg. Cabe ressaltar que os experimentos do EtOH 96°GL e EtOH 90% foram realizados em experimentos distintos do EtOH 70% e EtOH 50%; como não é possível comparar o efeito e a intensidade da inflamação foi diferente nos dois experimentos, foi dificultada a comparação do efeito dos diferentes tratamentos em conjunto.

Cabe ressaltar que a comparação do efeito dos três extratos na maior dose (300 mg/kg) não pôde ser realizada inequivocamente devido a morte de animais no grupo tratado com o extrato EtOH 50%, inviabilizando a análise estatística. Além disso, a dose de 100 mg/kg não apresentou resultado com relação dose/resposta com os resultados nas doses de 30 e 300 mg/kg. Neste contexto, a fim de confirmar os resultados obtidos e comparar a eficácia dos extratos nas mesmas doses, o experimento de AIA agudo foi repetido com os extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50%, avaliados nas doses de 30 e 100 mg/kg. Os resultados encontram-se dispostos na **Figura 24**. De acordo com os dados obtidos, os extratos EtOH 96°GL e EtOH 50% reduziram significativamente a migração de células totais inflamatórias e de neutrófilos, em ambas as doses. A redução apresentada pelos extratos se mostrou similar e não houve diferença estatística entre as mesmas doses na avaliação do extrato EtOH 96°GL e EtOH 50% (**Figura 24**).

**Figura 24.** Atividade anti-inflamatória de extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% de folhas *E. macrophyllus* (DV1) nas doses de 30 e 100 mg/kg em modelo de AIA agudo. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). (A) células totais; (B)

poliformonucleares e (C) mononucleares no lavado articular. \*Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados e tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 70%: extrato hidroetanólico 70%; EtOH 50%: extrato hidroetanólico 50%.



Na fisiopatologia da artrite, os leucócitos polimorfonucleares, especificamente neutrófilos, são responsáveis pelo início da resposta inflamatória, e estão associados à resposta aguda do processo artrítico. Assim, o papel dos neutrófilos na artrite é a ativação e liberação de diversas citocinas que desempenham papel importante neste quadro inflamatório. Além disso, níveis aumentados de monócitos são cruciais para a perpetuação e para o desenvolvimento da AR. Portanto, substâncias capazes de reduzir o infiltrado de neutrófilos e monócitos são de grande relevância para a regulação das vias moleculares que operam no desenvolvimento e cronicidade da AR (KUROWSKA et al., 2018).

Estudos anteriores do nosso grupo foram realizados com o extrato EtOH 70% de *E. grandiflorus* no modelo de AIA agudo, na dose de 100 mg/kg (GARCIA et al., 2016). O extrato reduziu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e para o tecido periarticular de camundongos, bem como diminuiu os níveis de CXCL-1, TNF e IL-1 $\beta$  no tecido periarticular e a hipernocicepção mecânica (GARCIA et al., 2016). Cabe ressaltar que a redução de monócitos não foi observada para o extrato desta espécie avaliada. No entanto, o conjunto destes resultados demonstra que ambas as espécies apresentam ação anti-inflamatória *in vivo*, o que poderia justificar o uso medicinal indiscriminado das espécies. Porém, destaca-se que *E. macrophyllus* se mostrou ativa em menor dose que *E. grandiflorus* no modelo de AIA agudo.

A atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Piptadeniastrum africanum* (200 e 400 mg/kg, injetadas na pata) foi avaliada em modelo de AIA agudo (MBIANTCHA et al., 2017). O extrato exibiu potencial antiartrítico associado a uma significativa atividade anti-inflamatória e anti-hiperalgesia, reduzindo 17,38% do edema de pata, 72,71% do volume do joelho, além de redução do infiltrado leucocitário. Outro estudo que avaliou o potencial antiartrítico de extratos vegetais no modelo de AIA agudo foi realizado por Chen e colaboradores (2017). Os autores avaliaram o extrato etanólico de *Claoxylon indicum* (0,4 e 0,8 mg/kg por intubação gástrica diariamente por 28 dias) e observaram a supressão da resposta inflamatória nas articulações de camundongos, com redução no edema da pata, hiperplasia dos tecidos linfáticos e membrana sinovial. O extrato também diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF nas articulações artríticas dos camundongos.

O potencial antiartrítico de *E. macrophyllus* aqui relatado se mostrou superior a outras espécies relatadas na literatura, com ação anti-inflamatória com a administração por via oral. O modelo de AIA agudo apresenta rápida evolução clínica, é muito reprodutível e apresenta semelhanças com a AR. Por ser um modelo experimental, o AIA também possibilita uma abordagem efetiva de avaliação das manifestações da artrite nesses animais. No entanto, não corresponde à evolução de cronicidade da doença, sendo necessário a avaliação em modelo crônico para investigar o potencial antiartrítico a longo prazo, além disso, permite evidenciar como são realizadas as manutenções dos episódios agudos de dor e inflamação durante o processo crônico da doença. Ainda, é importante avaliar a resposta anti-inflamatória empregando modelos que representem as diferentes fases do processo artrítico, que

possuem manifestações clínicas distintas, como a observação de deformidades ósseas e piora do edema das articulações no período crônico (PITA et al., 2020).

Níveis aumentados de monócitos são cruciais para o desenvolvimento e a perpetuação da AR. Portanto, o conhecimento sobre os níveis dos monócitos e a regulação das vias moleculares que operam dentro destas células no início do curso do desenvolvimento da AR pode ajudar a avaliar a progressão desta doença artrítica (KUROWSKA et al., 2018). Diante do exposto, foram selecionados para avaliar em modelo de AIA crônico os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70%, devido à redução conjunta do número de células totais, neutrófilos e monócitos, nas doses de 30 e 100 mg/kg (**Figura 24**). Ao comparar as respostas induzidas pelos extratos EtOH 50% e EtOH 70% neste ensaio, observa-se que o primeiro apresentou uma melhor resposta; no entanto, o perfil químico e a resposta biológica desses dois extratos foram similares. Assim, optou-se pelo EtOH 70% devido ao menor teor de água e similaridade química e de atividade biológica identificados. Portanto, para investigar a eficácia dos extratos ativos em modelo pré-clínico de doença com maior semelhança da AR, estes extratos foram avaliados em modelo de AIA crônico.

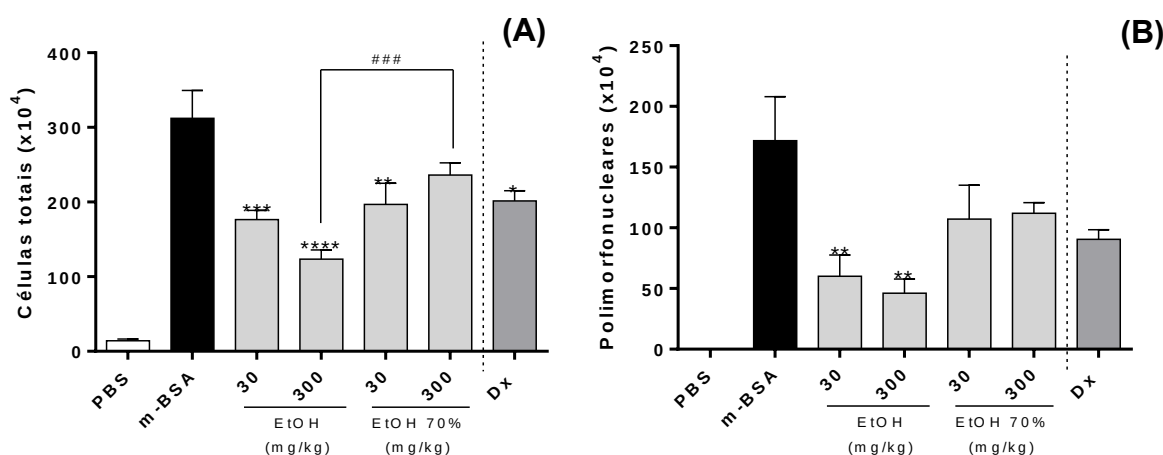
### **5.8 Avaliação dos extratos em modelo crônico de artrite induzida por antígeno (AIA crônico)**

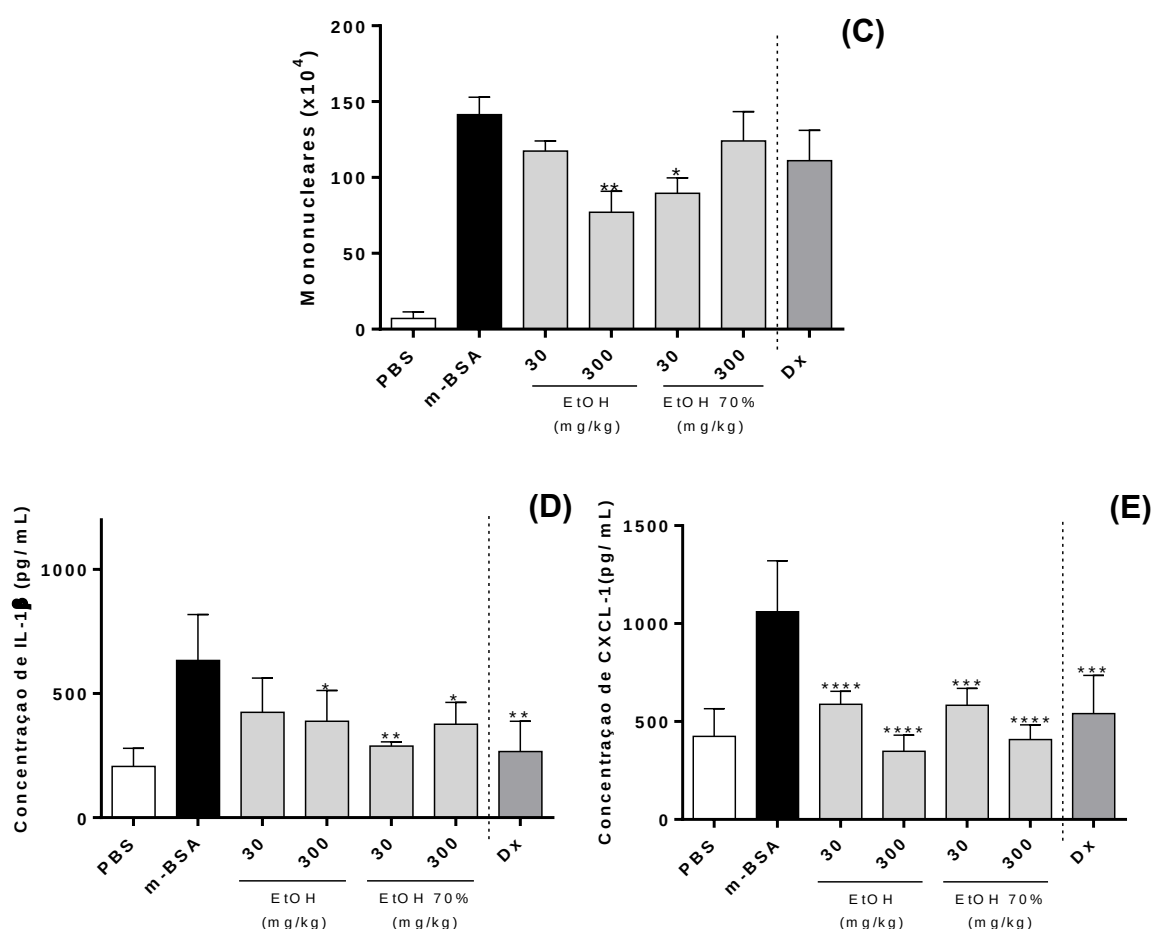
Para investigar a eficácia dos extratos em modelo pré-clínico de AIA crônico foram selecionados os extratos mais ativos no modelo de AIA agudo: EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50%. No entanto, como os extratos EtOH 70% e EtOH 50% apresentam atividade biológica e composição química semelhantes, e visando a redução do uso de animais nos experimentos *in vivo*, foram ensaiados os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70%.

A artrite é considerada uma inflamação crônica das articulações com fases de agudização, dependendo do quadro clínico do paciente. Não há cura da doença e ela é caracterizada por um processo inflamatório crônico, com fases agudas marcadas por dor e inflamação (SENTHALAL et al., 2020). Neste sentido, para a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para artrite faz-se necessária a avaliação dos candidatos em modelos crônicos de artrite, que são mais translacionais para a doença humana. Estes modelos permitem investigar a ação dos candidatos no processo inflamatório crônico, bem como a redução da deterioração da cartilagem e dos ossos, evitando-se também recidivas de fase aguda.

Neste contexto, os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70%, ativos no modelo de AIA agudo (item 5.6.4), foram selecionados para avaliação em modelo de AIA crônico. Os extratos foram ensaiados nas doses de 30 e 300 mg/kg em camundongos C57BL/6, segundo protocolo descrito por Queiroz-Junior e colaboradores (2011). Os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% reduziram significativamente a migração de células totais para a cavidade intra-articular na dose de 30 mg/kg ( $43,5 \pm 8,7\%$  e  $41,8 \pm 11,4\%$ , respectivamente), sem diferença significativa entre os tratamentos. Por sua vez, o extrato EtOH 96°GL induziu uma maior redução da migração de neutrófilos e monócitos, enquanto o extrato EtOH 70% induziu maior redução de CXCL-1 e IL-1 $\beta$  no tecido periarticular. O extrato EtOH 70% promoveu redução de ambas as citocinas, sendo observada maior redução de IL-1 $\beta$  quando comparado ao extrato EtOH 96°GL ( $54,4 \pm 2,7\%$  e  $29,2 \pm 12,8\%$ , respectivamente), no entanto, essa diferença na redução da citocina não se mostrou significativa na análise estatística (**Figura 25**).

**Figura 25.** Atividade anti-inflamatória dos extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% (30 e 300 mg/kg) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2) em modelo de AIA crônico. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). Número de células na cavidade intra-articular: (A) células totais; (B) neutrófilos; (C) monócitos no lavado articular. Concentrações de IL-1 $\beta$  e (D) e CXCL-1 (E) no tecido periarticular. \* Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados e tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%.

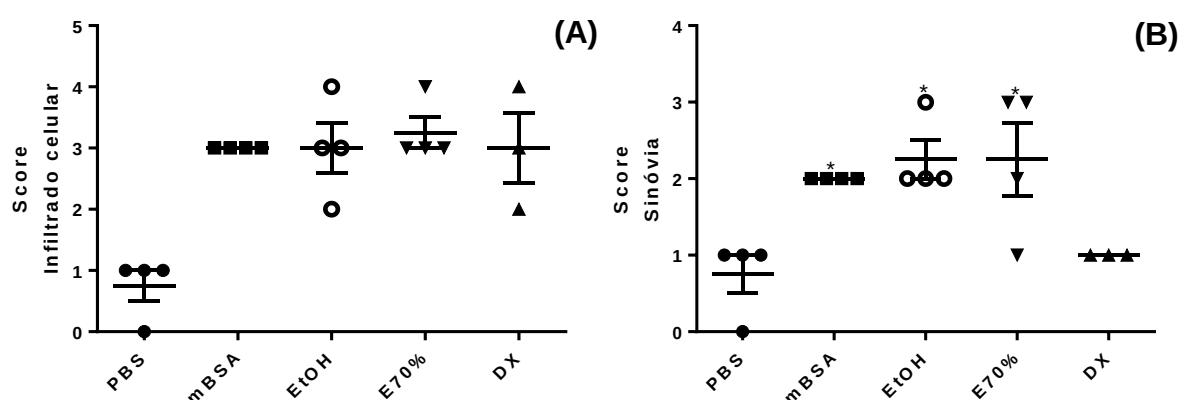


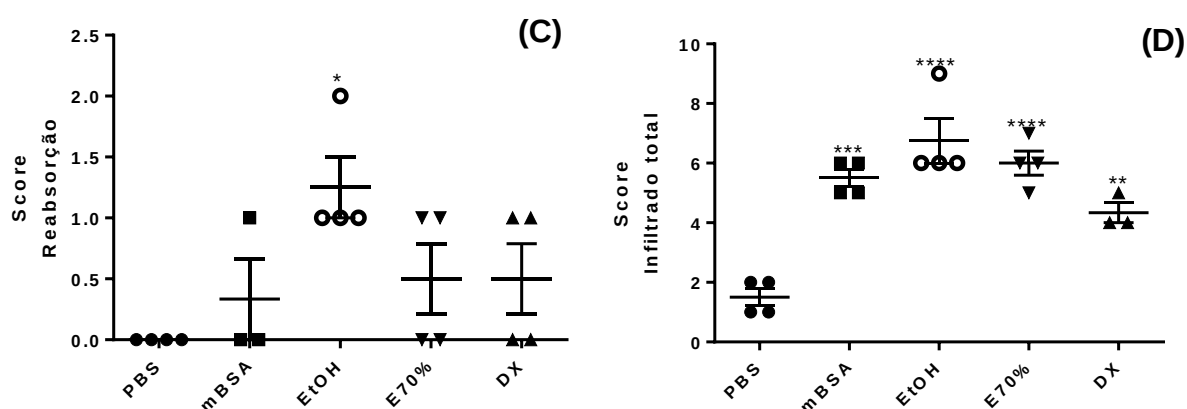


A redução do processo inflamatório induzida pelo extrato em EtOH 70% não foi evidenciada na análise histológica realizada, utilizando a coloração com hematoxilina-eosina (HE). No score do infiltrado total observou-se uma pequena redução nos grupos tratados com o extrato EtOH 70% em relação ao grupo desafiado; no entanto, nenhuma evidência relacionada foi constatada na análise do infiltrado e da sinóvia. Na análise da reabsorção óssea, o extrato EtOH 70% aparentemente promoveu maior redução que o grupo tratado com o extrato EtOH 96°GL, mas a análise estatística não indicou diferença significativa entre os tratamentos. O grupo tratado com o controle positivo (dexametasona, 5 mg/kg) também não apresentou redução significativa de nenhum parâmetro avaliado, sendo observada apenas uma pequena redução do infiltrado celular na sinóvia e no score de infiltrado total (**Figura 26**). Estes achados corroboram os dados relatados por Oliveira (2017), que também não observou redução do score total e número de leucócitos no tecido periarticular em análises histológicas por HE, ao avaliar a dexametasona na dose de 10 mg/kg no modelo de AIA crônico.

A dexametasona é eficaz no tratamento de processos inflamatórios agudos em doenças crônicas, como a artrite (BRITO et al., 2016; BARNES, 2006). Os protocolos clínicos recomendam que o tratamento seja de curta duração, empregando doses moderadas a altas. Doses decrescentes, começando com altas doses e diminuindo diariamente ao longo de 7 a 9 dias, podem ser usadas nas situações inflamatórias agudas (YASIR et al., 2021). Portanto, a dexametasona deve ser utilizada em curto período de tempo e dados na literatura sobre o seu potencial anti-inflamatório em uso crônico e prolongado para artrite são ainda incipientes. Além disso, o uso crônico da dexametasona está relacionado a diferentes efeitos adversos, identificados desde 1960 em estudo clínico com 72 pacientes, no qual se evidenciou aumento de apetite, ganho de peso, estimulação mental, náuseas, dores de cabeça e no estômago (HOYLLANDER, 1960).

**Figura 26.** Scores da análise histológica, com coloração por HE, das articulações fêmur-tibial coletadas no ensaio de AIA crônico realizado com os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% (300 mg/kg) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2). (A) Infiltrado celular; (B) sinóvia; (C) reabsorção óssea e (D) score infiltrado total. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). \* Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (mBSA) (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não desafiados e tratados com veículo; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); EtOH: extrato etanólico 96°GL; EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%.





A análise histológica com coloração por HE não evidenciou diminuição do processo inflamatório nos grupos tratados com EtOH 96°GL e EtOH 70%. Na fisiopatologia da AR, o processo inflamatório está associado ao infiltrado de células e, também, à erosão da cartilagem, com degradação dos proteoglicanos produzidos pelos condrócitos, e danos ao tecido ósseo. Para verificar se os tratamentos atuam na prevenção da erosão da cartilagem e prevenção do dano ósseo, foi realizada a coloração histológica com azul de toluidina. A análise histológica utilizando este corante evidenciou que ambos os extratos (EtOH 96°GL e EtOH 70%), na dose de 300 mg/kg, inibem a degradação de proteoglicanos, não havendo diferença significativa entre os tratamentos (**Figura 27**). A redução da perda de proteoglicanos promovida pelos extratos é claramente visualizada nas imagens histológicas da **Figura 27**. Pode-se observar que o tratamento com os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% reduz a perda de proteoglicanos na área indicada pelas setas. Esses achados são de grande relevância na fisiopatologia da AR, uma doença inflamatória caracterizada pela destruição da cartilagem articular e ativação de condrócitos, que também estão relacionados com esse processo erosivo. Portanto, substâncias capazes de reduzir a perda de proteoglicanos e atuar na inativação dos condrócitos pode contribuir com a inibição do desenvolvimento e evolução de quadros graves da doença (TSENG et al., 2020).

Não menos relevante é a potencial aplicação dos extratos EtOH 96 °GL e EtOH 70% na OA, uma doença articular inflamatória que acarreta danos articulares e principalmente perda da cartilagem, pois afeta toda a articulação e tecidos periarticulares. No processo inflamatório da OA, os mediadores inflamatórios, como IL-6, ativam enzimas (metaloproteinases) que medeiam a destruição articular. Após o início da lesão da cartilagem, a matriz de colágeno é danificada, fazendo com que os

condrócitos proliferem e formem aglomerados, ocorrendo uma mudança fenotípica para condrócitos hipertróficos, causando danificações e alterações de cartilagem que ossificam e formam osteófitos. À medida que a matriz de colágeno é danificada, os condrócitos sofrem apoptose, e o colágeno inadequadamente mineralizada causa espessamento do osso subcondral, resultando em perda e alteração da cartilagem, dor e redução da qualidade de vida dos pacientes. Portanto, alternativas terapêuticas que reduzem o dano e a perda da cartilagem são consideradas efetivas para o tratamento da OA (SEN; HURLEY, 2023).

A atividade anti-inflamatória e antiartrítica de *E. macrophyllus* em modelos de AIA agudo e crônico não foi descrita na literatura. Os únicos estudos pré-clínicos de avaliação da atividade anti-inflamatória dessa espécie foram realizados em modelo de edema de pata induzida por carragenina. Castro e colaboradores (2002) demonstraram a redução da formação de edema de pata em camundongos Swiss após administração intraperitoneal (i.p.) do extrato aquoso de folhas de *E. macrophyllus* nas doses de 100 e 200 mg/kg, com 71% e 84% de redução do edema, respectivamente (CASTRO et al., 2002). Já o extrato hidroalcoólico administrado por via oral, reduziu o edema de pata em 50% no mesmo modelo, quando avaliado na dose de 2000 mg/kg (NOCHI, et al., 2000).

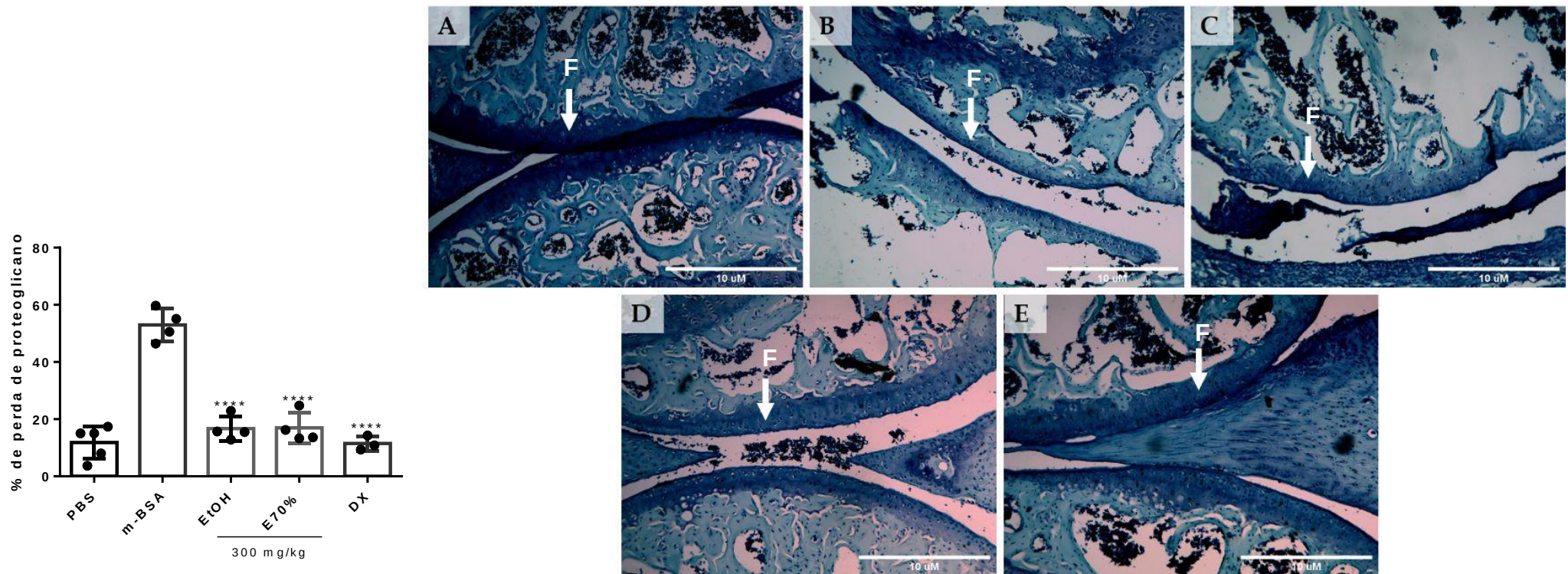
Em outro trabalho, o extrato hidroetanólico a 75% de folhas de *E. macrophyllus*, administrado por via oral nas doses de 1, 5 e 30 mg/kg, inibiu o edema de pata induzido por carragenina (25%, 46% e 63%, respectivamente) e por dextrana (30%, 23% e 42%, respectivamente) em ratos Wistar (TANUS-RANGEL et al., 2010). Os autores também relataram redução do volume de exsudato e da migração de leucócitos no modelo. Estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2017) mostram que os ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, presentes em *E. grandiflorus* e descritos para *E. macrophyllus* pela primeira vez neste trabalho, promoveram redução de células inflamatórias totais e neutrófilos do infiltrado periarticular em modelo de AIA agudo, além de reduzir os níveis de CXCL-1 e IL-1 $\beta$ . Portanto, é factível supor que a presença desses ácidos nos extratos contribua para a atividade anti-inflamatória observada.

