

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARINA LEÃO SOUZA LEITE

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA
FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA E SUBFRAÇÕES DE PARTES AEREAS DE
Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldtdl) Micheli**

BELO HORIZONTE, 2018

MARINA LEÃO SOUZA LEITE

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA
FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA E SUBFRAÇÕES DE PARTES AEREAS DE
Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldtdl) Micheli**

Dissertação 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 Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua

Coorientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga

Colaboração: Dr. Diego Pinto de Oliveira

BELO HORIZONTE-MG

2018

L533e Leite, Marina Leão Souza.
Estudo da composição química e atividade anti-inflamatória da fração diclorometânica e subfrações de partes aéreas de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldltdl) Micheli / Marina Leão Souza Leite. – 2018.

102 f. : il.

Orientador: Rodrigo Maia de Pádua.

Coorientador: Fernão Castro Braga.

Colaborador: Diego Pinto de Oliveira.

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

1. *Echinodorus grandiflorus* – Teses. 2. Plantas – Análise – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Agentes antiinflamatórios – Teses. 5. Química vegetal – Teses. 6. Compostos bioativos – Teses. I. Pádua, Rodrigo Maia de. II. Braga, Fernão Castro. III. Oliveira, Diego Pinto de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.321



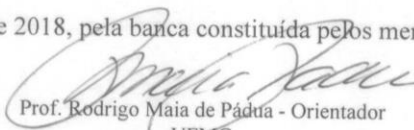
FOLHA DE APROVAÇÃO

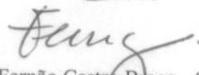
ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO DICLOROMETANICA E SUBFRAÇÕES DE PARTES AEREAS DE Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldtld) Micheli


MARINA LEÃO SOUZA LEITE

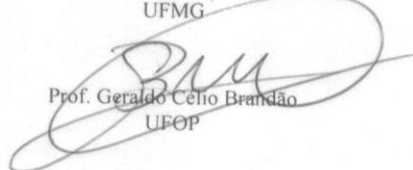
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 30 de julho de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Rodrigo Maia de Pádua - Orientador
UFMG


Prof. Fernão Castro Braga - Coorientador
UFMG


Prof. Priscilla Rodrigues Valadares Campana
UFMG


Prof. Geraldo Célio Brandão
UFOP

Belo Horizonte, 30 de julho de 2018.

Dedico,

À Deus pela sua onipresença e onipotência;

Aos meus pais pelos conselhos e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS:

À Deus pela sua onipresença e onipotência, me fornecendo a energia necessária para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais e familiares pelo carinho e conselhos indispensáveis nesta caminhada;

Ao prof. Rodrigo Pádua pela paciência, orientação, confiança e exemplo de profissional,

Ao prof. Fernão Braga pelo seu profissionalismo e por ter me proporcionado essa oportunidade;

Aos amigos da Fitoquímica: Luh, Ceres Luciana, Alisson, Tati, Val, Marina Rocha (Xara), Raquel, Zé, Diego, Maria Fernanda, Juliana Raposo, Dayse, Ana Nader, Luana, Gabriel, minha gratidão pelos momentos de descontração e pela convivência;

À Letícia Lobato pelas contribuições iniciais no trabalho;

Aos amigos de sempre: Felipe, Flavia, Thalissa, Cris, Juh, Maira, Lili, Ludy, por acreditarem no meu potencial e me confortarem nos momentos difíceis;

Aos funcionários Raquel, André, Juliana Raposo, por colaborarem com a organização do laboratório de Fitoquímica; e pela cooperação com as atividades realizadas;

A todas as pessoas que participaram direta e indiretamente na execução do trabalho.