A atividade antiedematogênica de extratos hidroetanólicos a 50% e a 70% de folhas de *E. grandiflorus* foi demonstrada em modelo de edema em pata de camundongo induzido por carragenina (GARCIA et al., 2010). No mesmo estudo, foi observada uma redução significativa do edema no tratamento com frações

enriquecidas em diterpenos e em flavonoides de *E. grandiflorus* (7,2–36 mg/kg, p.o.). Ainda, no mesmo trabalho a atividade antiedematogênica foi constatada para os ácidos *trans*- e *cis*-aconítico no mesmo modelo avaliado. Cabe ressaltar que o modelo *in vivo* avaliado por Garcia e colaboradores (2016) para *E. grandiflorus* é diferente do modelo realizado neste trabalho para *E. macrophyllus*. No entanto, os extratos das duas espécies se mostraram ativos com potencial anti-inflamatório, sugerindo que a semelhança na composição química das espécies, descrita anteriormente, responde pelos efeitos biológicos semelhantes.

Conforme mencionado anteriormente, não encontramos relatos na literatura da avaliação de *E. macrophyllus* em modelo de AIA crônico. No entanto, outras espécies já foram ensaiadas neste modelo e os resultados obtidos permitem avaliar a eficácia de *E. macrophyllus*. Hoscheid e colaboradores (2013) avaliaram a atividade do extrato etanólico de *Pterodon pubescens* em modelo de AIA crônico, administrado na dose de 250 mg/kg por 21 dias. O tratamento com o extrato reduziu o número de leucócitos totais e de células mononucleares na cavidade intra-articular, evidenciando a atividade anti-inflamatória. No entanto, o tratamento foi realizado por um período de 21 dias, enquanto, no presente trabalho, após 7 dias de tratamento evidenciou-se ação anti-inflamatória para o extrato de *E. macrophyllus*. Adicionalmente, demonstramos a redução da perda de proteoglicanos induzida pelos extratos de *E. macrophyllus*, não demonstrada no trabalho supracitado, de grande relevância para o tratamento das doenças artríticas, especialmente osteoartrite.

**Figura 27.** Análise histológica, com coloração por azul de toluidina para avaliação de perda de proteoglicanos, das articulações fêmur-tibial coletadas no ensaio de AIA crônico realizado com os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% (300 mg/kg) de folhas de *E. macrophyllus*. Os dados representam a média  $\pm$  DP (n = 6). \* Indica a diferença significativa com o grupo tratado com o veículo e desafiado com mBSA (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). (A) PBS, animais não desafiados e tratados com veículo; (B) mBSA, grupo desafiado; (C) Dx, grupo tratado com dexametasona (5 mg/kg); (D) EtOH, grupo tratado com extrato etanólico 96°GL; (E) E70%, grupo tratado com extrato hidroetanólico a 70%; (F) perda percentual de proteoglicanos. As imagens representam os campos histológicos (40x) de todos os tratamentos realizado com 6 animais, sendo apenas um animal representado na figura.



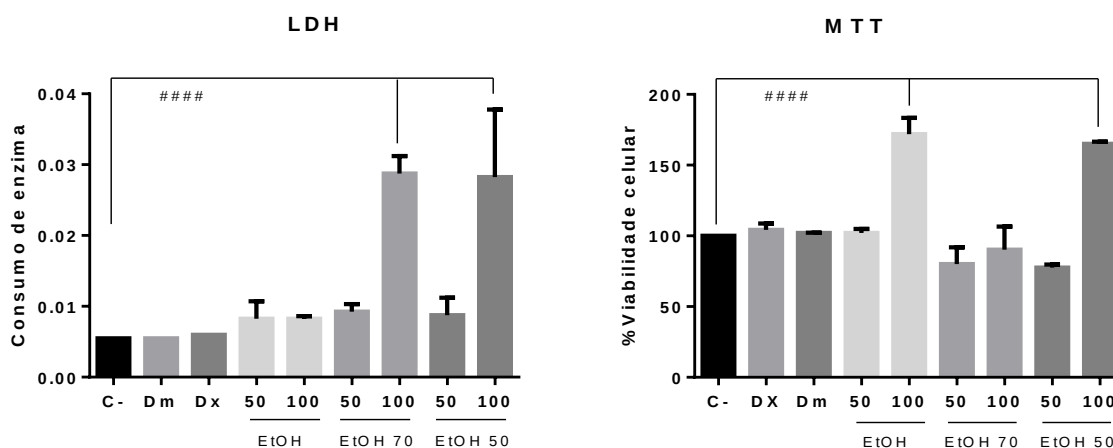
### 5.8.1 Investigação do mecanismo de ação dos extratos em cultura de condrócitos

Tendo em vista que os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% reduziram significativamente a perda de proteoglicanos no modelo de AIA crônico (item 5.7.1), buscamos avaliar o efeito desses extratos em culturas primárias de condrócitos. Também avaliamos, nesse ensaio, o extrato EtOH 50%, pois ele também se mostrou promissor no ensaio de AIA agudo (item 5.6.4) para o desenvolvimento posterior de formulação. Esta avaliação foi motivada pelos achados experimentais no modelo de AIA crônico, já que as cartilagens articulares danificadas durante os processos artríticos sofrem reestruturação pelos condrócitos, que são células responsáveis pela produção de proteoglicanos e pela expressão das enzimas proteolíticas (AKKIRAJU, NOHE, 2015). Como foi observada uma proteção da degradação dos proteoglicanos na articulação, realizou-se a avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos em condrócitos murinos estimulados com LPS e determinou-se a expressão de citocinas (IL-6) e expressão de metaloproteinase do tipo 3 (MMP-3), tipo 13 (MMP-13) e colágeno (COL2A1) visando elucidar o mecanismo de ação anti-inflamatório e antiartrítico dos extratos.

Para tanto, inicialmente realizamos a padronização do método avaliando a densidade de células por poço, o volume da suspensão celular por poço, e a concentração (50 e 100 µg/mL) dos extratos a serem ensaiados sem comprometer a viabilidade celular, avaliada pelos métodos do MTT e LDH. Observou-se que as células tratadas com os extratos EtOH 70% e EtOH 50% na concentração de 100 µg/mL reduziram a viabilidade celular pelo método de LDH (**Figura 28**). Ainda, os extratos EtOH 96°GL e EtOH 50%, também na concentração de 100 µg/mL, aumentaram viabilidade celular no teste de MTT, o que pode estar relacionado com estresse induzido pelo tratamento com essa concentração. No entanto, nenhum dos extratos, a 50 µg/mL, alterou a viabilidade celular e, portanto, essa concentração foi definida para estudo.

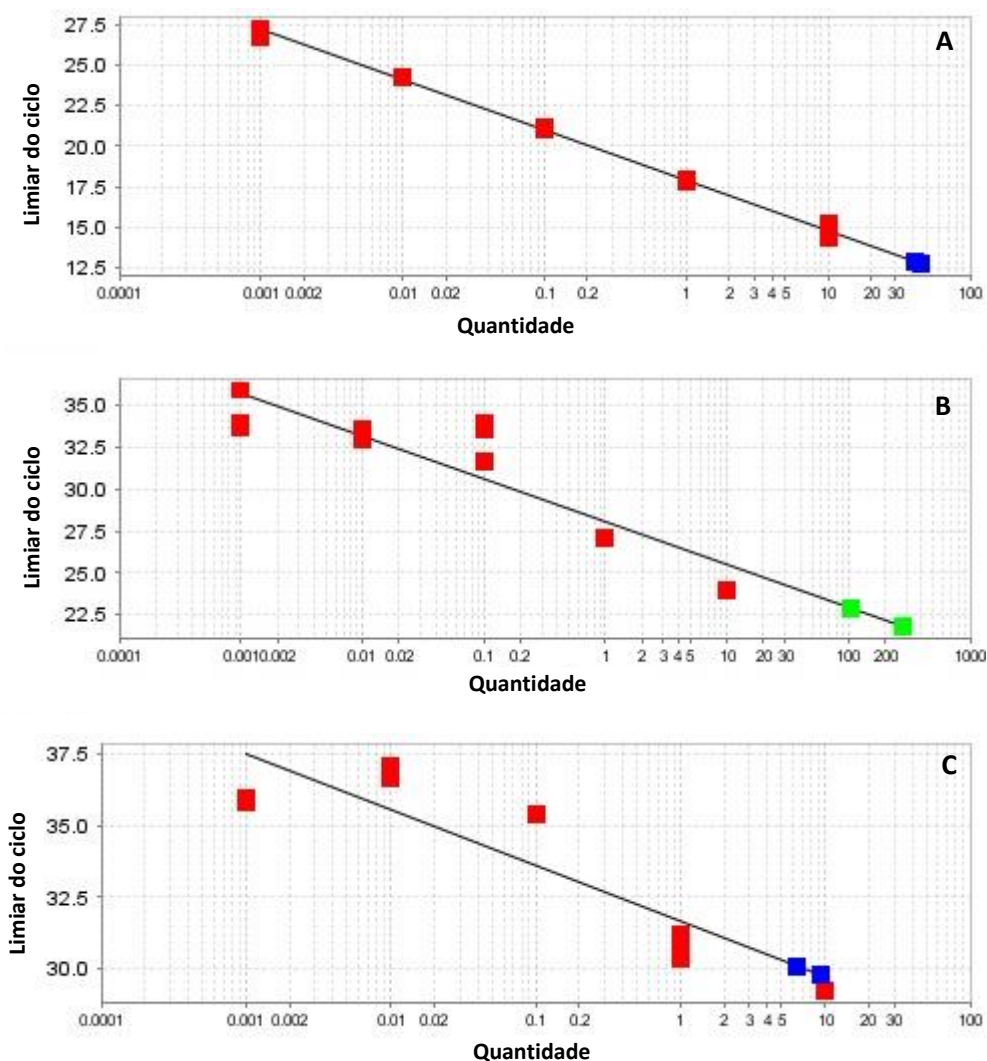
**Figura 28.** Viabilidade celular em cultura de condrócitos murinos dos extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% (50 e 100 µg/mL) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2) avaliada pelos métodos de LDH e MTT. Os dados representam a média ± DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  ####,  $p < 0,0001$ , ANOVA,

pós-teste de Dunnett). C-: células não tratadas; Dm: solvente DMSO + células; Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); EtOH: extrato etanólico 96°GL; 50: extrato hidroetanólico a 50%; 70: extrato hidroetanólico a 70%.



Na sequência, os extratos EtOH 96°GL 70% e 50% foram avaliados em cultura de condrócitos murinos estimulados com LPS em triplicata experimental e duplicata biológica. As células foram tratadas com os extratos (50  $\mu$ g/mL) e posteriormente estimuladas com o LPS (10 ng/mL). Após 24 horas, foi coletado o sobrenadante para a dosagem da citocina IL-6 e para avaliação da viabilidade celular pela análise do consumo da enzima LDH. O *pellet* celular foi adicionado de Trizol para a extração de RNA e posterior análise por qPCR para avaliar a transcrição da enzima metaloproteinase do tipo 3. Inicialmente, foi realizado o desenho de três primers: MMP-3 (**Figura 29A**), MMP-13 (**Figura 29B**) e COL2A1 (**Figura 29C**), devido a relação da ativação dessas enzimas e a degradação dos proteoglicanos em processos artríticos relatados na literatura. Com isso foi realizado o desenho dos primers com adaptações (SINGH et al., 2013; HOHJOH et al., 2020; DONAJUE et al., 2003), sendo analisados e aprovados no PCR *in silico* e no *Hetero dimer*, obtendo o *deltaG* (-6,59 kcal/mol – MMP-3; -3,14 kcal/mol – MMP-13; -7,05 kcal/mol). Durante o processo de padronização e validação do primer, apenas o primer de MMP-3 apresentou curva padrão de validação eficiente para o processo de quantificação por qPCR, conforme evidenciado na **Figura 30**.

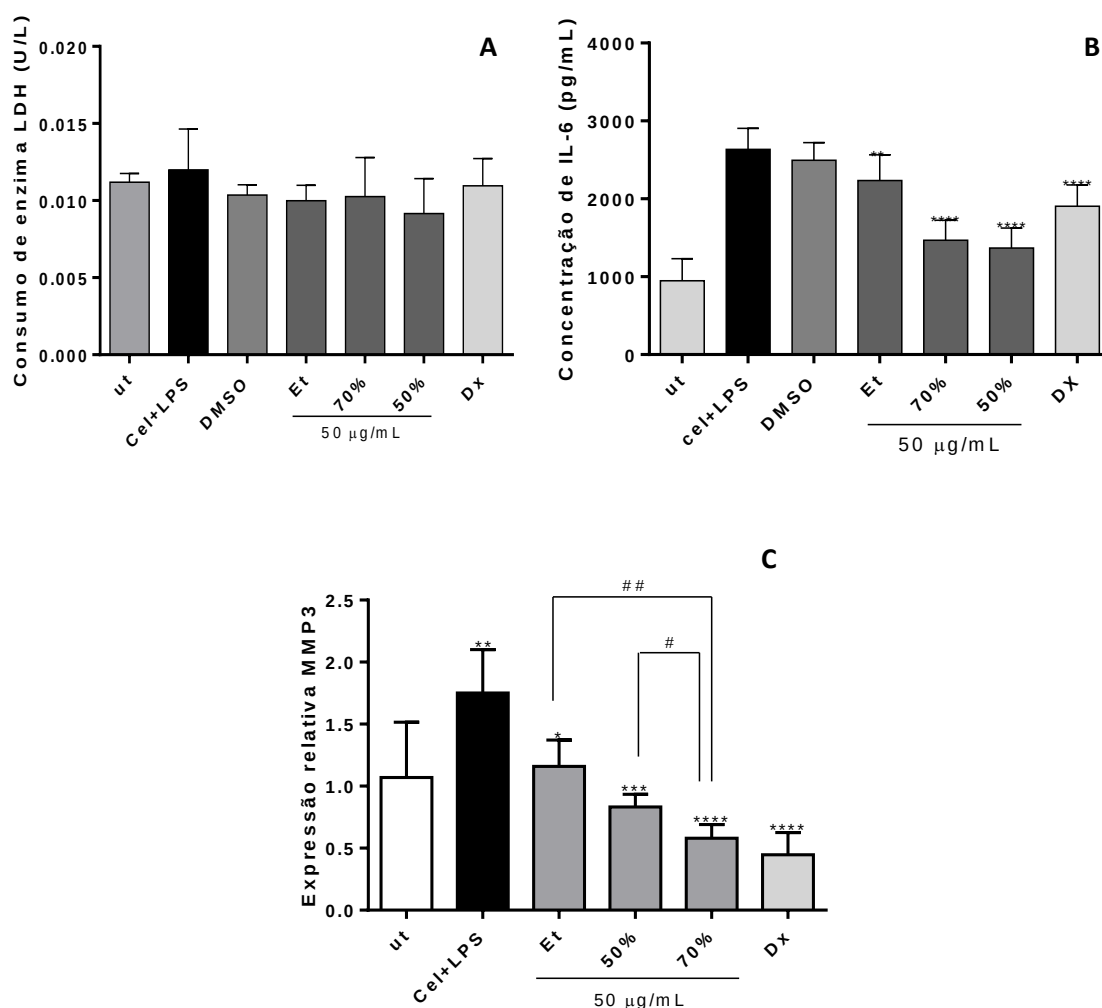
**Figura 29.** Curvas de quantificação obtidas para os primers MMP-3 (A), MMP-13 (B) e COL2A1 (C). Condições experimentais vide item 4.14.3.3.



Nenhum dos extratos reduziu a viabilidade celular nas condições do ensaio (**Figura 30A**). Os três extratos reduziram a liberação de IL-6 com percentuais de inibição de  $15,3 \pm 2,4\%$  para o extrato EtOH 96°GL; de  $44,3 \pm 4,2\%$  para o EtOH 70% e de  $48,1 \pm 3,5$  para o EtOH 50% (**Figura 30B**). A redução da liberação de IL-6 observada corrobora a menor expressão da enzima MMP-3 observada na análise por qPCR, sendo que os três extratos induziram as seguintes inibições percentuais da expressão da enzima: EtOH 96°GL,  $33,7 \pm 12,2$ ; EtOH 50%,  $55,4 \pm 8,4\%$ ; EtOH 70%,  $66,0 \pm 7,5\%$  e dexametasona (controle positivo),  $74,4 \pm 10,2\%$  (**Figura 30C**).

**Figura 30.** Atividade dos extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% (50 µg/mL) de folhas de *E. macrophyllus* (DV2) em cultura de condrócitos murinos estimulados

com LPS. Os dados representam a média  $\pm$  DP de duplicatas biológicas cada uma delas com triplicatas experimentais. (A) Citotoxicidade dos extratos determinada pelo ensaio do LDH; (B) concentração (pg/mL) de IL-6 liberada no meio após estímulo com LPS; (C) expressão da enzima metaloproteinases do tipo 3 (MMP-3) determinada por qPCR. \*Indica a diferença significativa com o grupo células com estímulo de LPS e tratamento com o solvente DMSO (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). ut: células sem tratamento e estímulo; Cel+LPS: células + LPS; DMSO: solvente DMSO (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); Et: extrato etanólico 96°GL; 50%: extrato hidroetanólico a 50%; 70%: extrato hidroetanólico a 70%.



Os condrócitos são células especializadas da cartilagem, responsáveis pela renovação da matriz extracelular que mantém as propriedades metabólicas da cartilagem e suas capacidades mecânicas. Em processos artríticos, os condrócitos

formam aglomerados e sua ativação resulta em aumento da secreção de proteases de matriz (MMP-3, MMP-13, ADAMTS-5) capazes de degradar o proteoglicano e clivar a rede de colágeno tipo II (LANGE-BROKAAR, et al., 2015). Além da alteração da função dos condrócitos, uma inflamação sinovial participa da perda da cartilagem através da infiltração de células imunes que produzem citocinas inflamatórias, como IL-6, que ativam o catabolismo dos condrócitos pelo aumento da expressão enzimática das metaloproteinases (GRIFFIN, SCANZELLO, 2019). No presente estudo, os extratos EtOH 70% e EtOH 50% reduziram a liberação de IL-6 e a expressão de MMP-3 em modelo de condrócitos murinos estimulados com LPS, o que explica a proteção da degradação dos proteoglicanos e redução do processo inflamatório e artrítico detectado no modelo de AIA crônico.

Os dados aqui relatados são inéditos para *E. macrophyllus* e para outras espécies do gênero *Echinodorus*. Outros extratos já foram relatados com atividade sobre condrócitos, caso do extrato hidroetanólico a 30% de *Rubus idaeus* (100 µg/mL), que reduziu a hipertrofia dos condrócitos murinos, aumentou a expressão de dos genes catabólicos (MMP-3, MMP-13) em cultura primária dessas células e reduziu a perda de proteoglicanos (85,16 ± 3,07% de proteção de proteoglicanos) em explantes de cartilagem. Segundo os autores, os dados sugerem que o extrato pode proteger o catabolismo dos condrócitos e a perda de cartilagem em condições inflamatórias (BOURMAUD et al., 2021), de forma semelhante ao observado no presente estudo.

Park e colaboradores (2021) avaliaram o extrato hidroetanólico a 70% de *Cornus officinalis* (2, 10, e 50 µg/mL) em cultura de condrócitos murinos para investigar efeitos antiosteoartríticos. O extrato (50 µg/mL) reduziu a expressão de ciclooxigenase-2 (Cox-2), MMP-3 e MMP-13 maior que 50% (50 µg/mL) o que infere uma proteção da perda da cartilagem, conforme encontrado nesse estudo para *E. macrophyllus*. Os resultados obtidos indicam que mecanismos moleculares avaliados estão associados com a redução do processo antiartrítico e a degradação da cartilagem.

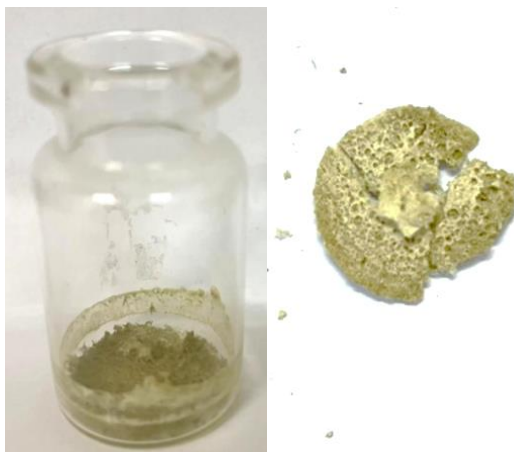
## 5.9 Desenvolvimento farmacotécnico do extrato padronizado

Para preparar os extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% avaliados nos ensaios previamente relatados (itens 5.6.4, 5.7.1 e 5.7.2) foi utilizado o método de percolação com evaporação do etanol em evaporador rotativo sob pressão reduzida,

sendo, na sequência, a água removida pelo processo de liofilização. Esta técnica consiste em três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A secagem primária é a etapa limitante da velocidade da liofilização (CHEN, et al., 2015) e outros fatores negativos da técnica incluem o aumento de umidade do líofilo, a segregação dos pós e a redução do volume após a liofilização. Para contornar esses problemas podem ser adicionados crioprotetores e avaliados protocolos de liofilização, que precisam ser otimizados para obter um líofilo aceitável. A adição dos crioprotetores auxilia na otimização do processo de liofilização, com redução da contração de volume, umidade e segregação dos pós, e esses problemas estão intimamente relacionados com a escolha da formulação e parâmetros tecnológicos durante a liofilização (CHEN et al., 2010).

Visando otimizar o processo de obtenção dos extratos para desenvolvimento posterior da formulação, diferentes crioprotetores foram inicialmente avaliados (dados não apresentados). A análise macroscópica visual dos líofilos obtidos indicou que eles não eram homogêneos, além de apresentarem partículas em forma de aglomerados (**Figura 31**). Resultados semelhantes foram obtidos por Saifullah e colaboradores (2019) na secagem de extrato aquoso de *Backhousia citriodora*, que demonstrou que a liofilização causa mudanças significativas na microestrutura do produto seco final, tornando-o mais poroso, o que favorece rápida reidratação e ganho de umidade, inviabilizando a estabilidade do produto obtido (JIA et al., 2019).

**Figura 31.** Líofilo obtido após a secagem do extrato EtOH 50% + 2,5% sacarose (crioprotetor) por liofilização.

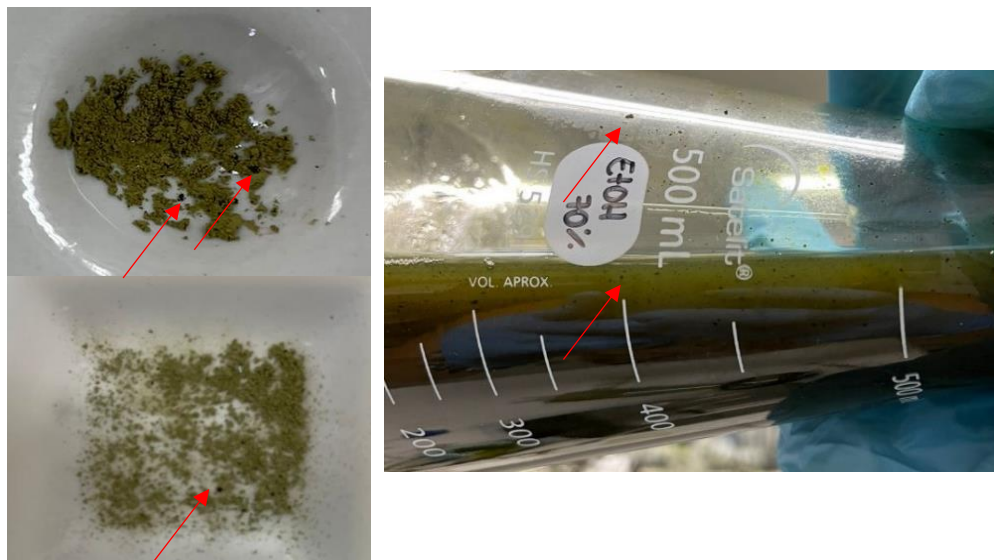


Uma estratégia para contornar essas limitações é a adição de um excipiente ao líofilo obtido, visando assegurar a homogeneidade. Porém, do ponto de vista de produção industrial esta seria uma etapa adicional a ser acrescentada, que poderia dificultar e onerar a produção em larga escala. Ainda, cabe ressaltar que o processo de secagem do extrato por liofilização demanda o consumo de quatro a dez vezes mais energia do que a secagem com ar quente, sendo considerado um processo lento e oneroso para a fabricação de um produto desidratado (BHATTA, JANEZIC, RATTI, 2020), dificultando a produção futura do fitoterápico. Diante do exposto, foram realizados estudos dos processos de secagem com uma técnica alternativa, *spray drying*, para obtenção do extrato padronizado, conforme descrito na sequência. Essa técnica apresenta um custo operacional inferior à liofilização, produz pó com menor grau de aglomeração e é aplicável a grandes volumes com menor tempo, gerando uma otimização no processo produtivo pelas indústrias (ADALI et al., 2020).

Os extratos EtOH 70% e EtOH 50% foram selecionados para desenvolvimento farmacotécnico, visando a obtenção do extrato padronizado. O extrato EtOH 96°GL não foi incluído nesta seleção, apesar de ativo no ensaio de AIA agudo (item 5.6.4) e crônico (item 5.7.1), porque apresentou atividade inferior aos extratos supracitados no ensaio *in vitro* com condrócitos murinos (item 5.7.2). Adicionalmente, os dois extratos selecionados também apresentaram maiores teores de marcadores químicos que o extrato EtOH 96°GL (item 5.6.2). Ainda, cabe ressaltar que extratos com maior porcentagem de água são mais viáveis para a produção industrial, devido ao menor uso de solvente orgânico. Por fim, entre os três extratos considerados, o EtOH 96°GL foi o com menor rendimento extrativo, o que desfavorece o seu desenvolvimento industrial como fitoterápico.

Inicialmente, os extratos EtOH 70% e EtOH 50% foram preparados com o material vegetal DV2 de *E. macrophyllus* conforme descrito no item 4.15.1, e posteriormente submetidos à secagem por *spray dryer* logo após a evaporação do EtOH no rotavapor. Nas condições empregadas, com a secagem do extrato sem adição de adjuvante, obteve-se um baixo rendimento de extrato seco (em torno de 1%), pois grande parte do material seco ficou retido na superfície interna do equipamento. Além disso, o extrato não se mostrou totalmente solúvel e as partículas obtidas não se apresentaram macroscopicamente homogêneas ao final do processo (**Figura 32**).

**Figura 32.** Extrato EtOH 70% seco pelo método de *spray dryer*. As setas indicam as partículas do pó não homogêneas da solução extrativa antes do processo de secagem e após a secagem na obtenção do pó.

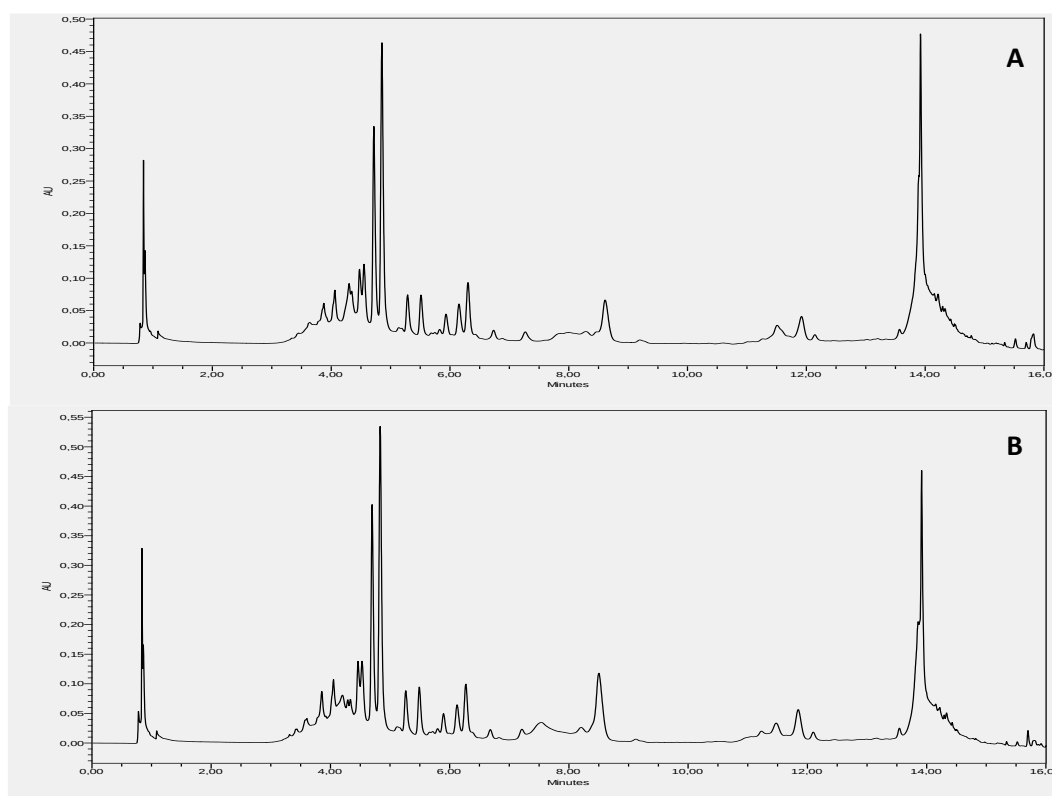


Considerando que a temperatura empregada foi superior a 140 °C, poderia ocorrer degradação dos constituintes durante a secagem. Assim, foi realizada a comparação dos perfis cromatográficos do extrato EtOH 70% obtido por liofilização e *spray dryer* a fim de investigar a eventual degradação dos constituintes. Os perfis cromatográficos obtidos para os extratos (EtOH 70%) secos por liofilização e por *spray dryer* foram muito similares, indicando que o uso de temperaturas elevadas no processo não altera a composição da matriz (**Figura 33**). Portanto, a temperatura empregada no método de secagem utilizando o *spray dryer* não afetou a composição química dos extratos de *E. macrophyllus*, e, em outros estudos foi realizada a comparação da composição química entre extratos secos de *Rubrivivax gelatinosus* obtidos pelos métodos de liofilização e *spray dryer* foi realizada por Santo e colaboradores (2013), onde os conteúdos médios de oxicarotenoides na biomassa foram de 3,74 e 3,72 mg/g (base seca), respectivamente, e esses valores foram estatisticamente equivalentes, demonstrando a semelhança na composição dos extratos obtidos por ambos os métodos.

Com o intuito de melhorar a homogeneidade do pó obtido e o aglomerado de partículas, um problema demonstrado na **Figura 32**, diferentes concentrações de Tween 80 (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 3% v/v, em triplicata) foram adicionadas aos extratos EtOH 70% e EtOH 50% ainda em solução hidroetanólica, na etapa antecedente a evaporação do etanol no rotavapor. A adição do Tween 80 melhorou o aspecto da

solução, garantindo melhor solubilidade. No entanto, não foi possível obter o material na forma de pó após secagem, em nenhuma das concentrações avaliadas, devido a viscosidade e aderência às superfícies internas do equipamento. O Tween já foi utilizado por vários autores para melhorar a solubilidade de extratos vegetais (SANTANA et al., 2021). No entanto, o extrato obtido no presente trabalho apresentou em aspecto oleoso, inviabilizando o uso desse adjuvante para obtenção de extrato seco de *E. macrophyllus*.

**Figura 33.** Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato EtOH 70% seco pelo método de liofilização (A) e por atomização em *spray dryer* (B). Condições experimentais: vide item 4.8.2.



De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, vários estudos relatam o uso de dióxido de silício coloidal (Aerosil®) em extratos vegetais como adjuvante para melhorar as propriedades de secagem (YATSU et al., 2016). Nesses trabalhos, diferentes concentrações de Aerosil® foram empregadas: 0,5% m/m (JIN et al., 2008), 12,4% m/v (GALLO et al., 2012), 15% m/m (GARCIA-PEREZ et al., 2017), 20% m/m (CHAVES et al., 2016) e 30% m/m (VASCONCELOS et al., 2005). Portanto, visando obter o extrato seco na forma de pó homogêneo, avaliamos a adição de Aerosil® em

etapa anterior à remoção do etanol no evaporador rotativo. Assim, foram realizados ensaios em triplicata com os extratos EtOH 70% e EtOH 50% com a adição de diferentes concentrações de Aerosil® (12,5, 25 e 37,5% m/m) ao extrato.

A adição de Aerosil® aos extratos EtOH 70% e EtOH 50% melhorou significativamente o processo de secagem, a homogeneidade do pó obtido e o rendimento da secagem (**Figura 34**). O extrato EtOH 70% sem adição de Aerosil® foi obtido com o menor rendimento (9,4% m/m); já com a adição de Aerosil® foram obtidos rendimentos de 11,8 - 43,8% m/m. O extrato EtOH 50% obtido sem a adição de Aerosil® apresentou rendimento inferior ao extrato EtOH 70% (4,2% m/m), enquanto a adição do adjuvante melhorou o rendimento, resultando em rendimentos de 30,1 - 63,5% m/m (**Tabela 30**). Dessa forma, o maior rendimento do extrato seco foi obtido para o extrato EtOH 50% com adição de 25% de Aerosil® e para o extrato EtOH 70% com 35% de Aerosil®.

No entanto, cabe ressaltar que com menor massa adicionada de Aerosil® no extrato EtOH 50%, foi possível obter o maior rendimento do extrato total de *E. macrophyllus* (**Tabela 30**). Ainda, além da comparação entre os rendimentos, os extratos secos obtidos com a adição de diferentes concentrações de Aerosil® foram comparados visualmente com o extrato seco sem adição para verificação da homogeneidade macroscópica e comparação da massa do extrato seco obtido. Com isso, observou-se que os extratos com a adição de 25% e 35% de Aerosil® apresentaram maior massa e as aspecto mais homogêneo do pó (**Figura 34**).

Destaca-se, ainda, que os extratos preparados com adição do adjuvante apresentaram menor aderência do pó ao frasco (**Figura 34**) e na superfície interna do *spray-dryer*, corroborando com os dados já descritos por Jin e colaboradores (2008), no estudo de uma formulação empregando o extrato de *Tanacetum parthenium* e utilizando o Aerosil® como adjuvante.

A secagem por *spray dryer* é uma técnica muito utilizada para secagem em grandes volumes de diferentes soluções e matrizes. Em estudos para obtenção de extratos vegetais secos com adição de Aerosil® observam-se rendimentos de 78,7% na produção de *pellets* a partir do extrato seco por *spray dryer* (YATSU et al., 2016) e 80% no rendimento de secagem com a adição do adjuvante (VASCONCELOS et al., 2005). Os valores relatados são superiores aos observados em nosso estudo, o que pode ser atribuído a diferenças na composição da matriz e particularidades do equipamento. Segundo o fabricante do equipamento utilizado nesse trabalho, um

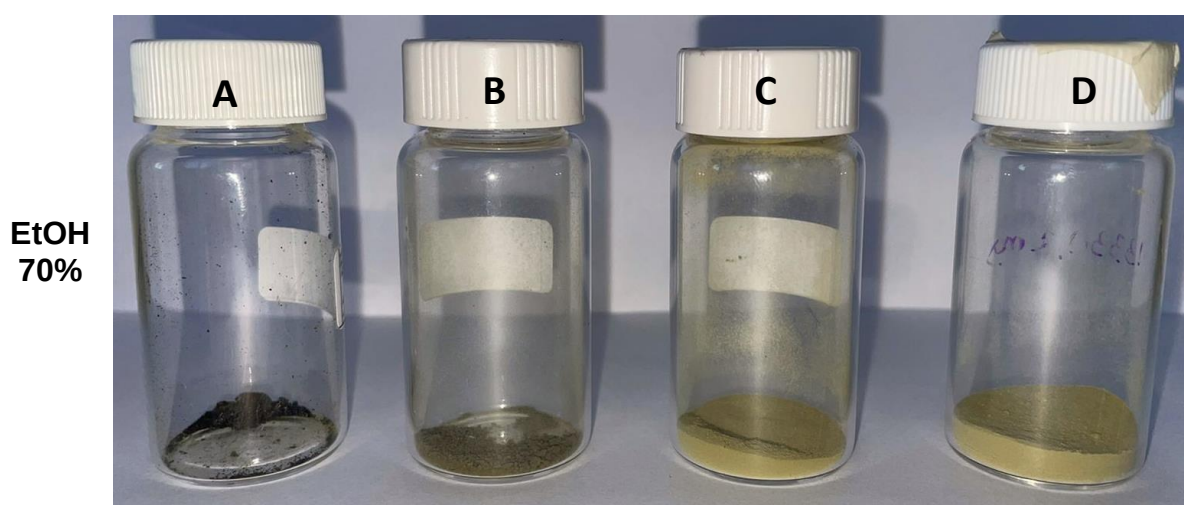
rendimento de pó de até 70% é usual (BUCHI, 2022). Portanto, os rendimentos obtidos neste estudo, além de se serem compatíveis com os valores obtidos na literatura, se encontram dentro do valor de rendimento descrito pelo fabricante para obtenção de extratos secos por *spray dryer*.

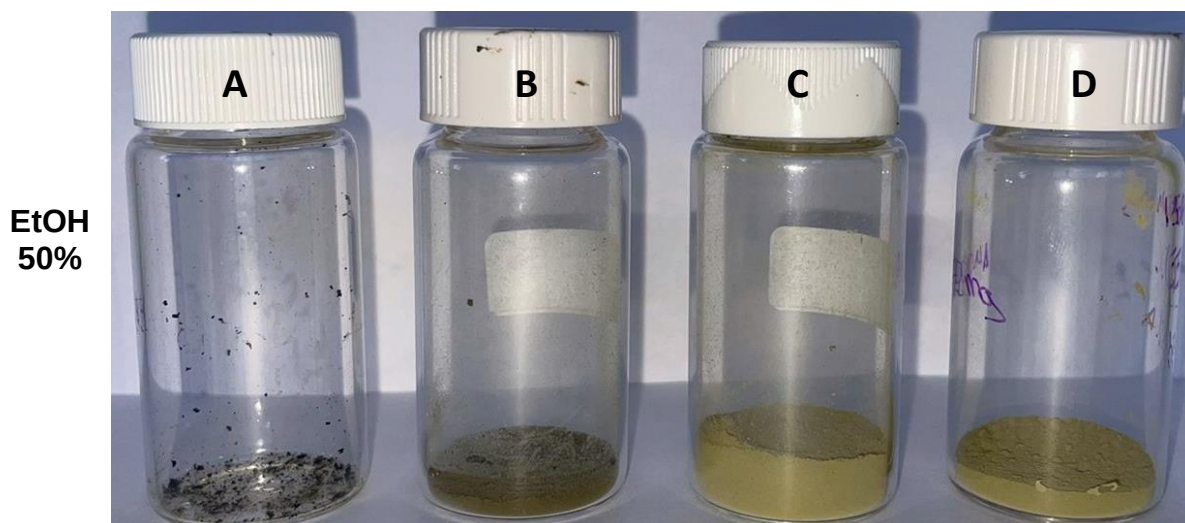
**Tabela 30.** Rendimento extrativo dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% secos por *spray-dryer*, com e sem a adição de Aerosil® como adjuvante. O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, após a utilização do pós-teste de Dunnett.

| Extrato  | % Aerosil® | Massa total (mg) | Massa extrato (mg) | Rendimento total (%) | Rendimento do extrato (%) |
|----------|------------|------------------|--------------------|----------------------|---------------------------|
| EtOH 50% | -          | 61,5             | 61,5               | 4,21 <sup>a</sup>    | 4,21                      |
|          | 12,5       | 566,2            | 495,42             | 38,78 <sup>b</sup>   | 33,93                     |
|          | 25         | 926,5            | 694,87             | 63,46 <sup>c</sup>   | 47,59                     |
|          | 35         | 423,5            | 275,27             | 30,07 <sup>b</sup>   | 19,23                     |
| EtOH 70% | -          | 205,6            | 205,6              | 9,39 <sup>a</sup>    | 9,39                      |
|          | 12,5       | 259,5            | 227,0              | 11,85 <sup>a</sup>   | 10,36                     |
|          | 25         | 226,07           | 169,0              | 10,32 <sup>a</sup>   | 7,72                      |
|          | 35         | 639,1            | 415,4              | 43,76 <sup>b</sup>   | 28,45                     |

Legenda: massa total (mg): massa total obtida do extrato seco após a secagem; massa do extrato (mg): massa total obtida do extrato descontando a massa do Aerosil® adicionada; rendimento total (%): rendimento total do extrato seco obtido após a secagem; rendimento do extrato (%): rendimento do extrato descontando a massa do Aerosil®.

**Figura 34.** Extratos secos EtOH 70% e EtOH 50% de *E. macrophyllus* obtidos pela secagem por *spray dryer* sem adição de adjuvante (A) com adição de Aerosil®, 12,5% (B), 25,0% (C) e 35% (D).





### 5.9.1 Caracterização físico-química e teor de marcadores químicos dos extratos secos por *spray dryer*

Na sequência, os extratos secos obtidos foram caracterizados pelo teor de umidade determinado por Karl Fisher, solubilidade em água, tamanho de partícula por DLS e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise da composição química por UPLC-DAD dos extratos preparados com e sem adição de Aerosil®.

Foram encontrados valores de umidade sem diferença estatística para os extratos EtOH 70% com 25 e 35% de Aerosil® e EtOH 50% com 25% de Aerosil®. O extrato EtOH 50% com 12,5% de Aerosil® foi o que apresentou maior umidade ( $7,61 \pm 0,03$ ), enquanto o extrato EtOH 70% com 12,5% de Aerosil® apresentou menor umidade (**Tabela 31**).

**Tabela 31.** Umidade dos extratos EtOH 50% e EtOH 70% secos por *spray-dryer* com adição de diferentes concentrações de Aerosil®, determinado por Karl Fisher ( $n=3$ ). O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, após a utilização do pós-teste de Dunnett.

| Extrato  | % de Aerosil® | Umidade (%) $\pm$ DP |
|----------|---------------|----------------------|
| EtOH 70% | 12,5          | $5,28 \pm 0,05^a$    |
|          | 25            | $6,59 \pm 0,04^b$    |
|          | 35            | $6,76 \pm 0,05^b$    |
| EtOH 50% | 12,5          | $7,61 \pm 0,03^c$    |
|          | 25            | $6,26 \pm 0,05^b$    |
|          | 35            | $5,39 \pm 0,07^a$    |

A umidade é um parâmetro de grande relevância para caracterização de pós, já que pode afetar a estabilidade de formulações farmacêuticas. A presença de umidade influencia a estabilidade química, estrutura cristalina, fluxo de pó, lubricidade de compactação, taxa de dissolução e permeabilidade de formas sólidas, além de favorecer o crescimento de microrganismos e promover mudança na viscosidade em formas de dosagem semissólidas. Portanto, a umidade influencia as propriedades de ingredientes ativos e excipientes individuais (LIU et al., 2022).

A Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (2019) não apresenta monografia para o extrato seco de *E. macrophyllus* ou de outras do gênero. A espécie consta do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia 1ª Edição (2018) como preparação extemporânea, mas não contém valores relacionados à umidade. No entanto, segundo a RDC nº199 de 12 de julho de 2002 da ANVISA, extratos secos vegetais devem conter no mínimo 95% m/m de resíduo seco calculados como porcentagem de massa (BRASIL, 2002).

Vários trabalhos descritos na literatura com o uso de Aerosil® em extratos vegetais relatam valores de umidade similares aos encontrados nesse estudo, como 7,58% de umidade para extrato hidroetanólico a 40% de *Passiflora edulis* contendo 1:1 de Aerosil® (SOUZA et al., 2000) e 7,51% de umidade para o extrato hidroetanólico a 62,7% de *Bidens pilosa* com 10% de Aerosil® (CORTES-ROJAS et al., 2015). No entanto, nenhum dado foi relatado para *E. macrophyllus*, apenas a umidade de 8,08% avaliada por Dias e colaboradores (2013) para a droga vegetal.

Na sequência, foi realizada a análise de solubilidade em água em triplicata para os extratos EtOH 50% e EtOH 70% com a adição de diferentes concentrações de Aerosil® (**Tabela 32**). Os extratos EtOH 50% não apresentaram diferença estatisticamente significativa de solubilidade em água para as concentrações de 12,5% e 25% m/m de Aerosil® (**Figura 35**). Já o extrato EtOH 70% com 12,5% de Aerosil® apresentou solubilidade em água inferior ao extrato EtOH 50%. Por sua vez, todos os extratos obtidos com adição de 35% de Aerosil® apresentaram redução significativa da solubilidade do pó (**Figura 35**).

A solubilidade é um critério importante para determinar o comportamento do pó em uma fase aquosa (SUHAG et al., 2021). Pós com baixa solubilidade em água apresentam limitação para administração por via oral. Além disso, compostos insolúveis em água resultam em uma baixa taxa de absorção no intestino, levando à diminuição da biodisponibilidade e aumento de efeitos colaterais, como irritação do

trato gastrointestinal, além da redução da absorção e disponibilidade dos ativos presente nos extratos (ZORZENON et al., 2021).

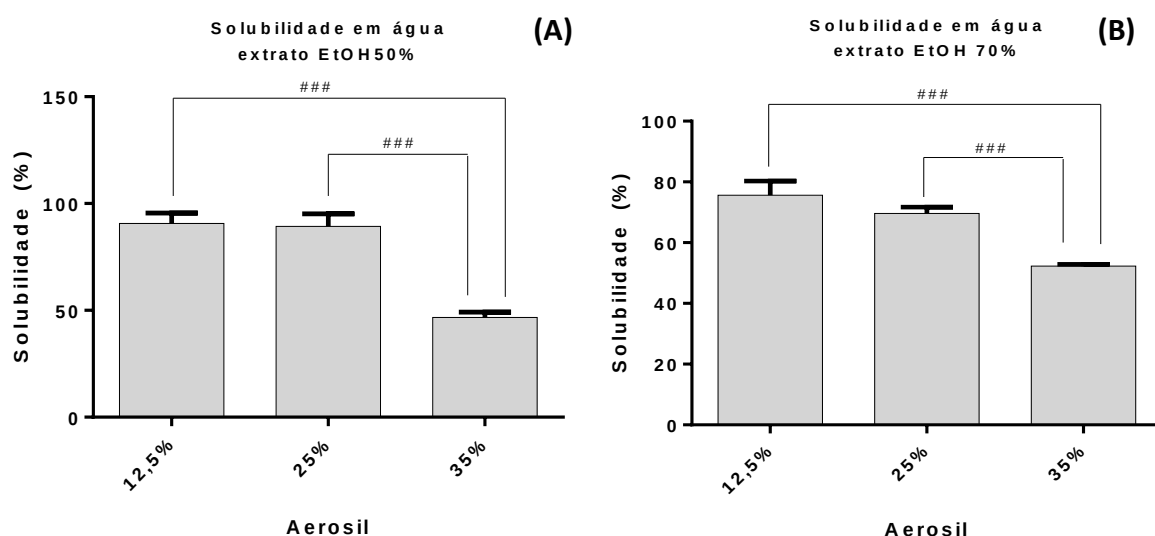
Nesse contexto, os extratos EtOH 50% com adição de 12,5% e 25% de Aerosil® apresentam solubilidade em água próximos a 90% viabilizando sua veiculação em formulação para administração por via oral. Os resultados obtidos indicam que o extrato EtOH 70% apresenta boa solubilidade com 12,5% de Aerosil® e o extrato EtOH 50% com 25% e 12,5% de Aerosil®.

**Tabela 32** Solubilidade em água dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% com a adição de Aerosil® realizados em triplicata. EtOH 50%: extrato hidroetanólico a 50%. EtOH 70%: extrato hidroetanólico a 70%. O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, após a utilização do pós-teste de Dunnett.

| Extrato                        | Replicata | Massa total (mg) | Massa de sólidos (mg) | Solubilidade (%) | Média solubilidade (%)  |
|--------------------------------|-----------|------------------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| EtOH 50%<br>+ 12,5%<br>Aerosil | 1         | 49258,4          | 8,5                   | 85               | 90,7 ± 4,9 <sup>a</sup> |
|                                | 2         | 47296,6          | 9,4                   | 94               |                         |
|                                | 3         | 46828,5          | 9,3                   | 93               |                         |
| EtOH 50%<br>+ 25%<br>Aerosil   | 1         | 49805,7          | 8,7                   | 87               | 89,3 ± 5,8 <sup>a</sup> |
|                                | 2         | 47711,0          | 8,5                   | 85               |                         |
|                                | 3         | 48819,1          | 9,6                   | 96               |                         |
| EtOH 50%<br>+ 35%<br>Aerosil   | 1         | 44414,1          | 4,7                   | 47               | 46,7 ± 2,5 <sup>b</sup> |
|                                | 2         | 118841,9         | 4,4                   | 44               |                         |
|                                | 3         | 46442,5          | 4,9                   | 49               |                         |
| EtOH 70%<br>+ 12,5%<br>Aerosil | 1         | 34747,2          | 7,3                   | 73               | 75,7 ± 4,6 <sup>c</sup> |
|                                | 2         | 47342,0          | 7,3                   | 73               |                         |
|                                | 3         | 48649,4          | 8,1                   | 81               |                         |
| EtOH 70%<br>+ 25%<br>Aerosil   | 1         | 46164,5          | 6,9                   | 69               | 69,7 ± 2,8 <sup>d</sup> |
|                                | 2         | 48742,9          | 6,8                   | 68               |                         |
|                                | 3         | 55246,9          | 7,2                   | 72               |                         |
| EtOH 70%<br>+ 35%<br>Aerosil   | 1         | 46114,5          | 6,6                   | 53               | 52,7 ± 2,6 <sup>d</sup> |
|                                | 2         | 48741,9          | 6,9                   | 52               |                         |
|                                | 3         | 55236,9          | 7,1                   | 53               |                         |

Legenda: massa total (mg): massa da placa com adição do extrato seco solubilizado em água; massa de sólidos (mg): massa do extrato seco obtida após a evaporação da água; solubilidade (%): relação da quantidade de massa relacionada ao volume adicionada para evaporação e obtida após o processo.

**Figura 35** Solubilidade em água dos extratos EtOH 50% (A) e EtOH 70% (B) obtidos por *spray dryer* com adição de diferentes concentrações de Aerosil®. #Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). A) 12,5%: extrato EtOH 50% com 12,5% de Aerosil®; 25%: extrato EtOH 50% com 25% de Aerosil®; 35%: extrato EtOH 50% com 35% de Aerosil®. B) 12,5%: extrato EtOH 70% com 12,5% de Aerosil®; 25%: extrato EtOH 70% com 25% de Aerosil®; 35%: extrato EtOH 70% com 35% de Aerosil®.