“Viver plenamente é sentir a verdadeira alegria da alma; é sentir-se realizado; é sentir que está crescendo espiritualmente”

Masaharu Taniguchi

RESUMO

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schlttdl. Micheli, é uma planta popularmente conhecida como chapéu de couro. No Brasil, apresenta uso tradicional principalmente em doenças inflamatórias como artrite e gota. O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a inibição de mediadores pro- inflamatórios da fração diclorometânica e subfrações de *E. grandiflorus*, bem como investigar a composição química das frações ativas. O extrato etanólico das partes aéreas de *E. grandiflorus* foi dissolvido em água (40 mg/mL) e subsequentemente submetido a partição com solventes imiscíveis (n-hexano, diclorometano e acetato de etila). A fração diclorometânica (DCM) foi submetida à filtração utilizando-se como elemento filtrante a mistura de carvão ativado / celite (2:1), eluída sequencialmente com os seguintes solventes: metanol, acetona, diclorometano e n-hexano. As sub-frações metanólicas e acetônicas foram submetidas a subsequente purificação utilizando coluna empacotada com sílica gel e eluída sequencialmente com diclorometano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções. A atividade das frações sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) foram avaliadas *in vitro* em células THP-1 estimuladas por LPS. Empregando a dexametasona como controle positivo na concentração (0,1 μ M por poço). Dentre as frações avaliadas, a fração diclorometânica foi a mais ativa reduzindo de forma significativa a liberação de ambos mediadores inflamatórios em células THP-1 estimuladas com LPS e não demonstrou citotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas (10, 30, e 90 μ g/mL). O fracionamento da sub-fração metanólica 1B em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel levou a obtenção da sub-fração 63-66, que foi testada nas concentrações de 10 μ g/mL e 30 μ g/mL, e promoveu inibição significativa de TNF- α e IL-1 β . A composição química da sub-fração supracitada foi investigada por métodos espectroscópicos usuais (IV, CG-MS, CLUE-MS-MS e RMN) e levou a identificação inequívoca do ácido palmítico (C₁₆H₃₂O₂) como seu constituinte principal. Nossos resultados demonstram que *Echinodorus grandiflorus* é uma fonte de compostos bioativos com uso potencial no tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Echinodorus grandiflorus*. Ácido palmítico. Anti-inflamatório. TNF- α . IL1- β .

ABSTRAT

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schltdl.) Micheli, popularly known as chapéu de couro in Brazil, is a plant species traditionally used to treat inflammatory diseases such as arthritis and gout. The main goal of this study was to evaluate *in vitro* the effect of *E. grandiflorus* dichloromethane fraction and subfractions on the production of inflammatory mediators, as well as to investigate the chemical composition of the active fraction. The crude extract of *E. grandiflorus* aerial parts was dissolved in water (40 mg/mL) and partitioned with dichloromethane. This fraction was filtered over active charcoal / celite (2:1) by eluting with methanol, acetone, dichloromethane and *n*-hexane. The methanol and acetone sub-fractions are further fractionated by silica gel column chromatography eluted with dichloromethane / ethyl acetate / methanol in different proportions. The effect of the fractions were evaluated *in vitro* on LPS-stimulated THP-1 cells. And the dexamethasone (0,1 µM/per well) was employed as positive control. Among the assayed fractions, dichloromethane fraction reduced more significantly the release of both mediators by LPS-stimulated THP-1 cells and showed no cytotoxicity at all tested concentrations (10, 30, and 90 µg/mL). Fractionation of methanolic sub-fraction by silica gel column chromatography afforded the sub-fraction 63-66, which tested at 10 µg/mL and 30 µg/mL elicited similar inhibition of TNF-α; and IL-1β release. The chemical composition of sub-fraction 63-66 was investigated by spectroscopy analyses (IR, GC-MS, UPLC-MS-MS and NMR) and allowed the identification of palmitic acid (C₁₆H₃₂O₂) as its main constituent. Our findings point out *Echinodorus grandiflorus* as a source of bioactive compounds potentially useful to treat inflammatory diseases.