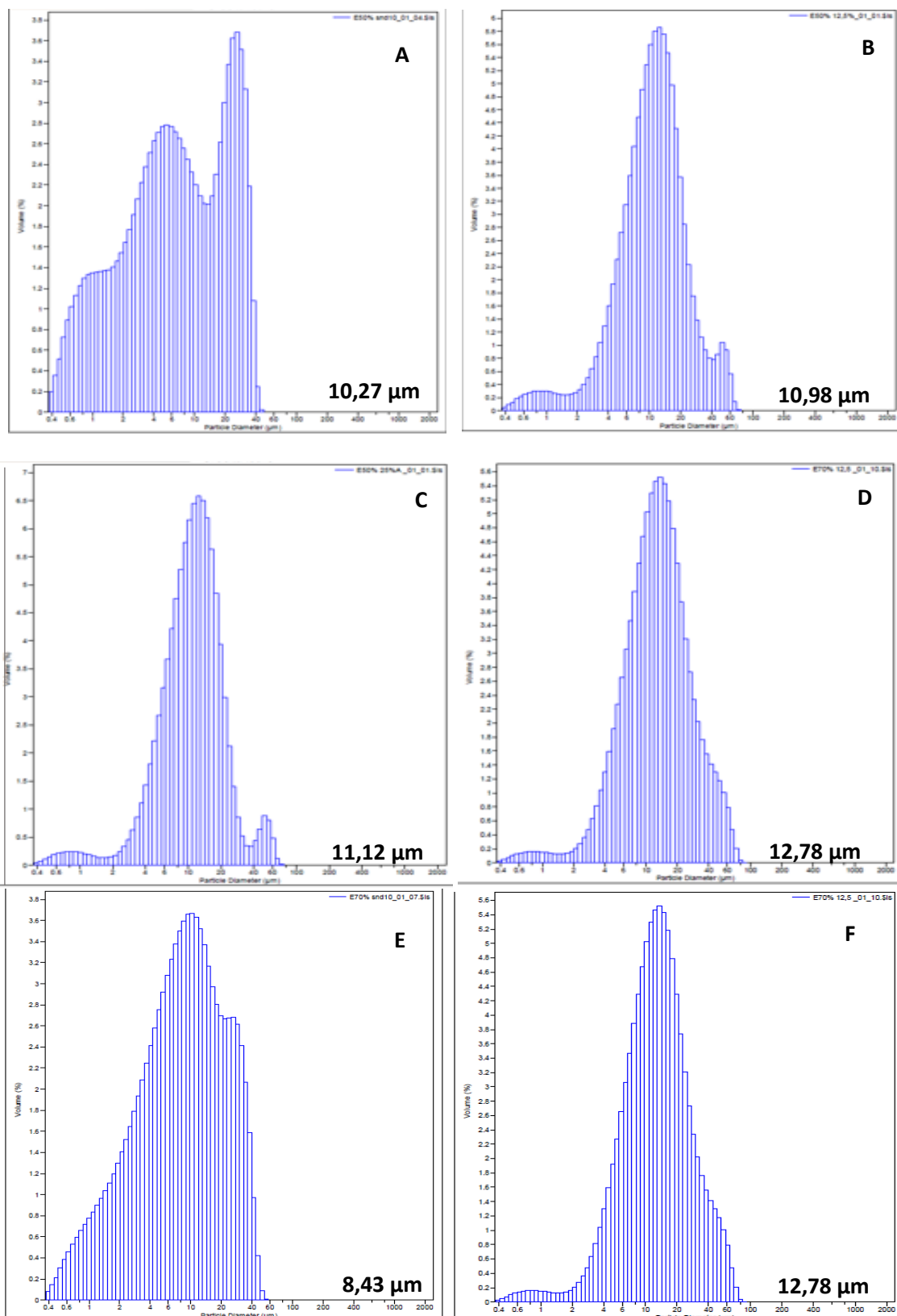
Na sequência da caracterização físico-química dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% foi realizada a determinação do tamanho de partícula por DLS e homogeneidade e uniformidade do tamanho das partículas. Observou que os extratos sem adição de Aerosil® apresentaram tamanho de partículas não uniformes com uma faixa maior de variação, com tamanho médio de 8,43-10,3  $\mu\text{m}$  (**Figura 36A e 36E**). Já com a adição de Aerosil® nas concentrações de 12,5%, 25% e 35% o tamanho de partículas ficou mais uniforme, com menor variação e tamanho médio de 10,20-12,78  $\mu\text{m}$ , conforme demonstrado na **Figura 36B, C, D, F, G e H**. Os resultados obtidos corroboram dados da literatura que indicam que a técnica de secagem por *spray dryer* usualmente fornece partículas com tamanho médio de partícula inferior a 10  $\mu\text{m}$  para pós secos em geral (SALEEM et al., 2017). Como exemplo, a caracterização de extrato seco obtido de *Rhamnus purshiana* por *spray dryer* revelou diâmetro de partículas determinado por DSL entre  $7,79 \pm 1,48$  e  $9,81 \pm 1,60$   $\mu\text{m}$  (GALLO et al., 2015). Uma faixa de variação estreita do tamanho de partículas de extratos vegetais secos por *spray dryer*, determinada por DLS, também foi descrita por Sarrate e colaboradores (2015).

O presente trabalho visa fornecer subsídios para o desenvolvimento futuro de uma formulação antiartrítica com administração por via oral, pois essa via é a mais conveniente e amplamente utilizada para administração de medicamentos, com maior aceitabilidade do paciente (KUMAR et al., 2018). No entanto, a baixa biodisponibilidade das formulações representa um desafio para a indústria farmacêutica explorar esta via de administração. Ao ser administrado por via oral, a formulação primeiro se dissolve no trato gastrointestinal e o fármaco solúvel torna-se então disponível para absorção através da barreira intestinal e atinja o local de destino (ABUSAR et al., 2018). Nesse contexto, partículas com menor tamanho possuem maior área superficial o que resulta em uma maior taxa de dissolução nos fluidos orgânicos e biodisponibilidade (KUMAR et al., 2022). Dessa forma, é factível supor que o extrato seco de *E. macrophyllus* desenvolvido apresente boa disponibilidade nos fluidos biológicos, tendo em vista o tamanho de partículas determinado, pois de acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), o tamanho de partícula recomendado é inferior a 150 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) para garantir uma boa dissolução e absorção no trato gastrointestinal. Partículas muito grandes podem ser inadequadamente absorvidas, enquanto partículas muito pequenas podem levar a problemas de homogeneidade na formulação e processos de fabricação (EMA, 2005).

Além de tamanho reduzido do tamanho de partícula, estudos demonstraram que para uma formulação apresentar boa disponibilidade e uniformidade de dissolução e absorção é necessário que o pó se apresente homogêneo e uniforme (LING et al., 2019). Portanto, visando a identificação da morfologia do pó do extrato seco de *E. macrophyllus* obtido por *spray dryer*, além da determinação do tamanho de partícula, foram realizadas análises por MEV. As análises indicaram a presença de partículas com formato esférico, com tamanho médio de aproximadamente 9-10  $\mu\text{M}$  (**Figura 37 A-F**), semelhante ao observado nas análises por DSL. Observou-se, ainda, que o aumento na concentração de Aerosil® de 25% para 35% resultou em maior regularidade das partículas para os extratos EtOH 70% e EtOH 50%. Cabe ressaltar que as partículas esféricas observadas são obtidas com a adição de Aerosil®, conforme descrito por Cortes-Rojas e colaboradores (2015).

**Figura 36.** Determinação do tamanho de partícula por DLS, expresso em média de tamanho, dos extratos EtOH 50% e EtOH 70%. (A) Extrato EtOH 50% sem adição de Aerosil®; extratos EtOH 50% preparados com adição de Aerosil® nas concentrações

(m/m) de 12,5% (B), 25% (C) e 35% (D). (E) Extrato EtOH 70% sem adição de Aerosil®; extratos EtOH 70% preparados com adição de Aerosil® nas concentrações (m/m) de 12,5% (F), 25% (G) e 35% (H).



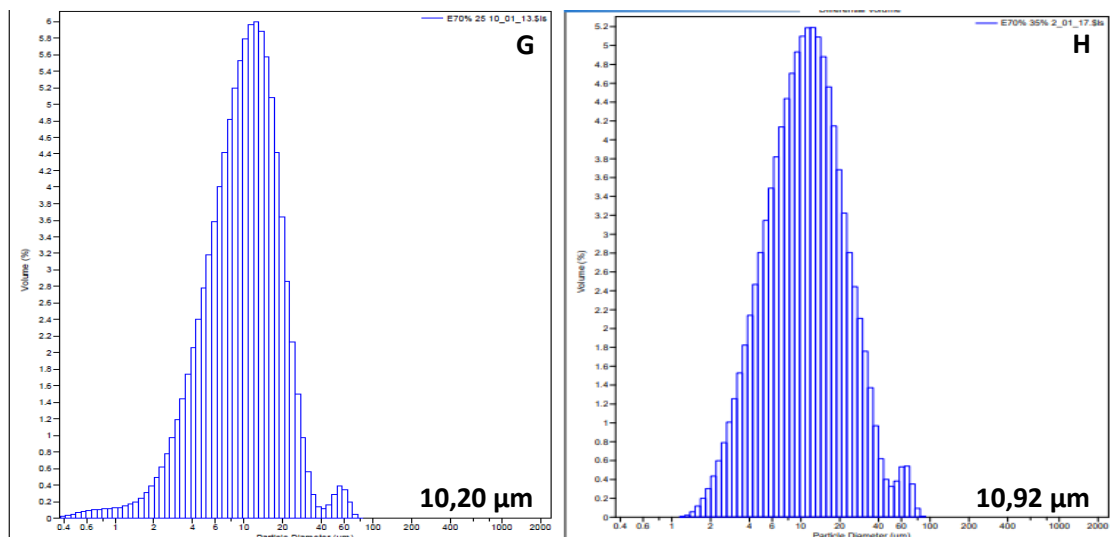
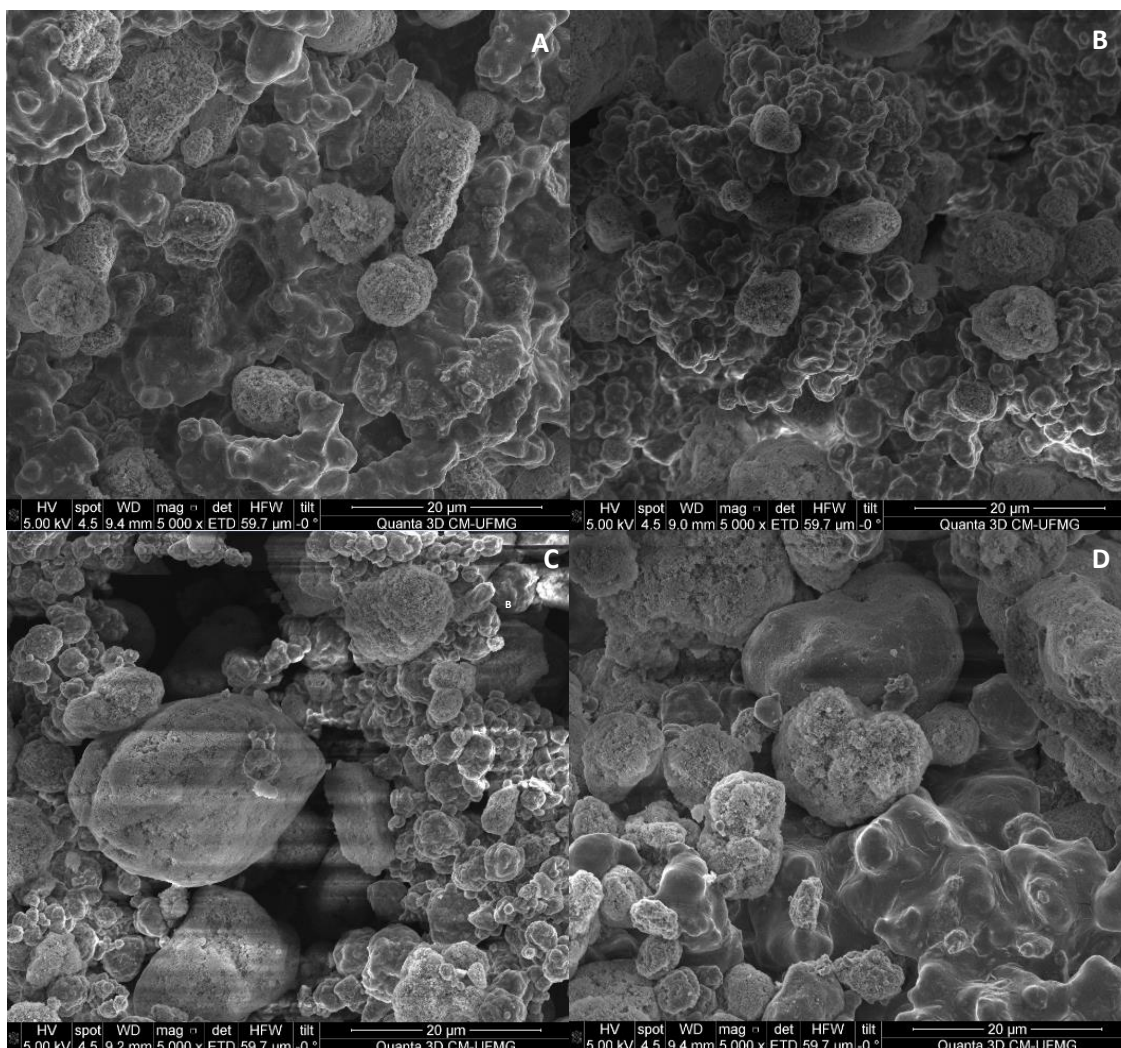
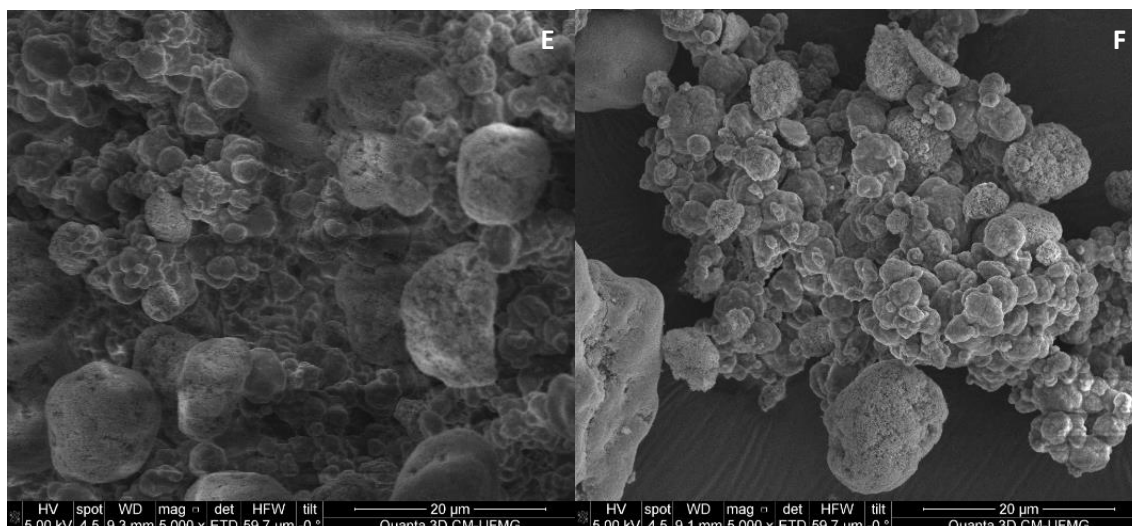


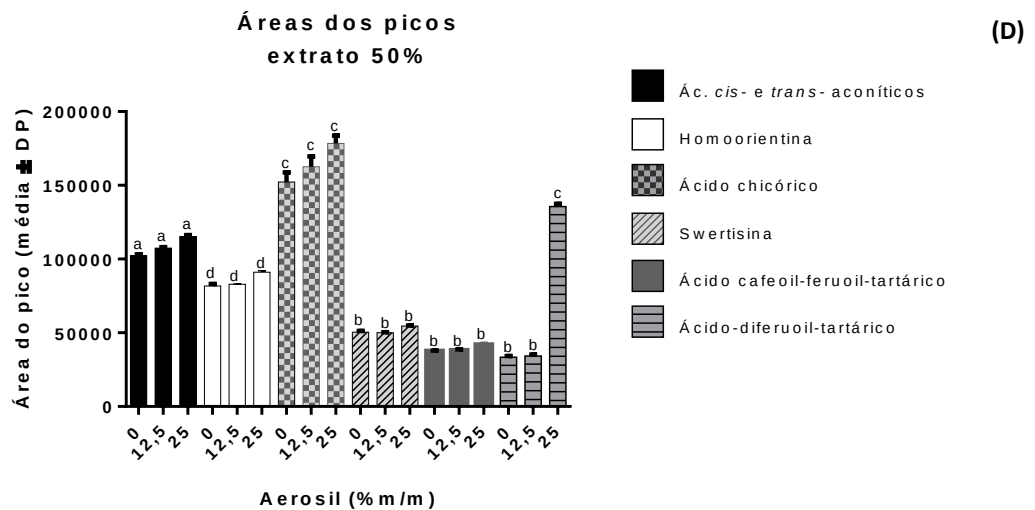
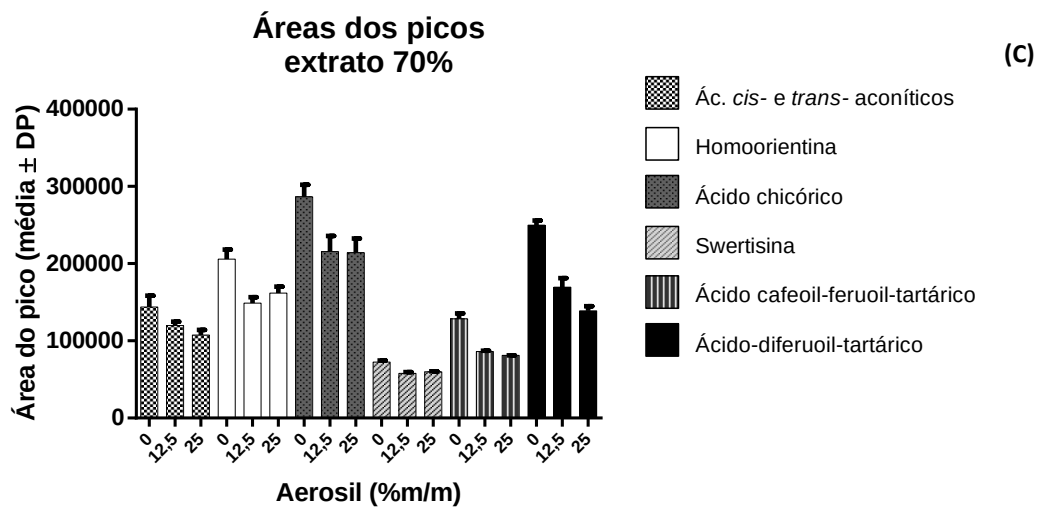
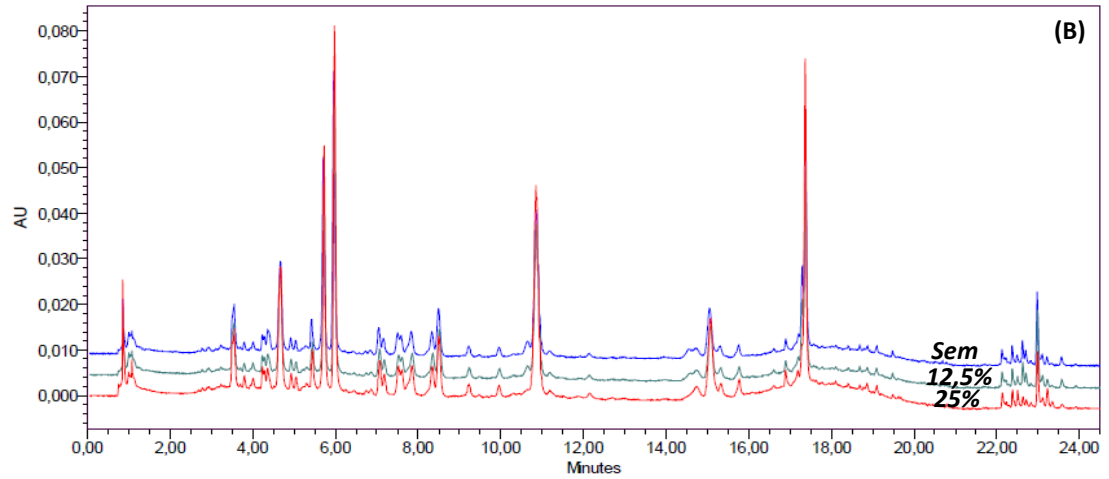
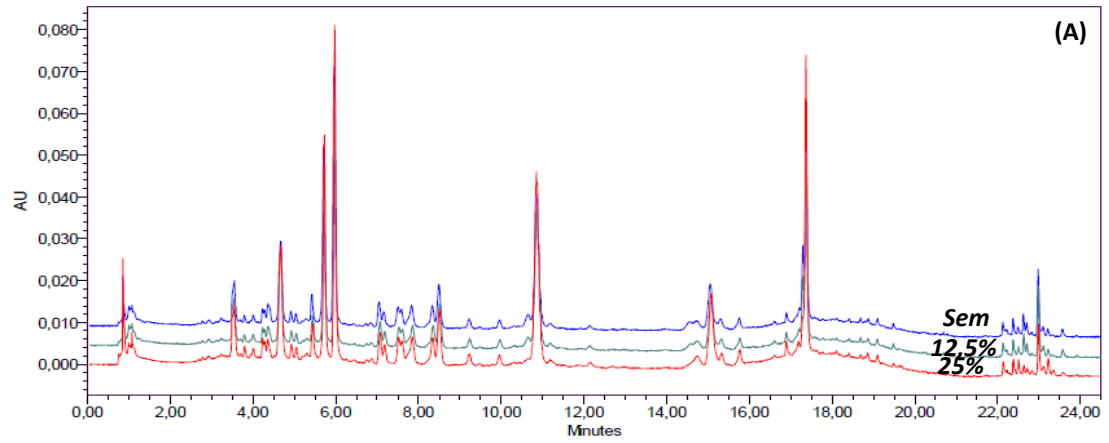
**Figura 37.** Microfotografias obtidas por MEV com ampliação de 5000× para os extratos secos de folhas de *E. macrophyllus* contendo Aerosil®. (A) Extrato EtOH 50% + 12,5% m/m de Aerosil®. (B) EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil®. (C) EtOH 50% + 35% m/m de Aerosil®. (D) EtOH 70% + 12,5% m/m de Aerosil®. (E) EtOH 70% + 25% m/m de Aerosil®. (E) EtOH 70% + 35% m/m de Aerosil®. Condições experimentais vide item 4.15.2.4.





Na sequência, foi realizada a análise química qualitativa dos extratos EtOH 70% e EtOH 50% sem a presença de Aerosil® e com 12,5%, 25% e 35% por UPLC-DAD. Pode-se observar que não houve degradação dos constituintes presentes no extrato pelo processo de secagem por *spray dryer*, com a adição do adjuvante, conforme representado pela superposição dos cromatogramas registrados para o extrato EtOH 50% (**Figura 38 A**) e para o extrato EtOH 70% (**Figura 38 B**). Ainda, para as diferentes concentrações de Aerosil® avaliadas, não se observou diferença significativa entre as áreas dos picos dos marcadores químicos nesses extratos com adição de Aerosil® e no extrato sem a adição do adjuvante (**Figura 38 C e D**).

**Figura 38.** Cromatogramas registrados por UPLC-DAD para os extratos EtOH 50% (A) e EtOH 70% (B) de *E. macrophyllus* preparados sem adição de Aerosil® (azul) e com adição de 12,5% (verde) e 25% (vermelho) de Aerosil®. Análise média das áreas dos picos ( $n = 3$ ) referentes aos marcadores químicos nos extratos EtOH 50% (C) e EtOH 70% (D) com e sem a adição do Aerosil®. Condições experimentais: vide item 4.8.2. O teste de ANOVA foi realizado comparando todos os grupos e a diferença estatística entre os grupos é demonstrada em a, b e c, pós-teste de Dunnett. 0: sem a adição de Aerosil®; 12,5: extrato com a adição de 12,5% de Aerosil®; 25: extrato com a adição de 25% de Aerosil®.



## **5.10 Obtenção e caracterização de formulação com extrato padronizado de *E. macrophyllus***

O desenvolvimento de formulações orais usualmente segue seguintes etapas: 1) definição do perfil de produto alvo a ser desenvolvido com qualidade; 2) avaliação das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas dos constituintes químicos relevantes para a seleção de formas farmacêuticas orais; 3) análise e simulação para definir a dose; 4) seleção de tecnologia de formulação apropriada e de métodos de teste *in vitro* para avaliar as formulações; 5) identificação de variáveis críticas de formulação que impactam na dissolução, biodisponibilidade e estabilidade da formulação; 6) estudo em modelos animais utilizando formulações protótipo para seleção de uma formulação piloto; 7) desenvolvimento de relação de resposta entre modelos *in vitro/in vivo* para auxiliar no desenvolvimento de produtos e definição de dose (KUENTZ, HOLM, ELDER, et al., 2016). No caso de cápsulas por via oral, as propriedades dos ingredientes farmacêuticos ativos (tamanho da partícula, forma, cristalinidade, solubilidade, carga e ionização do fármaco e fluidez) que podem impactar na uniformidade, dissolução, estabilidade e biodisponibilidade do conteúdo devem ser avaliadas, juntamente com os parâmetros críticos do processo, como velocidade, volume e tempo de mistura, além de tempo e temperatura de secagem, entre outros (KHADKA et al., 2018).

Portanto, visando a obtenção de formulação com os requisitos necessários para desenvolvimento por via oral, após a seleção e padronização do extrato EtOH 50% com adição de 25% de Aerosil® foi obtido um lote da formulação, em escala de bancada. A formulação produzida foi caracterizada por ensaios químicos e físico-químicos variados, e teve sua atividade antiartrítica avaliada em modelo de AIA.

### **5.10.1 Produção do lote da formulação**

Conforme discutido anteriormente, o extrato EtOH 50% contendo 25% de Aerosil® apresentou parâmetros farmacotécnicos e rendimento adequados, sendo selecionado para escalonamento para obtenção do lote da formulação em escala de bancada. O lote foi produzido com 900 g da droga vegetal DV2 de *E. macrophyllus*, que foi pulverizada e tamisada (850 µm). Posteriormente, a droga vegetal foi extraída por percolação com solução hidroetanólica a 50% na proporção de 1:150 mL (droga vegetal / solvente extrator). A percolação foi realizada por 6 dias consecutivos, com o intervalo de 24 horas entre as coletas das soluções extrativas, com fluxo de coleta de

5 mL/min. Após o término do período extrativo, as soluções extrativas foram reunidas e foi adicionado 25% m/m de Aerosil® considerando a massa teórica de resíduo seco esperado de acordo com os resultados dos ensaios iniciais de secagem. O etanol presente na solução extrativa foi evaporado em rotavapor e a parte aquosa evaporada em *spray dryer*, empregando as seguintes condições: temperatura 160 °C, fluxo do aspirador 38 m<sup>3</sup>/h e fluxo de secagem 6 mL/min. O rendimento obtido foi de 10,38% de extrato seco com a presença do adjuvante no processo de secagem. Cabe ressaltar que a extração por percolação da droga vegetal para obtenção do extrato EtOH 50% apresentou rendimento de aproximadamente 20% e, após adição do adjuvante e secagem no *spray dryer*, o valor de rendimento obtido foi de 10,38.

Conforme indicado pelo fabricante e já discutido anteriormente, os valores se encontram dentro das faixas esperadas para a secagem por atomização. O aspecto macroscópico do lote de extrato seco padronizado obtido é apresentado na **Figura 39**. O pó obtido apresentou características macroscópicas semelhantes ao do extrato obtido nos ensaios de desenvolvimento farmacotécnico. A fim de avaliar a reprodutibilidade do processo, realizou-se a caracterização química e físico-química do lote do extrato padronizado produzido.

**Figura 39.** Aspecto macroscópico do lote do extrato padronizado obtido de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% contendo 25% de Aerosil®).



#### 5.10.2 Caracterização química e físico-química do lote do extrato padronizado

A caracterização físico-química do lote do extrato padronizado foi realizada pela determinação da umidade, análise de tamanho de partícula por DLS e solubilidade em

água, de forma semelhante à descrita nos itens 4.15.3.1 e 4.15.3.2. O lote do extrato apresentou  $89,7 \pm 0,02\%$  de solubilidade em água,  $11,12 \pm 1,1 \mu\text{m}$  de tamanho de partícula por DLS e  $6,65 \pm 0,07 \%$  de umidade por Karl Fisher. Os valores obtidos são bastante similares aos do extrato seco produzido durante o desenvolvimento farmacotécnico (item 5.8), indicando a reprodutibilidade do método.

As formulações fitoterápicas apresentam ampla aceitabilidade como agentes terapêuticos para várias doenças. No entanto, a diversidade funcional e estrutural de constituintes de fitoterápicos, conteúdo variável em diferentes lotes de materiais vegetais e uso inconsistente de métodos de extração e formulações são fatores associados à dificuldade no desenvolvimento desses produtos (CARMONA; PEREIRA, 2013). Assim, a complexidade dos extratos vegetais torna o desenvolvimento de um fitoterápico uma tarefa difícil que requer um grande esforço analítico e o desenvolvimento de inúmeras etapas controladas de fabricação para produzir preparações fitoterápicas padronizadas e bem definidas (CRAVOTTO et al., 2010). Portanto, a reprodutibilidade dos dados obtidos (tamanho de partícula, umidade e solubilidade em água) para o lote obtido nesse estudo indica que foi estabelecido um método reprodutível para obtenção do extrato EtOH 50% de *E. macrophyllus* a ser empregado no desenvolvimento de uma formulação antiartrítica para administração por via oral.

### **5.10.3 Formulação do extrato seco desenvolvido**

Na sequência, foram realizados estudos de formulação com o lote do extrato padronizado de *E. macrophyllus*, visando sua veiculação por via oral, em cápsulas. Para tanto, avaliou-se a análise de fluxo de pó e determinou-se o teor dos marcadores definidos.

#### **5.10.3.1 Análise de fluidez do pó para encapsulação**

Após a produção do lote piloto, foi realizado o estudo de fluxo de pó para determinar se o extrato seco obtido possui características necessárias para a posterior encapsulação para administração por via oral. Os ensaios foram realizados conforme preconizado pela USP 31 e descrito por Ermis e Karasu (2020). Para encapsulação, um pó necessita apresentar baixa umidade para assegurar a estabilidade de seus constituintes, fluidez do pó, bem como tamanho de partícula uniforme e homogênea para uma absorção linear, além de solubilidade em água visando absorção e

biodisponibilidade adequadas (GRGIĆ et al., 2020). Além disso, é necessário que o pó apresente fluxo adequado para o encapsulamento, evitando perda do material, adesão na mesa de encapsulamento ou até mesmo a formação de grumos (KLOSOWSKA et al., 2023). Portanto, para avaliar as propriedades de fluxo do lote do extrato padronizado desenvolvido, foi realizada a análise de densidade do mesmo. O resultado obtido (**Tabela 33**) indicou propriedades de fluxo inadequadas para encapsulamento conforme parâmetros propostos pela USP 31 (**Tabela 11**). Para contornar essa inadequação, avaliou-se a adição de celulose microcristalina 100 em diferentes concentrações (1-10% m/m), após homogeneização por diluição geométrica. Observou-se que o pó com a adição de 10% m/m de celulose apresentou as melhores características de fluxo para encapsulamento, dentre as formulações avaliadas (**Tabela 33**), conforme proposta pela USP 31 (**Tabela 11**).

**Tabela 33.** Formulação do extrato seco do lote piloto (EtOH 50% + 25% de Aerosil®) com adição de celulose microcristalina.

| Extrato seco           | Densidade inicial (g/mL) | Densidade final (g/mL) | Razão de Hausner | Característica do pó |
|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|----------------------|
| Extrato inicial        | 0,33                     | 0,465                  | 1,40             | Ruim                 |
| Extrato + 2% celulose  | 0,24                     | 0,31                   | 1,31             | Aceitável            |
| Extrato + 5% celulose  | 0,2525                   | 0,3125                 | 1,23             | Razoável             |
| Extrato + 7% celulose  | 0,25                     | 0,3125                 | 1,25             | Razoável             |
| Extrato + 10% celulose | 0,2564                   | 0,2985                 | 1,16             | Bom                  |

Adicionalmente foi realizada a determinação do ângulo de repouso da formulação contendo 10% m/m de celulose, obtendo-se o valor  $25,56 \pm 0,32^\circ$ . Um valor de ângulo de repouso entre  $25-30^\circ$  indica que o pó possui fluxo excelente, de acordo com a USP 31, e um bom fluxo, segundo Ermis e Karasu (2020). No entanto, para formulações fitoterápicas foram descritos ângulos de repouso de até  $35,7^\circ$  (CHAVES et al., 2009),  $41,90^\circ$  (NIK et al., 2019),  $49^\circ$  (ERMIS; KARASU, 2020) e  $11,44^\circ$  (PAWAR et al., 2018). Alguns autores consideram que para o pó obtido a partir de extrato vegetal, devido à complexidade e heterogeneidade da matriz, espera-se um valor de ângulo de repouso maior que  $30^\circ$ , por isso, englobar os extratos secos vegetais padronizados em formulações são de grande relevância para atribuir propriedades tecnológicas de fluxo aos fitoterápicos (CHAVES et al., 2009).

A utilização da celulose como excipiente para otimização de propriedades de fluxo de pó foi descrita em diferentes formulações (SALÚSTIO et al., 2020). Para o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos foram empregadas diferentes concentrações de celulose com diferentes extratos vegetais, alguns deles também contendo Aerosil®. Pode-se citar, como exemplos, a formulação de *Petiveria alliacea* com 15% m/m de Aerosil® e 7,33% m/m de celulose (GARCIA-PEREZ et al., 2017), a formulação de *Tanacetum parthenium* com 0,5% m/m de Aerosil® e 63 % m/m de celulose (JIN et al., 2008) e a formulação de *Ximenia americana* com 1,0 % m/m de Aerosil® e 41% m/m de celulose (SANTANA et al., 2018).

#### 5.10.4 Teores de marcadores químicos

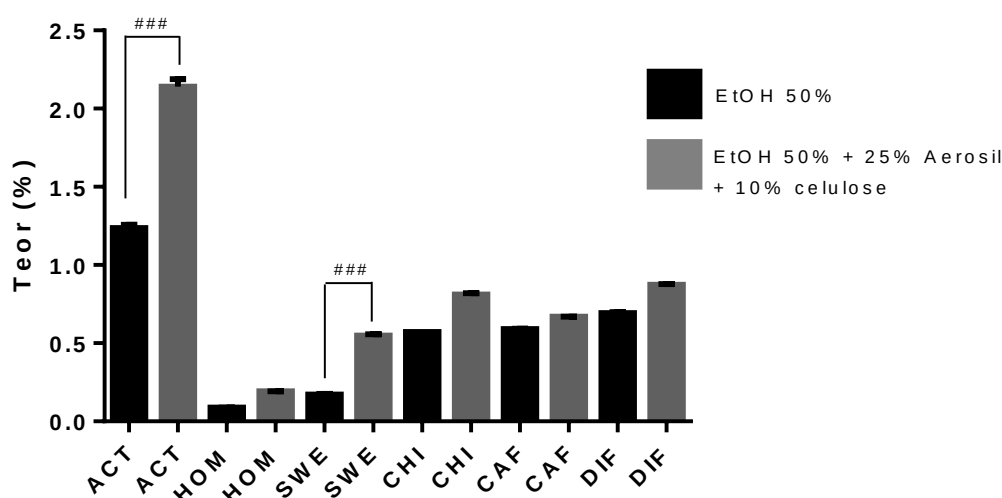
Após a caracterização e análise do fluxo do pó, foi realizada a quantificação por UPLC-DAD dos marcadores químicos para analisar se o processo de produção do lote da formulação (extrato EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil® + 10% m/m de celulose) manteve a concentração dos marcadores químicos determinada no extrato EtOH 50% de origem. Observou-se que o lote da formulação desenvolvida apresenta maiores teores dos ácidos *cis* e *trans*-aconítico e swertisina do que o extrato EtOH 50% obtido anteriormente. Em uma análise geral, observou-se que os teores de marcadores químicos foram maiores ou se mantiveram iguais no fitoterápico formulado com Aerosil® e celulose (**Figura 40**).

Para garantir a qualidade da produção de medicamentos fitoterápicos, a padronização é um passo importante para o estabelecimento de uma atividade biológica consistente, um perfil químico com a quantificação dos marcadores químicos adequadas, visando contribuir com a eficácia do tripé de eficácia, qualidade e segurança desses medicamentos (CHOUDHARY; SEKHON, 2011).

Sabe-se que a quantidade de um marcador químico pode ser um indicador da qualidade de um fitoterápico, pois a mesma pode ser afetada por muitos fatores, incluindo variações sazonais, local e época de colheita do material vegetal, processamento pós-colheita, adulterantes ou substitutos de matérias-primas e procedimentos de extração e obtenção dos derivados que podem interferir no teor dos marcadores químicos. Desde a colheita até a fabricação, os marcadores químicos desempenham um papel crucial para avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos. Portanto, é esperado alterações nos teores dos marcadores químicos durante o processo de produção de fitoterápicos devido as alterações químicas da

matriz complexa vegetal (LI et al., 2008). No entanto, os dados obtidos nesse trabalho mostram que a adição de Aerosil® aumentou o teor dos ácidos e *cis* e *trans*-aconítico, o que pode estar relacionado com o aumento da solubilidade do extrato em água, melhorando a solubilidade do extrato para injeção e quantificação. Estudos anteriores relataram que a adição de Aerosil® melhora a dissolução e a solubilidade de extratos em água, sendo considerado um adjuvante relevante para superar baixa solubilidade (MOLLER; MUNZENBERG, 2017).

**Figura 40.** Teores de marcadores químicos no lote da formulação do extrato EtOH 50% padronizado de *E. macrophyllus*. Comparação entre o teor do extrato EtOH 50% e do lote da formulação ( $n = 3$ ). Condições experimentais: vide item 4.8.2. #Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (### $p < 0,001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). ACT: ácidos *cis*- e *trans*-aconítico; HOM: homoorientina; SWE: swertisina; CHI: ácido chicórico; CAF: ácido cafeoil-feruloil-tartárico; DIF: ácido diferuloil-tartático.



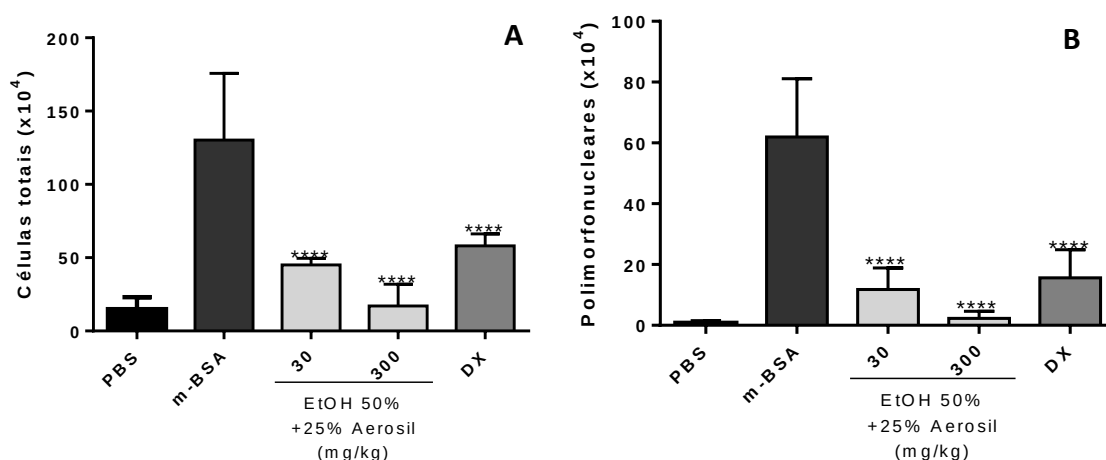
#### 5.10.5 Avaliação da atividade antiartrítica da formulação em modelo de AIA agudo

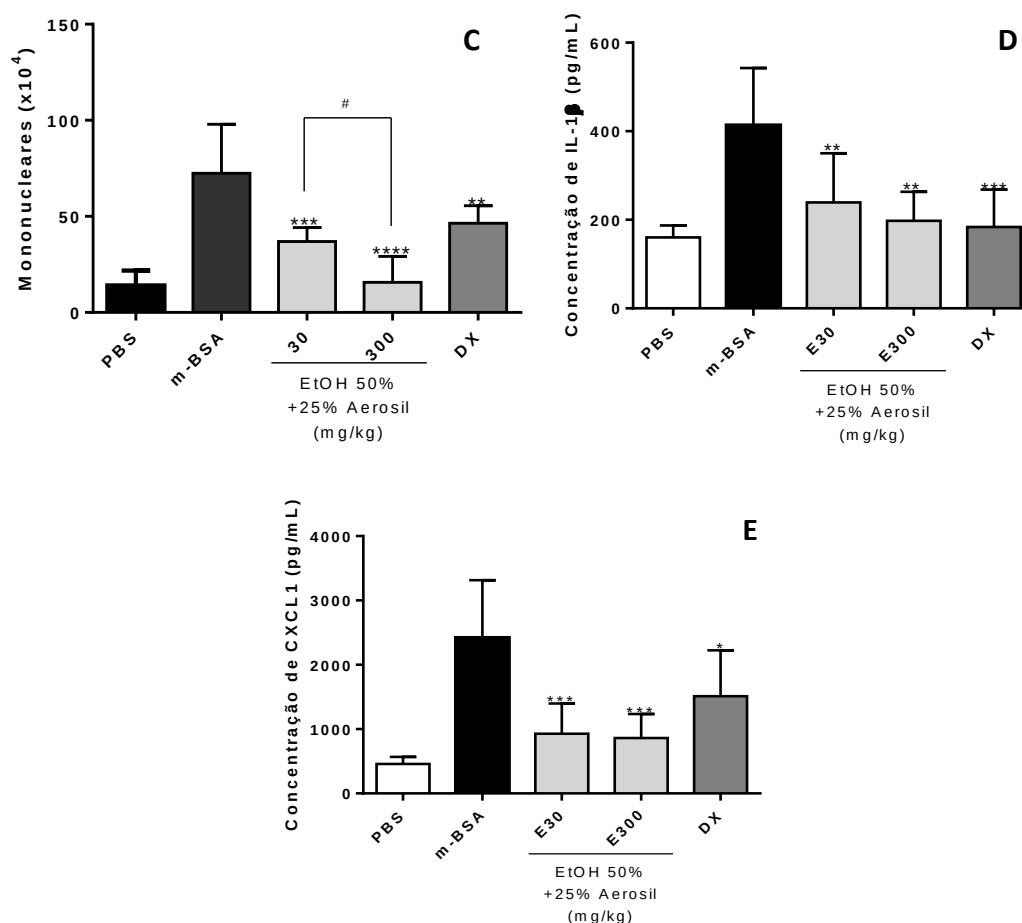
O lote da formulação desenvolvida (extrato EtOH 50% padronizado de folhas de *E. macrophyllus* contendo 25% de Aerosil® e 10% de celulose) teve sua atividade antiartrítica avaliada em modelo de AIA agudo. Pode-se observar, na **Figura 41**, que a formulação, nas doses de 30 e 300 mg/kg, induziu redução das células inflamatórias totais ( $66,2 \pm 2,7\%$  e  $88,7 \pm 11,1\%$ , respectivamente), das células mononucleares ( $48,9 \pm 9,9\%$  e  $81,0 \pm 18,8\%$ , respectivamente) e das células polimorfonucleares ( $80,9 \pm 11,4\%$  e  $96,9 \pm 3,8\%$ , respectivamente). A dexametasona (5 mg/kg), empregada

como controle positivo, promoveu redução de células totais inflamatórias ( $55,5 \pm 6,4\%$ ), mononucleares ( $35,9 \pm 12,7\%$ ) e polimorfonucleares ( $74,7 \pm 14,9\%$ ).

Também realizamos a quantificação da citocina inflamatória IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL-1 no tecido periarticular dos animais. O tratamento dos animais com a formulação promoveu significativa redução de IL-1 $\beta$  nas doses de 30 mg/kg ( $43,6 \pm 20,9\%$  de redução) e de 300 mg/kg ( $45,2 \pm 18,2\%$  de redução), enquanto a dexametasona (5 mg/kg) induziu redução de  $58,1 \pm 8,2\%$ . Já para CXCL1, a formulação promoveu redução da quimiocina de  $61,6 \pm 18,4\%$  e de  $64,3 \pm 15,4\%$ , respectivamente, nas doses de 30 e 300 mg/kg. A dexametasona (5mg/kg) também reduziu a liberação da quimiocina em de  $37,4 \pm 29,4\%$  (**Figura 41**).

**Figura 41.** Atividade anti-inflamatória do lote da formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de folhas contendo 25% m/m de Aerosil® + 10% m/m de celulose) em modelo de AIA agudo. Os dados representam a média  $\pm$  DP ( $n = 6$ ). Número de células na cavidade intra-articular: (A) células totais; (B) neutrófilos; (C) monócitos. Concentrações de IL-1 $\beta$  e (D) e CXCL-1 (E) no tecido periarticular. \*Indica a diferença significativa com o grupo de animais estimulados e tratados com o veículo (\* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). # Indica diferença significativa entre os grupos avaliados (# $p < 0,05$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). PBS: animais não tratados; mBSA: desafiado; Dx: dexametasona (5 mg/kg); 30: extrato EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil® a 30 mg/kg; 300: extrato EtOH 50% + 25% m/m de Aerosil® a 300 mg/kg.





Também foi realizada a análise histológica do tecido periarticular e da articulação íntegra dos animais avaliados no modelo de AIA agudo pela coloração com HE. Pode-se observar que a formulação, nas doses de 30 e 300 mg/kg, reduziu o número de células inflamatórias no tecido, observando uma redução do processo inflamatório local (**Figura 42**). Ainda, observou-se que nos animais tratados com a formulação na dose de 30 mg/kg, o nível de inflamação no tecido articular passou de intensa (animais desafiados sem tratamento) para branda (animais tratados com a formulação a 30 mg/kg). Já nos animais tratados com o fitoterápico na dose de 300 mg/kg, a inflamação intensa (grupo desafiado sem tratamento) passou para leve (grupo tratado com a formulação 300 mg/kg), demonstrando o potencial anti-inflamatório do fitoterápico por via oral (**Figura 43**). Além disso, na dose de 300 mg/kg foi observada redução dos parâmetros de inflamação total, sinóvia e redução da reabsorção óssea, comprovando a ação anti-inflamatória e antiartrítica da formulação por via oral (**Figuras 44**).

**Figura 42.** Histologia do tecido periarticular (40x) de animais tratados com a formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de folhas contendo 25% m/m de Aerosil® + 10% m/m de celulose) em modelo de AIA agudo, com coloração por HE. (A) controle; (B) desafiado; (C) dexametasona 5 mg/kg; (D) formulação a 30 mg/kg; (E) formulação a 300 mg/kg. As setas indicam as células inflamatórias.

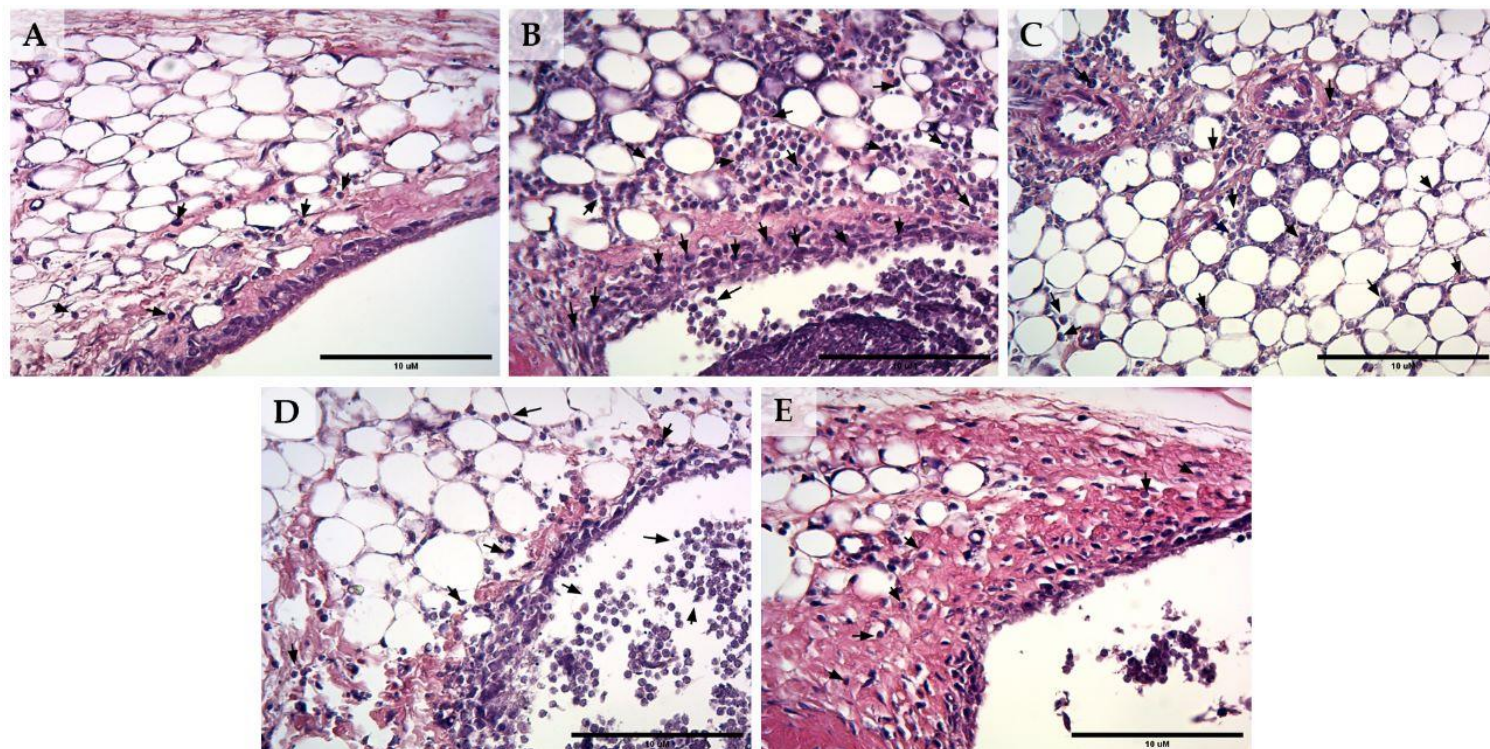


**Figura 43.** Perfil de infiltrado celular inflamatório no modelo de AIA agudo após tratamento com a formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de folhas de *E. macrophyllus* contendo 25% m/m de Aerosil® e 10% m/m de celulose). C: controle; D: desafiado; Dx: dexametasona 5mg/kg; E30: formulação 30 mg/kg; E300: formulação 300 mg/kg.

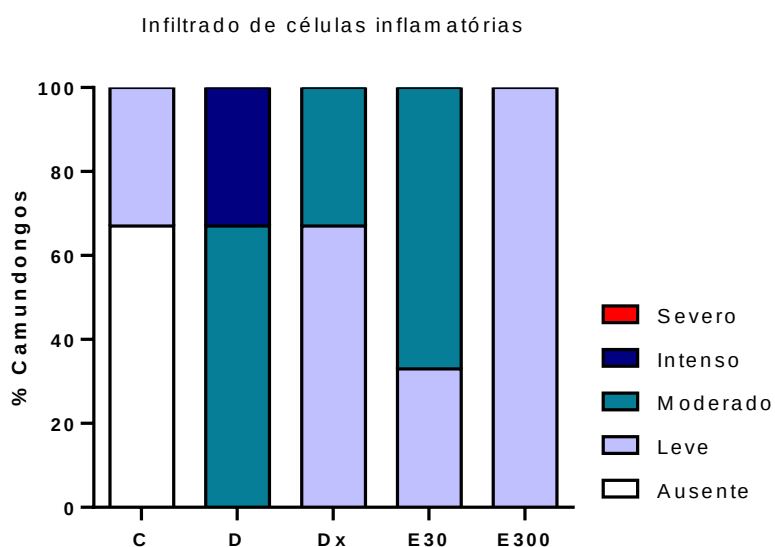
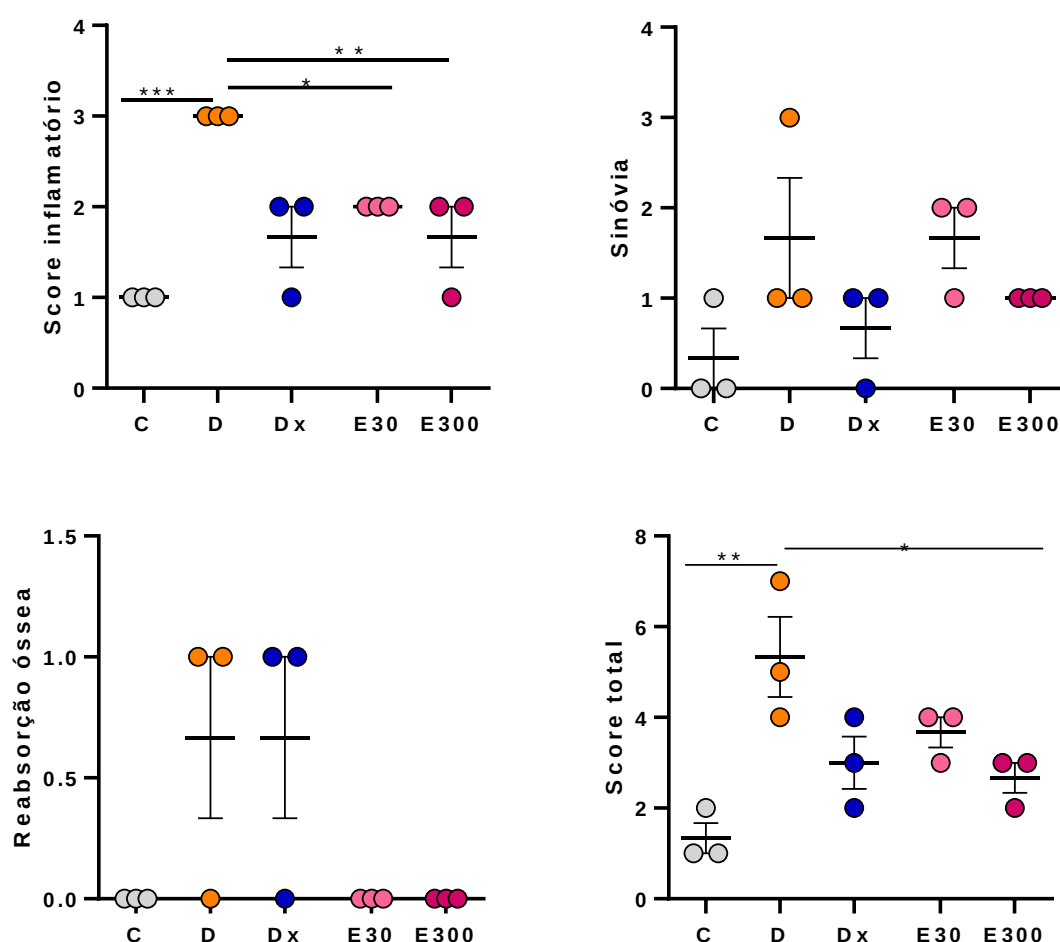


**Figura 44.** Análise do perfil inflamatório total, inflamação na sinóvia, parâmetros inflamatórios teciduais e de reabsorção óssea após administração da formulação de *E. macrophyllus* (extrato EtOH 50% de partes áreas contendo 25% m/m de Aerosil® e 10% m/m de celulose) em modelo de AIA agudo. \* Indica diferença dos tratamentos entre os grupos controle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ANOVA, pós-teste de Dunnett). C: controle; D: desafiado; Dx: dexametasona 5 mg/kg; E30: formulação 30 mg/kg; E300: formulação 300 mg/kg.



Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes em pacientes com quadro de artrites, especialmente AR. Assim, esses tipos celulares estão associados a danos e perda de função das articulações, observados nas manifestações clínicas da patologia, seja resultante da função fagocítica ou do desencadeamento da cascata inflamatória. Já as células mononucleares, cuja administração da formulação (300 mg/kg) aos animais com AIA induziu maior redução (BRADFORD et al., 2015; COELHO et al., 2008). Dessa forma, a diminuição do influxo neutrofílico para a

cavidade articular está associada com a melhora significativa do quadro de AR. Esta característica pode ser observada para a formulação avaliada.

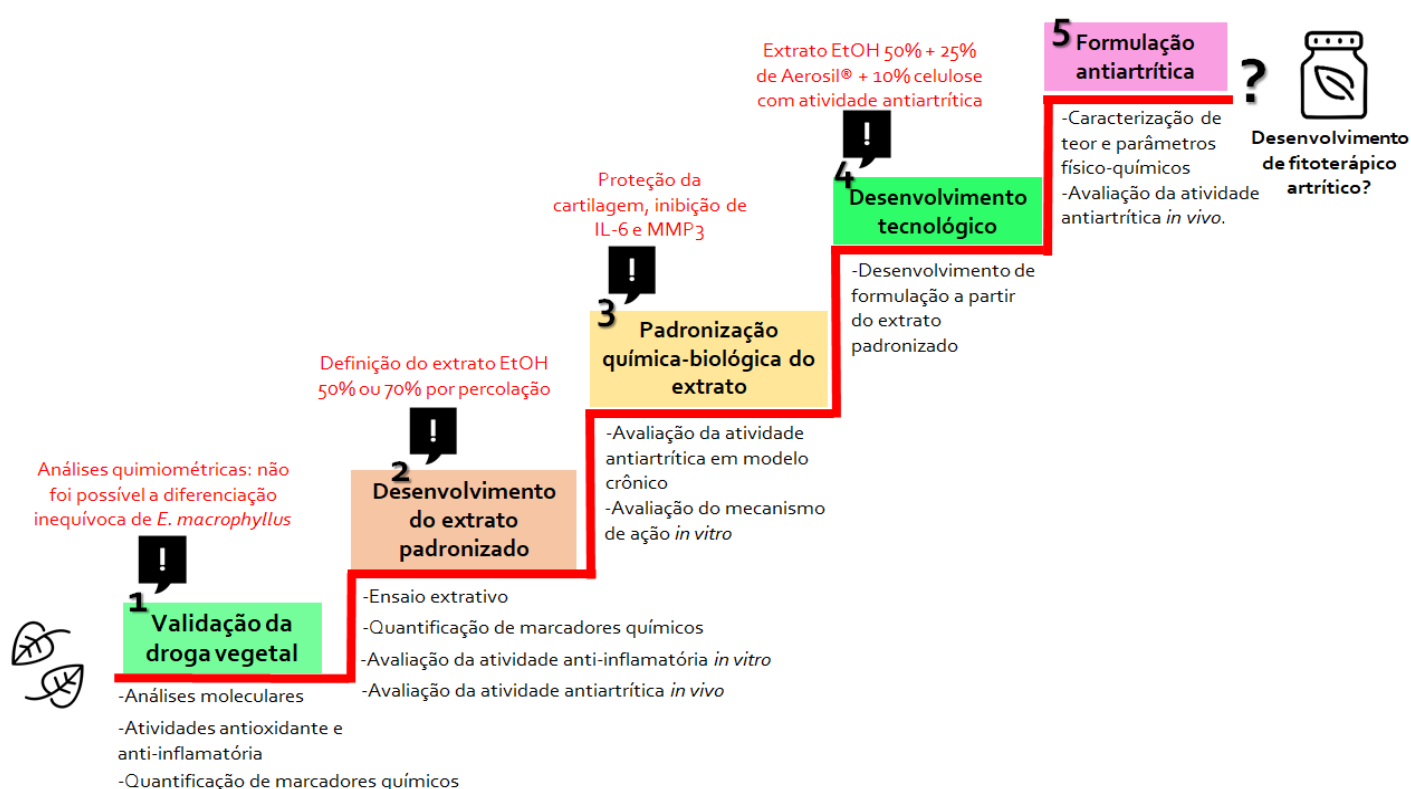
Nesse contexto, o modelo pré-clínico de AIA compartilha várias características patológicas com a AR, como o processo inflamatório relacionado ao aumento de células no local da articulação, como neutrófilos e monócitos, além do papel das citocinas na progressão da artrite (PAVAL et al., 2009). Portanto, substâncias capazes de reduzir o número de células inflamatórias e citocinas neste modelo apresentam potencial para desenvolvimento como agente antiartrítico (QASIN et al., 2021). Nesse sentido a formulação desenvolvida com o extrato EtOH 50% de *E. macrophyllus* promoveu a redução de células inflamatórias e citocinas nas doses de 30 e 300 mg/kg, demonstrando seu potencial como agente antiartrítico.

Citocinas, como IL-1 $\beta$ , estimulam neutrófilos, os quais liberam substâncias pró-inflamatórias como prostaglandinas, leucotrienos, COX-2, moléculas de adesão, elastases, proteases, incluindo metaloproteinases de matriz (MMP) e enzimas lisossomais, e ROS, os quais degradam as proteoglicanos presentes na camada superficial de cartilagem. A inibição da produção de IL-1 $\beta$  foi demonstrada em vários estudos como capaz de reduzir a inflamação e o dano tecidual (DINARELLO; SIMON; MEER, 2012). Já a quimiocina CXCL-1, como outras quimiocinas da classe CXC, apresentam atividade quimioatrativa, ou seja, liberam mediadores químicos que atraem neutrófilos para o sítio lesionado. Portanto, a redução na concentração de CXCL1 apresenta relação direta com a diminuição da migração de neutrófilos para o tecido periarticular (PALOMINO; MARTI, 2015). A redução nos níveis de citocinas e quimiocinas induzido pelo tratamento com a formulação de *E. macrophyllus* indica que seu mecanismo de ação está associado com a redução de, IL-1 $\beta$ , CXCL1, neutrófilos, monócitos e células inflamatórias totais na cavidade inflamada neste modelo. Ainda, cabe ressaltar que o extrato seco padronizado empregado para o desenvolvimento da formulação reduziu a concentração de IL-6, e MMP no ensaio *in vitro* com condrócitos murinos (item 5.7.2), mecanismo que explicaria a diminuição do processo de degeneração da cartilagem pela proteção dos proteoglicanos observado no modelo de AIA crônico (item 5.7.1).

### 5.11 Síntese das atividades realizadas com vistas ao desenvolvimento futuro de fitoterápico antiartrítico de *E. macrophyllus*

No presente trabalho foi realizado o desenvolvimento racional de uma formulação com potencial antiartrítico a partir de folhas de *E. macrophyllus*, utilizando o extrato padronizado EtOH 50% com adição de 25% m/m de Aerosil® e 10% m/m de celulose microcristalina. O extrato padronizado e a formulação obtida cumpriram diversas etapas pré-clínicas requeridas para desenvolver um produto fitoterápico. O diferencial do trabalho consiste no desenvolvimento racional da formulação desde a droga vegetal, seguindo a sequência: avaliação molecular, química e de atividades biológicas da droga vegetal, ensaios extrativos, ensaios biológicos *in vitro*, ensaios farmacológicos *in vivo* de prova de conceito, padronização química do extrato, ensaios farmacológicos *in vivo* em modelo de doença, análises quimiométricas, desenvolvimento farmacotécnico, obtenção de lote da formulação em escala de bancada. A sequência do desenvolvimento racional e os principais resultados obtidos no trabalho visando o desenvolvimento de fitoterápico com *E. macrophyllus* são representados na **Figura 45**.

**Figura 45:** Sequência do desenvolvimento racional do extrato padronizado e formulação com *E. macrophyllus* e principais resultados obtidos neste trabalho, com vista ao desenvolvimento futuro de fitoterápico antiartrítico.



## 6. CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho com duas espécies denominadas popularmente de chapéu-de-couro – *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* – não indicaram diferenças significativas na composição química e atividades biológicas *in vitro*. Análises quimiométricas de PCA também não possibilitaram diferenciar as duas espécies com base na composição química quantitativa e atividades biológicas *in vitro*, mas evidenciaram diferenças intraespecíficas em *E. macrophyllus* obtidas de fonte comercial e de exemplar cultivado. Os marcadores químicos ácidos *cis*- e *trans*-aconítico, swertisina, homoorientina, ácido chicórico, ácido cafeoil-feruloil-tartárico e ácido diferuloil-tartárico foram definidos para *E. macrophyllus*.

Nos ensaios extrativos foi demonstrado que o melhor método extrativo para obtenção de derivados vegetais de *E. macrophyllus* é a percolação, sendo os maiores rendimentos extrativos observados para os extratos EtOH 70% e EtOH 50%, independentemente do método extrativo utilizado. Ainda, os maiores teores dos marcadores químicos também foram quantificados nesses extratos.

Os extratos EtOH 96°GL, EtOH 70% e EtOH 50% apresentaram atividade anti-inflamatória mais pronunciada no modelo de AIA agudo, reduzindo a migração de células inflamatórias totais, neutrófilos e monócitos. Os extratos EtOH 96°GL e EtOH 70% induziram significativa resposta anti-inflamatória no modelo de AIA crônico, reduzindo a migração de células inflamatórias para a cavidade intra-articular, os teores de IL-1 $\beta$  e CXCL-1 no tecido periarticular e a perda de proteoglicanos. Já no ensaio *in vitro* com condrócitos murinos, o extrato EtOH 70% e EtOH 50% se mostraram os mais ativos com redução da liberação de IL-6 e expressão de MMP-3, evidenciando o potencial desses extratos como agente antiartrítico para o manejo da osteoartrite.

A secagem dos extratos ativos por *spray dryer* resultou na obtenção de pós com parâmetros farmacotécnicos adequados para o desenvolvimento de formulação farmacêutica. Dentre eles, o extrato EtOH 50% apresentou parâmetros mais favoráveis para o desenvolvimento farmacotécnico, como maior solubilidade e fluidez do pó. A formulação desenvolvida com o extrato EtOH 50% seco de *E. macrophyllus* contendo 25% de Aerosil® e 10% de celulose apresentou características químicas e físico-químicas adequadas para administração por via oral em cápsulas, bem como atividade anti-inflamatória e antiartrítica em modelo pré-clínico de artrite aguda, promovendo a redução de células e citocinas inflamatórias.

## Referências

ABUZAR, S.M.; HYUN, S.M.; KIM, J.H.; PARK, H.J.; KIM, M.S.; PARK, J.S.; HWANG, S.J. Enhancing the solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs using supercritical antisolvent (SAS) process. *International journal of pharmaceutics*, v.538, n.1-2, p.1–13, 2018.

ADALI, M.B.; BARRESI, A.A.; BOCCARDO, G.; PISANO, R. Spray Freeze-Drying as a Solution to Continuous Manufacturing of Pharmaceutical Products in Bulk. *Processes*, v.8, n.709, 2020.

AKKIRAJU, H.; NOHE, A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *Journal of developmental biology*, v.3, n.4, p.177–192, 2015.

ALAM, F.; AMIN, R.; DEY, B. K. A Comprehensive Review on Natural Products and Anti-Inflammatory Activity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, v. 33, n. 7, p. 57-77, 2021.

ALBENSI, B.C. What Is Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Doing in and to the Mitochondrion? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.7, 2019.

ALLEN, K.D.; THOMA, L.M.; GOLIGHTLY, Y.M. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, v.30, n.2, p.184–195, 2022.

AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, v.49, n.5, p. 633–649, 2015.

ANANDACOOMARASAMY, A.; MARCH, L. Current evidence for osteoarthritis treatments. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, v.2, n.1, p.17–28, 2010.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/aoac-publications/book/45491/chapter/392389499>. Acesso em 07 de julho de 2023.

ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M.E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

ASHKAVAND, Z.; MALEKINEJAD, H.; VISHWANATH, B.S. The pathophysiology of osteoarthritis. *Journal of Pharmacy Research*, v.7, n.1, p.132-138, 2013.

AZEVEDO, V. F.; LOPES, M. P.; CATHOLINO, N. M.; PAIVA, E. S.; ARAÚJO, V. A.; PINHEIRO, G. R. C. Revisão crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.57, n.4, p. 346-355, 2017.

BANIK. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, v.2013, n.6, p.35–43, 2021.

BANNURU, R.R.; OSANI, M.C.; VAYSBROT, E.E.; ARDEN, N.K.; BENNELL, K.; BIERMA-ZEINSTR, S.M.A. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, v.27, n.11, 2019.

BARBOUR, K.E.; HELMICK, C.G.; BORING, M.A.; BRADY, T.J. Vital signs: prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation — United States, 2013—2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v.66, p.246–253, 2017.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology*, v. 148, n.3, p-245-54, 2006.

BECKER, J.A.; DAILY, J.P.; POHLGEERS, K.M. Acute monoarthritis: diagnosis in adults. *American Family Physician*., v.94, n.10, p.810-816, 2016.

BHATTA, S.; STEVANOVIC JANEZIC, T.; RATTI, C. Freeze-Drying of Plant-Based Foods. *Foods*, v.9, n.87, 2020.

BIBI-SADEER, N.; MONTESANO D.; ALBRIZIO S.; ZENGİN, G.; MAHOMOODALLY, M. F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants (Basel)*, v.9, n. 8, p.709, 2020.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, v.5, n.1, p.9–19, 2012.

BISWAS S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

BOURMAUD, M.; ZARKA, M.; LE COZANNET, R.; FANÇA-BERTHON, P.; HAY, E.; COHEN-SOLAL, M. Effect of *Rubus idaeus* Extracts in Murine Chondrocytes and Explants. *Biomolecules*, v.11, n.2, p.245, 2021.

BRADFORD, B.J.K.; YUAN, J.K.; FARNEY, L.K.; MAMEDOVA, A.J. 2015. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science*, v.98, p.6631–6650, 2015.

BRAGA, F.C. "Brazilian Traditional Medicine: Historical Basis, Features and Potentialities for Pharmaceutical Development." *Journal of traditional Chinese medical sciences*, v.8, p. S44, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. RDC nº 199 de 12 julho de 2022. Disponível: Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0199\\_12\\_07\\_2002.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0199_12_07_2002.html)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166 de 24 of July of 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e outras medidas. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b36c6b413086704e3263763401#:~:text=QU%C3%8DMICAS%20DE%20REFER%C3%8ANCIA,Art.,comp%C3%AAndios%20oficialmente%20reconhecidos%20pela%20Anvisa](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b36c6b413086704e3263763401#:~:text=QU%C3%8DMICAS%20DE%20REFER%C3%8ANCIA,Art.,comp%C3%AAndios%20oficialmente%20reconhecidos%20pela%20Anvisa). Acesso em 13 de mar de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pharmacopoeia Brasileira. 1 ed. São Paulo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1149p, 1926.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 2 ed. São Paulo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 208p, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Vol.2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 808p, 2010. Disponível em: <https://www2.fcfar.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/principiosativosnaturais/toxicologia/novo/farmacognosia/5-edicao---volume-2.pdf>. Acesso em 06 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 6 eds. Vol.2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 746p, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/6a-edicao-volume-2>. Acesso em 06 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira. 126p. 2011. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Formulario\\_de\\_Fitoterapicos\\_da\\_Farmacopeia\\_Brasileira.pdf/c76283eb-29f6-4b15-8755-2073e5b4c5bf](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf/c76283eb-29f6-4b15-8755-2073e5b4c5bf). Acesso em 06 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira. 2ª edição. 223p. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-cap2.pdf>. Acesso em 06 de julho de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 14, DE 14 DE MARÇO DE 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal.

Disponível em:  
[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014\\_14\\_03\\_2013.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0014_14_03_2013.pdf).  
 Acesso em 07 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. Disponível em:  
[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899\\_29\\_05\\_2003.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html).  
 Acesso em 07 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA-IN Nº 04, DE 18 DE JUNHO DE 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Disponível em:  
[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0004\\_18\\_06\\_2014.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0004_18_06_2014.pdf).  
 Acesso em 07 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Baricitinibe para tratamento de pacientes adultos com Covid-19 hospitalizados que necessitam de oxigênio por máscara ou cateter nasal, ou que necessitam de alto fluxo de oxigênio ou ventilação não invasiva. 2022. Disponível em:  
[https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2022/20220331\\_relatorio\\_723\\_baricitinibe\\_covid-19](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2022/20220331_relatorio_723_baricitinibe_covid-19). Acesso em 05 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. NOTA INFORMATIVA Nº 13/2023-CGAR/DEDT/SVSA/MS. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/estudos-e-notas-informativas/2023/nota-informativa-no-13-2023-cgarb-dedt-svsa-ms>. Acesso em 05 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/20210623\\_relatorio\\_pcdt\\_artrite\\_reumatoide](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/20210623_relatorio_pcdt_artrite_reumatoide). Acesso em 05 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. PORTARIA SCTIE/MS No 48, DE 20 DE JULHO DE 2021. Torna pública a decisão de não incorporar, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, os anti-inflamatórios não esteroides tópicos para dor crônica musculoesquelética ou por osteoartrite. Diário Oficial da União; 2021. p. 76. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2021/prt0048\\_22\\_07\\_2021.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2021/prt0048_22_07_2021.html). Acesso em 06 de julho de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Upadacitinibe para o tratamento de pacientes adultos com artrite reumatoide ativa moderada a grave. Relatório de Recomendação do Conitec. 2021. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2021/20210222\\_Relatorio\\_592\\_Upadacitinibe\\_artrite\\_reumatoide.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2021/20210222_Relatorio_592_Upadacitinibe_artrite_reumatoide.pdf). Acesso em 02 Jun 2023.

BRITO, C.A.A.; SOHSTEN, A.K.A.V.; LEITÃO, C.C.S.; BRITO, R.C.C.M.; VALADARES, L.D.A.; FONTE, C.A.M.; MESQUITA, Z.B.; CUNHA, R.B.; LUZ, K.; LEÃO, H.M.C.; BRITO, C.M.; FRUTUOSO, L.C.V. Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.49, n.6, 2016.

BRO, R.; SMILDE, A.K.; Principal component analysis. Analytical Methods, v.6, p.2812–2831, 2014.

BROADHURST, D.; GOODACRE, R.; REINKE, S.N.; KULIGOWSKI, J.; WILSON, I.D.; LEWIS, M.R.; DUNN, W.B. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society, v.14, n.6, p.72, 2018.

BUCHI. Mini Spray Dryer B-290. 2022. Disponível em: <https://www.buchi.com/pt/produtos/instrumentos/mini-spray-dryer-b-290>. Acesso em 07 de julho de 2023.

BULLOK, J.; RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M.; AHMED, S. S.; DO, D. P.; ANSARI, R. A.; AHMED, J. Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre, v. 27, n.6, p.501-507, 2019.

BURMESTER, G.R.; POPE, J.E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. The Lancet, v.389, p.2338-2348, 2017.

CALABRESI, E.; PETRELLI, F.; BONIFACIO, A.F.; PUXEDDU, I.; ALUNNO, A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clinical and Experimental Rheumatology, 2018.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med Biol Res, v.33, n.2, p179-189, 2000.

CARGNELLO, M.; ROUX, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.75, n.1, p. 50-53, 2011.

CARMONA, F.; PEREIRA, A.M.S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. Revista Brasileira De Farmacognosia, v.23, n.2, p.379–385, 2013.

CARVALHO, A.C.B.; LANA, T.N.; PERFEITO, J.P.S.; SILVEIRA, D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on tradicional medicine. Journal of Ethnopharmacology, v.212, p.29-35, 2017.

CASTRO, F.L.; PINTO, A.C.; LOPES, C.S.; REIS, P.A.; COELHO, M.G.P. Avaliação antiedematogênica do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* (EAEm). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 17, 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: SPMB, 2002. (Publicado em CD-ROM).

CBOL Plant Working Group, A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.USA 106, p.12794–12797, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Uma Agenda Nacional de Saúde Pública para Osteoartrite 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/arthritis/docs/oaagenda2020.pdf>. Acesso em 06 de julho de 2023.

CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.125, v.2, p. S3-S23, 2010.

CHAVES, J.S.; DA COSTA, F.B.; & FREITAS, L.A.P. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.45, n.3, p.573–584, 2009.

CHAVES, T.P.; FERNANDES, F.H.A.; SANTANA, C.P.; SANTOS, J.S.; MEDEIROS, F.D.; FELISMINO, D.C.; SANTOS, V.L.; CATÃO, R.M.R.; COUTINHO, H.D.M.; MEDEIROS, A.C.D. Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. *Plos One*, v.11, n.5, p.1-23, 2016.

CHEN, C; HAN, D; CAI, C; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Control Release*, v.142, p.299–311, 2010.

CHEN, G.Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, v.10, p. 826-837, 2010.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, v.9, n.6, p.7204-7218, 2018.

CHEN, X; SADINENI, V; MAITY, M; QUAN, Y; ENTERLINE, M; MANTRI, R. Finite Element Method (FEM) Modeling of Freeze-drying: Monitoring Pharma-ceutical Product Robustness During Lyophilization. *PharmSciTech*, V. 16, p. 1317-1326, 2015.

CHEN, Y., WANG, Q.W., ZUO, J. CHEN, J. W.; LI, X. Anti-arthritic activity of ethanol extract of *Claoxylon indicum* on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in mice. BMC Complement Altern Med, v.17, n.11, 2017.

CHOUDHARY, N.; SEKHON, B.S. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. Journal of Pharmaceutical Education and Research, v.2, n.2, 2011.

CISALPINO, D.; FAGUNDES, C.T.; BRITO, C.B.; ASCENÇÃO, F.R.; QUEIROZ-JÚNIOR, C.M.; VIEIRA, A.T.; SOUSA, L.P.; AMARAL, F.A.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Microbiota-Induced Antibodies Are Essential for Host Inflammatory Responsiveness to Sterile and Infectious Stimuli. The Journal of Immunology, v.198, n.10, p.4096–4106, 2017.

CLEMENTE, P.J.; STEFFEN, S.J. PLANTAS MEDICINAIS: USOS POPULARES TRADICIONAIS. Disponível em: <http://www.anchietano.unisinos.br/publicacoes/botanica/avulsas/clemente.pdf>. Acesso 26 de março de 2023.

COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A.; SACHS, D.; COSTA, V.V.; RORIGUES, D.H.; VIEIRA, A.T.; SILVA, T.A.; SOUZA, D.G.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum.* v. 58, p. 2329-2337, 2008.

COELHO, M.G.P.; VELOZO, L.S.M.; FERNANDES, D.C.; ALVES, R.A.; SIQUEIRA, H.A.A.; SILVA, P.S.; SANTOS, S.V.M.; GAYER, C.R.M. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). Revista Fitos, v. 7, n.4, 2012.

COIMBRA, I.B.; PLAPLER, P.G.; CAMPOS, G.C. Generating evidence and understanding the treatment of osteoarthritis in Brazil: a study through Delphi methodology. Clinics (Sao Paulo), v.74, 2019.

CONFORTI, F.; MENICHINI, F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. *Current medicinal chemistry*, v.18, n.8, p.1137–1145, 2011.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. *Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica*. 6. ed. Petrópolis, RJ: Editora Vozes, 1998. p.110-111.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. *Chemical Engineering Research and Design*, v.93, p.366-376, 2015.

COX, A.V.; BENNET, M.D.; DYER, T.A. Use of the polymerase chain reaction to detect spacer size heterogeneity in plant 5S-rRNA gene clusters and to locate such clusters in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v.83, p.684–690, 1992.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; GENZINI, L.; GARELLA, D. Phytotherapeutics: An evaluation of the potential of 1000 plants. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v.35, p.11-48, 2010.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.50, n.4, p.434-461, 2010.

DIAS, E.G.E., VALENZUELA, V.C.T., ALVES, M.R., DUARTE, M.G.R., & GARCIA, E.F. Qualidade e autenticidade de folhas de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) oriundas de fornecedores de São Paulo. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.15, n.2, p.250-256, 2013.

DINARELLO, C. A.; SIMON, A.; VAN DER MEER, J.W. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, v.11, n.8, p.633–652, 2012.

DONAHUE, L.R.; CHANG, B.; MOHAN, S.; MIYAKOSHI, N.; WERGEDAL, J.E.; BAYLINK, D.J.; HAWES, N.L.; ROSEN, C.J.; WARD-BAILEY, P.; ZHENG, Q.Y.; BRONSON, R.T.; JOHNSON, K.R.; DAVISSON, M.T. A missense mutation in the mouse *Col2a1* gene causes spondyloepiphyseal dysplasia congenita, hearing loss, and retinoschisis. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.18, n.9, p.1612-21, 2003.

DOYLE, J. L. and D. J. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p.11-15, 1987.

DRUGBANK. *Tripterygium wilfordii* whole Completed Phase 4 Trials for Rheumatoid Arthritis Treatment. 2021. Disponível em: [https://go.drugbank.com/drugs/DB14277/clinical\\_trials?conditions=DBCOND0027961&phase=4&purpose=treatment&status=completed](https://go.drugbank.com/drugs/DB14277/clinical_trials?conditions=DBCOND0027961&phase=4&purpose=treatment&status=completed). Acesso em 06 de julho de 2023.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J. DOS; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Food Scientific Technology*, v.26, n.2, p.446–52, 2006.

DUDICS S.; LANGAN, D.; MEKA, R.R.; VENKATESHA, S.H.; BERMAN, B.M.; CHE, C.T.; MOUDGIL, K.D. Natural Products for the Treatment of Autoimmune Arthritis: Their Mechanisms of Action, Targeted Delivery, and Interplay with the Host Microbiome. *Internacional Journal of Molecular Science*, v.19, n.9, p.2508, 2018.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, v.32, p.1792-1797, 2004.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, v.4, n.177, 2014.

EMA. Diretriz da Agência Europeia de Medicamentos (EMA). A Influência do Tamanho das Partículas." Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/quality-inhalation-nasal-products-influence-particle-size\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/quality-inhalation-nasal-products-influence-particle-size_en.pdf). Acesso em 25 de julho de 2023.

ERIXON, P.; SVENNBLAD, B.; BRITTON, T.; OXELMAN, B. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. *Systematic Biology*, v. 52, p. 665–673, 2003.

ERMIS, E.; KARASU, E.N. Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts: functional properties and characterization of the powder. *The Journal of food*, v.45, n.1, p.39-49, 2020.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-791, 1985.

FERNANDES, D.C.; MARTINS, B.P.; MEDEIROS, D.L.F.; SANTOS, S.V.M.; GAYER, C.R.M.; VELOZO, L.S.M.; COELHO, M.G.P. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the hexanic extract of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli in mice. *Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences*, v.18, n.1, 2019.

FINDEISEN, K.E., SEWELL, J., & OSTOR, A.J.K. Biological Therapies for Rheumatoid Arthritis: An Overview for the Clinician. *Biologics: targets & therapy*, v.15, p. 343–352, 2021.

FLORA E FUNGO DO BRASIL 2020. *Echnodorus macrophyllus*. Disponível em: [http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=5&familia=null&genero=Echinodorus&especie=macrophyllus&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo= TODOS&origem= TODOS&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilha Oceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao= TODOS&mostrarAte= SUBESP\\_VAR&opcoesBusca= TODOS\\_OS\\_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica](http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C10%2C11%5D&lingua=&grupo=5&familia=null&genero=Echinodorus&especie=macrophyllus&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo= TODOS&origem= TODOS&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilha Oceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao= TODOS&mostrarAte= SUBESP_VAR&opcoesBusca= TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica). Acesso em 06 de julho de 2023.

FLORES, M.P.; CASTRO, A.P.C.R.; NASCIMENTO, J.S. Analgésicos tópicos. *Revista Brasileira De Anestesiologia*, v.62, n.2, p.248–252, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry: analytical procedures and methods validation. 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>. Acesso em: 13 de mar de 2023.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Acesso em 07 de julho de 2023.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. Herbal Medicine Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, By Application (Pharmaceutical & Nutraceutical, Food & Beverages, and Personal Care & Beauty Products) By Form (Powder, Liquid & Gel, and Tablets & Capsules), and Regional Forecast, 2022-2029, 2022. Disponível em: <https://www.fortunebusinessinsights.com/herbal-medicine-market-106320>. Acesso em 05 de julho de 2023.

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

GALLO, L.; RAMÍREZ-RIGO, M.V.; PINA, J.; PALMA, S.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V. *Valeriana officinalis* Dry Plant Extract for Direct Compression: preparation and characterization. *Scientia Pharmaceutica*, v.80, n.4, p.1013-1026, 2012.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. A.; DOURADO, L. P. A.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. *In vitro* TNF- $\alpha$  inhibition elicited by extracts from *Echinodorus grandiflorus* leaves and correlation with their phytochemical composition. *Planta Medica*, v.82, n.04, p.337-343, 2016.

GARCIA, E.; OLIVEIRA, M.A.; CANDIDO, L.C.M.; COELHO, F.M.; COSTA, V.V.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; BOFF, D.; AMARAL, F.A.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F.C. Effect of the hydroethanolic extract from *Echinodorus grandiflorus* leaves

and a fraction enriched in flavone-C-glycosides on antigen-induced arthritis in mice. *Planta Medica*, v.82, p. 407–413, 2016.

GARCIA, E.F.; DE OLIVEIRA, M. A.; GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; BASTOS, L. F.S.; COELHO, M.M.; BRAGA, F.C. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*, v.18, n.1, p.80–86, 2010.

GARCÍA-PÉREZ, M.E.; LEMUS-RODRÍGUEZ, Z.; HUNG-ARBELO, M.; VISTEL-VIGO, M. Influence of polyvinylpyrrolidone, microcrystalline cellulose and colloidal silicon dioxide on technological characteristics of a high-dose *Petiveria alliacea* tablet. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.43, n.12, p.2011-2015, 2017.

GASPAROTTO, F.M.; PALOZI, R.A.C.; DA SILVA, C.H.F.; PAULI, K.B.; DONADEL, G.; LOURENÇO, B.H.L.B.; NUNES, B.C.; LÍVERO, F.A.D.R.; DE SOUZA, L.M.; LOURENÇO, E.L.B.; KASSUYA, C.A.L.; GASPAROTTO, J.A. Antiatherosclerotic Properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli: From Antioxidant and Lipid-Lowering Effects to an Anti-Inflammatory Role. *Journal of medicinal food*, v.22, n.9, p.919–927, 2019.

GENOVESE, M.C.; FLEISCHMANN, R.; COMBE, B.; HALL, S.; RUBBERT-ROTH, A.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; MOHAMED, M.F.; MEERWEIN, S.; PANGAN, A.L. Safety and efficacy of upadacitinib in patients with active rheumatoid arthritis refractory to biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs (SELECT-BEYOND): a double-blind, randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*, v.391, n.10139, 2018.

GENOVESE, M.C.; SMOLEN, J.S.; TAKEUCHI, T.; BURMESTER, G.; BRINKER, D.; ROONEY, T.P.; ZHONG, J.; DAOJUN, M.; SAIFAN, C.; CARDOSO, A.; ISSA, M.; WU, W.S.; WINTHROP, K. L. Safety profile of baricitinib for the treatment of rheumatoid arthritis over a median of 3 years of treatment: an updated integrated safety analysis. *The Lancet Rheumatology*, v.2, n.6, p. e347-e357, 2020.

GERMANO, J.L.; REIS-PARDAL, J.; TONIN, F.S.; PONTAROLO, R.; MELCHORS, A.C.; FERNANDEZ-LLIMOS, F. Prevalence of rheumatoid arthritis in South America:

a systematic review and meta-analysis. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.26, p.5371–5382, 2021.

GILBERT, B.; ALVES, L.F.; FAVORETO, R.F. *Echinodorus grandiflorus*, *E. macrophyllus*. In: *Monografias de Plantas Medicinais Brasileiras e Aclimatadas: Volume II* [online]. Rio de Janeiro: Abifisa; Editora FIOCRUZ, 2022, pp. 97-120. ISBN: 978-65-5708-177-8.

GLOBAL RA NETWORK. Sobre artrite e artrite reumatoide. Disponível em <https://globalranetwork.org/project/disease-info/>. Acesso em 25 de julho de 2022.

GOELDNER, I.; SKARE, T.L.; REASON, I.T.; UTIYAMA, S.R.R. Rheumatoid arthritis: a current view. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.47, n.5, p.495-503, 2011.

GONSENZA, G. P. Efeito do extrato bruto das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e de frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina. 98p. Dissertação de Mestrado. 2010. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp155531.pdf>. Acesso em 15 de abril de 2023.

GOSSET, M.; BERENBAUM, F.; THIRION, S.; JACQUES, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nature protocols*, v.3, n.8, p.1253–1260, 2008.

GOVAERTS, R. *Echinodorus*. "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew". Disponível em: <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Acesso em 07 de julho de 2023.

GRÄSSEL, S.; MUSCHTER, D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. *F1000 Research*, v. 9, p.325, 2020.

GRGIĆ, J.; ŠELO, G.; PLANINIĆ, M.; TIŠMA, M.; BUCIĆ-KOJIĆ, A. Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), v.9, n.10, p.923, 2020.

GRIFFIN, T.M.; SCANZELLO, C.R. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v.37, n. S120, p.57–63, 2019.

GROB, G.B.J., Gravendeel, B., Eurlings, M.C.M., 2004. Potential phylogenetic utility of the nuclear FLORICAULA/LEAFY second intron: comparison with three chloroplast DNA regions in *Amorphophallus* (Araceae). *Molecular Phylogenetics Evolution*. 30, 13–23.

GUAJARDO-FLORES, D.; REMPEL, C.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.; SERNASALDÍVAR, S. Influence of Excipients and Spray Drying on the Physical and Chemical Properties of Nutraceutical Capsules Containing Phytochemicals from Black Bean Extract. *Molecules*, v.20, n.12, p.21626-21635, 2015.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. The Brazilian phytotherapies industry: challenges and opportunities. *Revista Ciência e Saúde Coletiva*, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017.

HAYNES, R.R.; HOLM-NIELSEN, L.B. The Alismataceae. *Flora Neotropica - Monograph 64*. New York: The New York Botanical Garden, 1994. 109 p.

HOHJOH, H.; HORIKAWA, I.; NAKAGAWA, K.; SEGI-NISHIDA, E.; HASEGAWA, H. Induced mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp-3, Mmp-12, and Mmp-13 in the infarct cerebral cortex of photothrombosis model mice. *Neuroscience Letters*, v.20, n.739, 2020.

HOSCHEID, J.; BERSANI-AMADO, C.A.; DA ROCHA, B.A.; OUTUKI, P.M.; DA SILVA, M.A.; FROEHLICH, D.L.; CARDOSO, M.L. Inhibitory Effect of the Hexane Fraction of the Ethanolic Extract of the Fruits of *Pterodon pubescens* Benth in Acute and Chronic Inflammation. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, v.2013, 2013.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use - ICH Harmonised Tripartite Guideline.

Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (EMA/CHMP/ICH/82072/2006). London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Projection of the population of Brazil by gender and age: 1980-2050*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2008. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/Statistics/Population/projecao\\_da\\_populacao/2008/projecao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/Statistics/Population/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf). Acesso em 06 de julho de 2023.

JIA, Y.; KHALIFA, I.; HU, L.; ZHU, W.; LI, J.; LI, K.; LI, C. Influence of three different drying techniques on persimmon chips' characteristics: A comparison study among hot-air, combined hot-air-microwave, and vacuum-freeze drying techniques. *Food Bioproduction Process*, v.118, p.67–76, 2019.

JIN, P.; MADIEH, S.; AUGSBURGER, L.L. Selected Physical and Chemical Properties of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Extracts Important for Formulated Product Quality and Performance. *Aaps Pharmscitech*, v.9, n.1, p.22-30, 2008.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MERZHUH, Y.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, v.1, n.36, 2008.

JÚNIOR, L.O.V.; & INÁCIO, A.M. Use of glucosamine and chondroitin to treat osteoarthritis: a review of the literature. *Revista Brasileira De Ortopedia*, v.48, n.4, p.300–306, 2013.

KABEYA, K.; SATOH, H.; HORI, S.; SAWADA, Y. Experimental Study on Patient Preferences Regarding the Shape and Size of Medical Tablets and Capsules Using Three-Dimensionally Printed Plastic Model Formulations. *Patient preference and adherence*, v.15, p.863–870, 2021.

KALLÓ, G.; KUMAR, A.; TŐZSÉR, J.; CSŐSZ, É. Chemical Barrier Proteins in Human Body Fluids. *Biomedicines*, v.10, n.7, p.1472, 2022.

KANASHISRO, A.; HIROKI, C.H.; DA FONSECA, D.M.; BIRBRAIR, A.; FERREIRA, R.G.; BASSI, G.S.; FONSECA, M. D.; KUSUDA, R.; CEBINELLI, G. C. M.; DA SILVA, K. P.; WANDERLEY, C. W.; MENEZES, G. B.; ALVES-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, A. G.; CUNHA, T. M.; PUPO, A. S.; ULLOA, L. CUNHA, F. Q. The role of neutrophils in neuro-immune modulation. *Pharmacology Research*, v.151, p.1-34, 2020.

KARBWANG, J.; CRAWLEY, F.P.; NA-BANGCHANG, K.; MARAMBA-LAZARTE, C. Herbal Medicine Development: Methodologies, Challenges, and Issues. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2019.

KATIYAR, C.; GUPTA, A.; KANJILAL, S.; KATIYAR S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *Ayu*, v.33, n.1, p.10-19, 2012.

KELCHNER, S. A. The Evolution of Non-Coding Chloroplast DNA and Its Application in Plant Systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.87, p.482–498, 2000.

KHADKA, P.; RO, J.; KIM, H.; KIM, I.; KIM, J.T.; KIM, H.; LEE, J. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.9, n.6, p.304–316, 2014.

KING, M.L. The alternative Durbin-Watson test. *Journal of Econometrics*, v.17, n.1, p.51–66, 1981.

KŁOSOWSKA, A.; WAWRZYŃCZAK, A.; FELICZAK-GUZIŁ, A. Microencapsulation as a Route for Obtaining Encapsulated Flavors and Fragrances. *Cosmetics*, v.10, n.1, p.26, 2023.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H; OHSAKI, A. Chapecodierins A-C, new labdane derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, v.63, n.3, p.375-377, 2000.

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

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, v.13, n.1, p.8-17, 2002.

KRESS, W.J.; PRINCE, L.M.; WILLIAMS, K.J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, v. 89, p. 1682–1696, 2002.

KUENTZ, M.; HOLM, R.; ELDER, D.P. Methodology of oral formulation selection in the pharmaceutical industry. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v.87, p.136–163, 2016.

KUI, H.; NICHOLSON, S.E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*, v. 30, n.2, p.88-106, 2012.

KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v.33, p.1870-1874, 2016.

KUMAR, D.; WORKU, Z.A.; GAO, Y.; KAMARAJU, V.K.; GLENNON, B.; BABU, R.P.; HEALY, A.M. Comparison of wet milling and dry milling routes for ibuprofen pharmaceutical crystals and their impact on pharmaceutical and biopharmaceutical properties. *Powder Technology*, v.330, p.228–238, 2018.

KUMAR, R.; THAKUR, A.K.; CHAUDHARI, P.; BANERJE, N. Particle Size Reduction Techniques of Pharmaceutical Compounds for the Enhancement of Their Dissolution Rate and Bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, v.17, p.333–352, 2022.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K., FAUSTO, N., editores. Robbins e Cotran - Patologia: Bases patológicas das Doenças. 8<sup>a</sup>.ed., Santos Editora, 2007.

KUROWSKA, W.; KUCA-WARNAWIN, E.; RADZIKOWSKA, A.; JAKUBASZEK, M.; MASLINSKA, M.; KWIATKOWSKA, B.; MASLINSKI, W. Monocyte-related biomarkers

of rheumatoid arthritis development in undifferentiated arthritis patients - a pilot study. *Reumatologia*, v.56, n.1, p.10-16, 2018.

LAJEVIC, M.D.; SULEIMAN, S.; COHEN, R.L.; CHAMBERS, D.A. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by norepinephrine in T-lineage cells. *Immunology*, v.132, n.2, p.197–208, 2011.

LANGE-BROKAAR, B.J.; IOAN-FACSINAY, A.; VAN OSCH, G.J.; ZUURMOND, A.M.; SCHOONES, J.; TOES, R.E.; HUIZINGA, T.W.; KLOPPENBURG, M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: A review. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.20, p.1484–1499, 2012.

LE, T.K.; MONTEJANO, L.B.; CAO, Z.; ZHAO, Y.; ANG, D. Health care costs in US patients with and without a diagnosis of osteoarthritis. *Journal of Pain Research*, v.5, p.23–30, 2012.

LEHTONE, S.L.; MYLLYS, L. Cladistic analysis of *Echinodorus* (Alismataceae): Simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Cladistics*, v.24, p. 218–239, 2008.

LEHTONEN, S. Phylogenetics of *Echinodorus* (Alismataceae) based on morphological data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.150, n.3, p.291-305, 2006.

LEHTONEN, S.; FALCK, D. Watery varieties: aquarium plant diversity from aesthetic, commercial, and systematic perspectives. In: *Ornamental Plants: Types, Cultivation and Nutrition*. Editor: Joshua C. Aquino ISBN 978-1-61761-736-2, 2011.

LEITE, J.P.V.; PIMENTA, L.D.S.; GOMES, R.D.L.; DANTAS-BARROS, A.M. Contribution to the pharmacobotanical study of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) – Alismataceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.2, 2007.

LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; LUNG CHENG, C.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese medicine*, v.3, n.7, 2008.

LIANG, H., HILU, K.W. Application of matK gene sequences to grass systematics. *Canadian Journal of Botany*, v.74, p.125–134, 1996.

LINDEN, R.; ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Response Surface Analysis Applied to the Preparation of Tablets Containing a High Concentration of Vegetable Spray-Dried Extract. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.26, n.4, p.441-446, jan. 2000.

LING, J.; MANGAL, S.; PARK, H.; WANG, S.; CAVALLARO, A.; ZHOU, Q.T. Simultaneous Particle Size Reduction and Homogeneous Mixing to Produce Combinational Powder Formulations for Inhalation by the Single-Step Co-Jet Milling. *Journal of pharmaceutical sciences*, v.108, n.9, p.3146–3151, 2019.

LIU, L.H.; LING, J.K.U.; HADINOTO, K. Formulation Strategies to Improve the Stability and Handling of Oral Solid Dosage Forms of Highly Hygroscopic Pharmaceuticals and Nutraceuticals. *Pharmaceutics*, v.14, n.2015, 2022.

LIU, M.H.; SUN, J.S.; TSAI, S.W.; SHEU, S.Y.; CHEN, M.H. Icariin protects murine chondrocytes from lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and extracellular matrix degradation. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, v.30, n.1, p.57–65, 2010.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, v.2, p.17023, 2017.

LIU, X.; WANG, Y.; GE, W.; CAI, G.; GUO, Y.; & GONG, J. Spectrum-effect relationship between ultra-high-performance liquid chromatography fingerprints and antioxidant activities of *Lophatherum gracile* Brongn. *Food science & nutrition*, v.10, n.5, p.1592–1601, 2022.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3 ed. Nova 6. ed. Petrópolis, RJ: Editora Vozes, 2000. p. 110-111.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. p.39-40.

MAHAJAN, R.; CHANDRAGIRI, S.; GANANADHAMU, S.; BORSE, V.; ASTHANA, A. Analytical methodology for novel film forming mafenide spray: Assay and Drug excipient compatibility study by HPLC-PDA. Research Square; 2022.

MAHAJAN, U.M.; OEHRLE, B.; SIRTIL, S.; ALNATSHA, A.; GONI, E.; REGEL, I.; BEYER, G.; VORNHÜLZ, M.; VIELHAUER, J.; CHROMIK, A.; BAHRA, M.; KLEIN, F.; UHL, W.; FAHLBUSCH, T.; DISTLER, M.; WEITZ, J.; GRÜTZMANN, R.; PILARSKY, C.; WEISS, F.U.; ADAM, M.G.; MAYERLE, J. Independent Validation and Assay Standardization of Improved Metabolic Biomarker Signature to Differentiate Pancreatic Ductal Adenocarcinoma from Chronic Pancreatitis. Gastroenterology, v.163, n.5, p.1407–1422, 2022.

MANSK, R. G.; WILSON, M.; FLEISHMAN, R.; OLSEN, N.; SILVERFILD, J.; KEMPF, P.; KIVITZ, A.; SHERRER, Y.; PUCINO, F.; CSAKO, G.; COSTELLO, R.; PHAM, T. H.; SNYDER, C.; HEIJDE, D. V. D.; TAO, X.; WELSLEY, R.; LIPSKY, P. E. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F Versus Sulfasalazine in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Annals of Internal Medicine, v.151, n.4, p.229-240, 2009.

MARQUES, A.M., PROVANCE, D.W., KAPLAN, M.A.C., & FIGUEIREDO, M.R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. Food and Chemical Toxicology, 109, 1032–1047, 2017.

MARQUES, L.C.; SOUZA, C.M. Pesquisa e Desenvolvimento de Fitoterápicos: Relatos de Experiência em Indústria Farmacêutica Nacional / Research and Development of Phytomedicines: Report of Experience on a Brazilian Pharmaceutical Company. Revista Fitos, v.7, n.1, p.50-66, 2012.

MARSHALL, J.S.; WARRINGTON, R.; WATSON, W.; KIM, H.L. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, v.14, n.49, 2018.

MARTINS-GREEN, M.; PETREACA, M.; WANG, L. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. Advances in wound care, v.2, n.7, p.327-347, 2013.

MBIANTCHA, M.; ALMAS, J.; SHABANA, S.U.; NIDA, D.; AISHA, F. Anti-arthritic property of crude extracts of *Piptadeniastrum africanum* (Mimosaceae) in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. BMC complementary and alternative medicine, v.17, n.1, p.111, 2017.

MENDANHA, S.A.; MOURA, S.S.; ANJOS, J.L.V.; VALADARES, M.C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. Toxicology in Vitro, v.27, n.1, p.323–329, 2013.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, v.15, n.2, p. 127-30, 2001.

MOLLER, S.; MUNZENBERG, J. Improving the dissolution of poorly soluble APIs with inorganic solid dispersions. Pharmaceutical Technology, v.2017, n.2, p. s12-s15, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v.65, n.1–2, p. 55-63, 1983.

MOTA, L.M.H.; CRUZ, B.A.; ALBUQUERQUE, C.P.; GONCALVES, D.P.; LAURINDO, I.M.M.; BERTOLO, M.B.; PINTO, M.R.C.; JUNIOR-LOUZADA, XAVIER, R.M.; GIORGI, R.D.N.; LIMA, R.A.C. Update on the 2012 Brazilian Society of Rheumatology

Guidelines for the treatment of rheumatoid arthritis: position on the use of tofacitinib. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.55, n.6, p.512-521, 2015.

MUNTEANU, I.G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International journal of molecular sciences*, v.22, n.7, p.3380, 2021.

NAGAYOSHI, B.A.; LOURENÇÃO, L.G.; SYGUEDOMI, Y.N.; PAULA, P.M.S.; MIYAZAKI, M.C.O.S. Rheumatoid arthritis: profile of patients and burden of caregivers. *Revista Brasileira de Geriatria Gerontologia*, v.21, n.1, p.45-54, 2018.

NAVIGLIO, D.; SCARANO, P.; CIARAVOLO, M.; GALLO, M. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods*, v.8, n.245, p.1-22, 2019.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981-2019. *Journal of Natural Products*, v.79, n.3, p. 629-361, 2020.

NIK, A.B.; VAZIFEDOOST, M.; DIDAR, Z.; HAJIRISTAMLOO, B. The antioxidant and physicochemical properties of microencapsulated bioactive compounds in *Securigera securidaca* (L.) seed extract by co-crystallization, *Food Quality and Safety*, v.3, n.4, p.243–250, 2019.

NOCHI, R.J.; SANTOS, H.R.; BARROS, W.M.; MARCELLO, C.M.; MARTINS, D.T.O. Avaliação da ação antiedematogênica do extrato hidroalcoólico de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) (Alismataceae). In: *Latinamerican Congress of Pharmacology*, 16, 2000, Águas de Lindóia. Anais... São Paulo: ALF, 2000. p.186.

NYLANDER, J.A.A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

OLIVEIRA, D.P; BRAGA, F.C.; TEIXEIRA, M.M. Medicinal plants and their potential use in the treatment of rheumatic diseases. In [INFLAMMATION AND NATURAL PRODUCTS]. 464p. Elsevier, 2021.

OLIVEIRA, M.A.; LACERDA, C.D.; BONELLA, A.F. Developing methods to compare tablet formulations of atorvastatin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.48, n.4, p.801–810, 2012.

OLIVEIRA, S.M.; GOMIDES, A. M.; MOTA, L.M.H.; LIMA, C.M.B.L.; ROCHA, F.A.C. Intestinal parasites infection: protective effect in rheumatoid arthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.57, n.5, 2017.

OLUWAFEMI, O.; OGUNTIBEJU, O. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. *Journal of Inflammation Research*, v.11, p.307-317, 2018.

PALHARES, R.M.; GONÇALVES, D.M.; DOS SANTOS, A.F.B.; PEREIRA, C.G, BRANDÃO, M.G.L.; Oliveira, G. Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees Their Quality. *PLoS ONE* v.10, n.5, 2015.

PALOMINO, D.C.; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, v.13, n.3, p.469–473, 2015.

PANG, Z.; CHEN, J.; WANG, T.; GAO, C.; LI, Z.; GUO, L.; XU, J.; CHENG Y. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, v.2, n.12, 2021.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A.B., MARCHI, L.F., DE ANDRADE, M.F., KABEYA, L.M., DONADI, E.A., & LUCISANO-VALIM, Y. M. Fcy and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2015.

PARK, H.; SATHASIVAM, R.; KIM, T.J.; PARK, B.B.; KIM, J.K.; PARK, S.U. Antiosteoarthritic Effect of Morroniside in Chondrocyte Inflammation and Destabilization of Medial Meniscus-Induced Mouse Model. *International Journal of Molecular Science*, v.22, n.1, 2021.

PATEL, K.N.; PATEL, J.K.; PATEL, M.P.; RAJPUT, G.C.; PATEL, H.A. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharmaceutical Methods*, v.1, n.1, p.2-13, 2010.

PAVAL, J.; KAITHERI, S. K.; POTU, B. K.; GOVINDAN, S.; KUMAR, R. S.; NARAYANAN, S. N.; MOORKOTH, S. Anti-arthritis potential of the plant *Justicia gendarussa* Burm F. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, v.64, n.4, p.357–362, 2009.

PAWA, R.; GOYAL, A.; BANSAL, P.; JIALAL, I. Chronic Inflammation. [Disponível em novembro de 2020]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing in 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>. Acesso em 13 de abril de 2023.

PAWAR, H.A.; GAVASANE, A.J.; CHOUDHARY, P.D. Extraction of polysaccharide from fruits of *Cordia dichotoma* G. Forst using acid precipitation method and its physicochemical characterization. *International journal of biological macromolecules*, v.115, p.871–875, 2018.

PENIDO, C.; CONTE, F.P.; CHAGAS, M.S.; RODRIGUES, C.A.; PEREIRA, J.F.; HENRIQUES, M.G. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, v.55, n.11, p.457–464, 2006.

PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H.; TIMBÓ, A. L. O. Chromosome doubling of grasses: an alternative to plant breeding. *Ciência Rural*, v.42, n.7, p.1278-1285, 2012.

PINTO, A.C.; REGO, G.C.G.; SIQUEIRA, A.M.; CARDOSO, C.C.; REIS, P.A.; MARQUES, E.A.; COELHO, M.G.P.; SABINO, K.C.C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, n.2, p.435-439, 2007.

PIRES, V.G.A.; MOURA, M.R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. *Química Nova*, v.40, n.1, p.1–5, 2017.

PITA, L.M.; SPADELLA, M.A.; MONTENOTE, M.C.; OLIVEIRA, P.B.; CHIES, A.B. Repercussions of adjuvant-induced arthritis on body composition, soleus muscle, and heart muscle of rats. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, v.53, n.3, 2020.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Inflammation and the blood microvascular system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v.7, n.1, a016345, 2014.

PRIETO, M.A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; VÁZQUEZ, J.A.; MURADO, M.A.  $\beta$ -Carotene assay revisited. application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.36, p.8983-93, 2012.

PUDZIUVELYTE, L.; MARKSA, M.; SOSNOWSKA, K.; WINNICKA, K.; MORKUNIENE, R.; BERNATONIENE, J. Freeze-Drying Technique for Microencapsulation of *Elsholtzia ciliata* Ethanolic Extract Using Different Coating Materials. *Molecules*, v.25, n.9, p. 2237, 2020.

QASIM, S.; ALAMGEER; SALEEM, M.; ALOTAIBI, N.H.; BUKHARI, S.N.A.; ALHARBI, K.S.; IRFAN, H.M.; ANWAR, R. Appraisal of the Antiarthritic Potential of Prazosin via Inhibition of Proinflammatory Cytokine TNF- $\alpha$ : A Key Player in Rheumatoid Arthritis. *ACS omega*, v.6, n.3, p.2379–2388, 2021.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F. M.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; BESSONI, R. L. C.; DA CUNHA SOUSA, L. F.; GARLET, G. P.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; DA SILVA, T. A. Experimental arthritis trigger periodontal disease in mice: involvement of TNF- $\alpha$  and the oral microbiota. *Journal of Immunology*, v. 187, n. 7, p. 3821-3830, 2011.

RAMALINGAM, P.; POULOS, M.G.; LAZZARI, E.; GUTKIN, M.C.; LOPEZ, D.; KLOSS, C.C.; CROWLEY, M.J.; KATSNELSON, L.; FREIRE, A.G.; GREENBLATT, M.B.; PARK, M.B.; BUTLER, J.M. Chronic activation of endothelial MAPK disrupts hematopoiesis via NFkB dependent inflammatory stress reversible by SCGF. *Nature Communications*, v.11, n. 666, 2020.

RANI, R.; ARORA, S.; KAUR, J.; MANHAS, R.K. Phenolic compounds as antioxidants and chemopreventive drugs from *Streptomyces cellulosa* strain TES17 isolated from rhizosphere of *Camellia sinensis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.18, n.82, 2018.

RIBEIRO, V.P.; ARRUDA, C.; ABD EL-SALAM, M.; BASTOS, J.K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharmaceutical Biology*, v.56, n.1, p.253–268, 2018.

ROCHA, M.P; CAMPANA P.R.V.; OLIVEIRA, D.S.; ALMEIDA, V.L.; LOPES J.C.D.; FONSECA, A.S.; PIETERS L.; SILVA, C.G. Biological activities of extracts from *Aspidosperma subincanum* Mart. and in silico prediction for inhibition of acetylcholinesterase. *Phytotherapy Research*, v.32, n.10, p.2021-2033, 2018.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B., LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, p. 539–542, 2012.

RYAN, K.A.; SMITH, M.F.Jr.; SANDERS, M.K.; ERNST, P.B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infection and Immunity*, v.72, n.4, p.2123-30, 2004.

SAIFULLAH, M.; MCCULLUM, R.; MCCLUSKEY, A.; VUONG, Q. Effects of different drying methods on extractable phenolic compounds and antioxidant properties from lemon myrtle dried leaves. *Heliyon*, v.5, n.12, 2019.

SALEEM, K.; PETKAR, S.; SOMAVARAPU, I. Capítulo 19 - Rationale for Pulmonary Vaccine Delivery: Formulation and Device Considerations. Editor(s): Mariusz Skwarczynski, Istvan Toth, In Micro and Nano Technologies, Micro and Nanotechnology in Vaccine Development, William Andrew Publishing, 2017, p.357-371, 2017.

SALÚSTIO, P.J.; INÁCIO, C.; NUNES, T.; SOUSA E SILVA, J.P.; COSTA, P.C. Flow characterization of a pharmaceutical excipient using the shear cell method. *Pharmaceutical development and technology*, v.25, n.2, p.237–244, 2020.

SANG, T.; CRAWFORD, D. J.; STUESSY, T. F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, v.84, p.1120-1136, 1997.

SANTANA, C.B.; SOUZA, J.G.L.; TOLEDO, A.G.; ALVES, L.F.A.; ALVES, D.S.; CORRÊA, J.M.; PINTO, F.G.S. Antimicrobial and insecticidal effects of essential oil and plant extracts of *Myrcia oblongata* DC in pathogenic bacteria and *Alphitobius diaperinus*. *Brazilian Journal of Biology*, v.82, 2022.

SANTANA, C.P.; MEDEIROS, F.D.; CORREIA, L.P.; DINIZ, P.H.G.D.; VÉRAS, G.; MEDEIROS, A.C.D. Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L. *PLoS ONE*, v.13, n.5, e0197323, 2018.

SANTO, E.F.E.; LIMA, L.K.F.; TORRES, A.P.C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E.H.G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. *Food Science and Technology*, v.33, n.1, p.47–51, 2013.

SANTOS, R.R.; FONSECA, F.S.A.; FONSECA, R.S.; MARTINS, E.R. Phenology and chemiodiversity of the 'Chapéu-de-couro' (*Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*). *Cadernos de Ciências Agrárias*, v.9, n.3, 2017.

SARRATE, R.; TICÓ, J.R.; MIÑARRO, M.; CARRILLO, C.; FÀBREGAS, A.; GARCÍA-MONTOYA, E.; SUÑÉ-NEGRE, J.M. Modification of the morphology and particle size

of pharmaceutical excipients by spray drying technique. *Powder Technology*, v.270, p.244–255, 2015.

SCHERER, H.U.; HAUPL, T.; BURMESTER, G.R. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, v.110, 2020.

SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F. & NAHRSTEDT, A. Flavon-C-glycosides and tartaric acid derivatives from the Brazilian Medicinal Plant *Echinodorus grandiflorus* spp. *aureus*. In: DPhG JAHRESTAGUNG AND JOINT MEETING, 2005, Munster.

SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F. & NAHRSTEDT, A. Trans-Aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.17, n.2, p.149-154, 2007.

SEIF, F., KHOSHMIRSAFA, M., AAZAMI, H., MOHSENZADEGAN, M.; SEDIGI, G.; BAHAR, M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*, v.15, n.23, 2017.

SEN, R.; HURLEY, J.A. Osteoarthritis. [Updated 2023 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482326/>. Acesso em 07 de julho de 2023.

SENTHALAL, S.; LI, J.; GOYAL, A.; et al. Arthritis. [Updated 2020 Aug 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518992/>. Acesso em: 05 de julho de 2023.

SERHAN, C.N., BRAIN, S.D., BUCKLEY, C.D., GILROY, D.W., HASLETT, C., O'NEILL, L.A., PERRETTI, M., ROSSI, A.G., WALLACE, J.L. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB*, v.21, p.325-32, 2007.

SHIGEMORI, H; SHIMAMOTO, S.; SEKIGUCHI, M.; OHSAKI, A.; KOBAYASHI, J. Echinodolides A and B, new cembrane diterpenoids with an eight membered lactone

ring from the leaves of *Echinodorus macrophyllus*. Journal of Natural Products, v.65, n.1, p.82-84, 2002.

SILPAVATHI, L.; DAS, M.K.; & DAS, D. Challenges and Prospective Solutions in Non-Classical Herbal Formulations: A Review. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.595, 2019.

SILVA, D.C. Liofilizado para o preparo de bebida probiótica a base de umbu-cajá e acerola. 78 p. 2018. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/handle/tede2/7592#preview-link0>. Acesso em 14 Jun 2021.

SILVA, G.P. Potencial anti-inflamatório do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* e de suas frações em modelo inflamatório agudo. 120p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, G. P.; FERNANDES, D. C.; VIGLIANO, M. V.; DA FONSECA, E. N.; SANTOS, S. V.; MARQUES, P. R.; JUSTO, M. D.; SABINO, K. C.; COELHO, M. G. Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high in-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.68, p.1584-1596, 2016.

SILVA, G.P.D.; FERNANDES, D.C.; VIGLIANO, M.V.; PINTO, F.A.; FONSECA, E.N.D.; SANTOS, S.V.M.; MARQUES, P.R.; GAYER, C.R.M.; VELOZO, L.S.M.; LIMA, C.K.F.; PALHARES DE MIRANDA, A.L.; JUSTO, M.D.G.; SABINO, K.C.C.; COELHO, M.G.P. *Echinodorus macrophyllus*: Hydroxycinnamoyl derivatives reduces neutrophil migration through modulation of cytokines, chemokines, and prostaglandin in the air-pouch model. Journal of ethnopharmacology, v. 284, 2022.

SILVA, L.D.; SARI, R.; DIEDRICH, C.; PEREIRA, C.; Lima, V.A.; Oldoni, T.L.C. Extraction, characterization and antioxidant properties of phenolic compounds in açai juçara (*Euterpe edulis* Mart.) from Atlantic Forest. Brazilian Journal of Food Technology, v.24, 2021.

SINGH, A.; RAJASEKARAN, N.; HARTENSTEIN, B.; SZABOWSKI, S.; GAJDA, M.; ANGEL, P.; ILLGES, H. Collagenase-3 (MMP-13) deficiency protects C57BL/6 mice from antibody-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v.15, n.6, p.R222, 2013.

SMILIJANOVIC, B.; RADZIKOWSKA, A.; KUCA-WARNAWIN, E.; KUROWSKA, W.; GRUN, J.R.; STUHMULLER, B.; BONIN, M.; SCHULTE-WREDE, U.; SORENSEN, T.; KYOGOKU, C.; BRUNS, A.; HERMANN, S.; PHRNDORF, S.; AUPPERLE, K.; BACKHAUS, M.; BURMESTER, G.R.; RADBRUCH, A.; GRUTZKAU, A.; MASLINSKI, W.; HAUPL, T. Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Annals of Rheumatic Diseases: Homepage*, v.77, n.2, p.300-3008, 2017.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. 2 ed. New York: Wiley-Interscience Publication, 1997. 765p.

SONG, X.; ZHANG, Y.; DAI, E. Therapeutic targets of thunder god vine (*Tripterygium wilfordii* hook) in rheumatoid arthritis (Review). *Molecular Medicine Reports*, v.21, p.2303-2310, 2020.

SOUZA, K.C.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L.; ORTEGA, G.G. The adjuvants aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. *Drug development and industrial pharmacy*, v.26, n.3, p.331–336, 2000.

STADEN, R., K. F. BEAL, and J. K. BONFIELD. The Staden Package, 1998. *Methods in Molecular Biology*, v.132, p.115-130, 2000.

STRADA, C.L.; DA LIMA, K.C.; DA SILVA, V.C.; RIBEIRO, R.V.; DORES, E.F.G.C.; DALL'OGGIO, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; CAROLLO, C.C.; MARTINS, D.T.O.; JUNIOR, P.T.S. Isoviteixin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.27, p. 619–626, 2017.

STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J.D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.6, n.1, p.75-92, 2007.

SUGIMOTO, M.A.; SOUSA, L.P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA M.M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in Immunology*, v.7, n.160, 2016.

SUHAG, Y.; NAYIK, G.A.; KARABAGIAS, I.K.; NANDA, V. Development and Characterization of a Nutritionally Rich Spray-Dried Honey Powder. *Foods*, v.10, n.162, 2021.

SWOFFORD, D.L. PAUP (Phylogenetic Analysis Using PAUP). v. 4.0a159, 2018.

TANAKA, Y. Rheumatoid arthritis. *Inflammation Regeneration*, v.40, n.20, 2020.

TANUS-RANGEL, E.; SANTOS, SR.; LIMA, J.C.; LOPES, L.; NOLDIN, V.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V.; MARTINS, D. T. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). *Journal of Medicinal Food*, v.13, p.1161-1166, 2010.

TATE, J.A.; SIMPSON, B. B. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, v.28, p.723-737, 2003.

TSENG, C.C.; CHEN, Y.J.; CHANG, W.A.; TSAI, W.C.; OU, T.T.; WU, C.C.; YEN, J.H.; KUO, P. L. Dual Role of Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis: The Chicken and the Egg. *Int J Mol Sci*, v.6, n.21, p.1071, 2020.

TURVEY, S.E.; BROIDE, D.H. Innate immunity. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, v.125, n.2, p.24-32, 2010.

USP 31. Pharmacopeia online. 1174 Powder flow. Disponível em: [http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0\\_c1174.html](http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c1174.html). Acesso em 07 de julho de 2023.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Springer Science and Business Media LLC, v.15, n.3, p.243-249, 2005.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v.1, p.1112–1116, 2006.

WAJANT, H.; SIEGMUND, D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.7, n.91, 2019.

WEN, J.; LI, H.; DAI, H.; HUA, S.; LONG, X.; LI, H.; IVANOVSKI, S.; XU, C. Intra-articular nanoparticles based therapies for osteoarthritis and rheumatoid arthritis management. *Materials today Bio*, v.19, 2023.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfund, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, p. 315–32, 1990.

YASIR, M.; GOYAL, A.; BANSAL, P.; SONTALIA, S. Corticosteroid Adverse Effects. [Updated 2021 Mar 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462/>

YATSU, F.K.; BORGHETTI, G.S.; MAGALHÃES, F.; FERRAZ, H.G.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. *Ilex paraguariensis* Pellets from a Spray-Dried Extract: Development, Characterization, and Stability. *AAPS PharmSciTech*, v.17, n.2, p.358–367, 2016.

YUNES, R.A.; CHECHINEL-FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química moderna. In: YUNES, R.A.; CHECHINEL-FILHO, V., editores. *Química de*

Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: Univali, 2016. p.12-39.

ZHANG, Q.W.; LIN, L.G.; YE, W.C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chin Med, v.13, n.20, 2018.

ZHOU, Y.Y.; XIA, X.; PENG, W.K.; WANG, Q.H.; PENG, J.H.; LI, Y.L.; WU, J.X.; ZHANG, J.Y.; ZHAO, Y.; CHEN, X.M.; HUANG, R.Y.; JAKOSSON, J.; WEN, Z.H.; HUANG, Q.C. The Effectiveness and Safety of *Tripterygium wilfordii* Hook. F Extracts in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in Pharmacology, v.9, p.356, 2018.

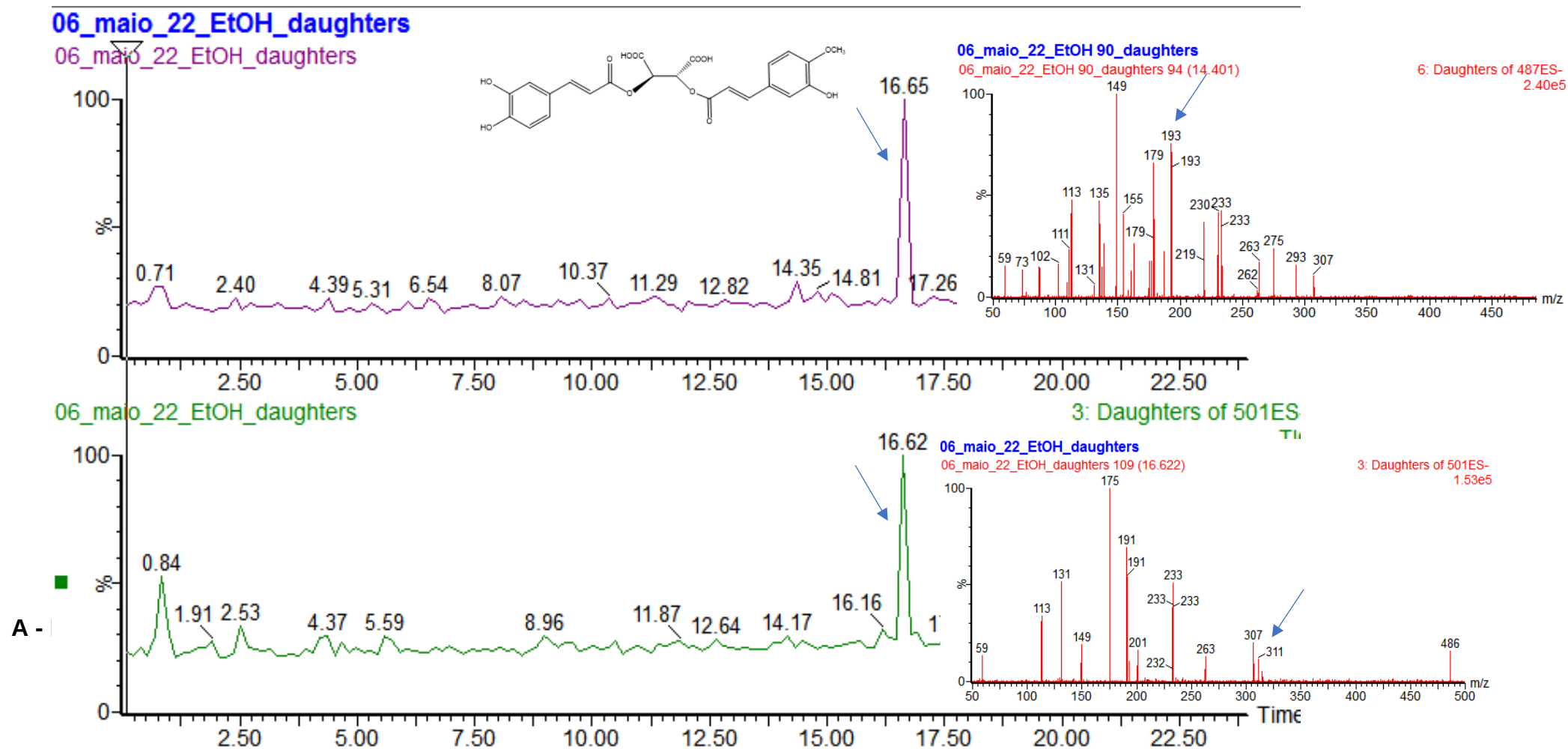
ZHU, X.; SANG, L.; WU, D.; RONG, J.; JIANG, L. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of orthopaedic surgery and research, v.13, n.1, p.170, 2018.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H.; SITAREK, P.; MERECZ-SADOWSKA, A.; MALINOWSKA, K.; ZAJDEL, K.; JABLONSKA, M.; SLIWINSKI, T.; ZAJDEL, R. Plant Extracts and Reactive Oxygen Species as Two Counteracting Agents with Anti- and Pro-Obesity Properties. International journal of molecular sciences, v.20, n.18, p.4556, 2019.

ZORZENON, M.R.T.; FORMIGONI, M.; DA SILVA, S.B.; HODAS, F.; PIOVAN, S.; CIOTTA, S.R.; COSTA, S.C. Spray drying encapsulation of stevia extract with maltodextrin and evaluation of the physicochemical and functional properties of produced powders. Journal of Food Science, v.85, n.10, p.3590–3600, 2021.

**ANEXO 1:** Fragmentação no UPLC-MS (condições 4.5.2, pág. 63) para identificação dos ácidos cafeoil-feruloil-(2*R*,3*R*)-(+)-tartárico e di-feruloil-(2*R*,3*R*)-(+)-tartárico, conforme descrito no item 5.1, pág. 105.

**A -** Fragmentação ácidos cafeoil-feruloil-(2*R*,3*R*)-(+)-tartárico ( $m/z$  487), com os fragmentos  $m/z$  193, e  $m/z$  311.



**B** - Fragmentação ácidos diferuloil-(2*R*,3*R*)-(+)-tartárico ( $m/z$  501), com os fragmentos  $m/z$  149, e  $m/z$  325.