Keywords: *Echinodorus grandiflorus*. Palmitic acid. Anti-inflammatory. IL-1β. TNF-α.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotos da <i>E. grandiflorus</i> (Cham. & Schldl) conhecidas como “chapéu de couro”.....	22
Figura 2: Esquema de Sinalização da Fisiopatologia da Artrite gotosa.....	30
Figura 3: Medicamentos e suas vias de ação do tratamento da gota	33
Figura 4: Fluxograma das frações enriquecidas em Compostos lipofílicos	53
Figura 5: Fluxograma das sub-frações (metanólicas, acetônicas. Diclorometânicas e hexânicas) obtidas por filtração de pressão negativa com CA/CE (Itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.3.2.3)	57
Figura 6: Fluxograma da purificação da sub-fração 63-66 obtida do fracionamento com a fração metanólica 1B (Itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.3.2.3,4.3.2.4)	60
Figura 7: Cromatogramas dos extratos das partes aéreas de <i>E. grandiflorus</i> obtidos com diferentes solventes/ métodos extrativos. A: extrato etanólico (Percolação); B: extrato diclorometânico (Maceração); C: extrato DCM:EtOAc (1:9; Maceração); D: extrato DCM:EtOAc (2:8; Maceração); E: extrato DCM:EtOAc (3:7; Maceração); F: extrato DCM:EtOAc (1:1; Maceração). (Itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) Condições cromatográficas via item 4.3.2.2.....	67
Figura 8: Cromatogramas das frações obtidas por partição entre os solventes imiscíveis no extrato etanólico das partes aéreas da <i>E. grandiflorus</i> . A: fração DCM; B: fração EtOAc; C:Fração hexânica; D: Fração DCM obtida da partição antecedida com hexano (3); E: Fração EtOAc obtida da partição antecedida com hexano. (Item 4.2.4) Condição cromatográfica item 4.3.2.2.....	69
Figura 9: Perfis cromatográficos obtidos por partição entre os solventes imiscíveis no extrato etanólico das partes aéreas da <i>E. grandiflorus</i> (Item 4.3.1).....	72
Figura 10: Cromatogramas das frações obtidas por purificação em carvão ativado/celite a partir da DCM1 A:fração metanólica 1 A, B: fração metanólica 1B, C: fração acetônica 1 A; D: fração acetônica 1 B, E: fração acetônica 1C, F: fração diclorometânica 1 A, G: fração diclorometânica 1 B, H: fração diclorometânica C, I: fração hexânica 1 A,J: fração hexânica 1B, K: fração hexânica 1C.....	73
Figura 11: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para sub-fração 63-66 com detecção de uv. Condição cromatográfica vide item 4.3.2.2	76
Figura 12: Espectro de massas obtidos por UPLC-MS-ESI modo positivo (A) e modo negativo (B) para o pico presente da sub-fração 63-66.....	77
Figura 13: Perfis cromatográficos e espectros de massas da sub-fração 63-66 analisada por CG acoplada aos espectros de massas com ionizador de impacto eletrônico.....	79
Figura 14: Perfil cromatográfico da sub-fração 63-66.Em detalhe o pico secundário com espectro de massa compatível com o ácido esteárico.....	80
Figura 15: Espectro de Ressonância nuclear magnética (RMN) de ¹ H da sub-fração 63-66 (400 MHz, CDCl ₃).....	80

Figura 16: Espectros de Ressonância Nuclear Magnética (RMN) de ^{13}C da sub-fração 63-66 (100 MHz- CDCl_3).....	82
Figura 17: Sub-espectro DEPT-135 obtido para sub-fração (400 MHz- CDCl_3).....	83
Figura 18: Estrutura química do ácido palmítico.....	83
Figura 19: Atividade da fração diclorometânica de <i>E. grandiflorus</i> avaliada nas doses 10,30, 90 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre a inibição de produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS.....	86
Figura 20: Atividade da sub-fração 63-66/ácido palmítico obtido por cromatografia em coluna de sílica gel flash a partir da segunda filtração de metanol das partes aéreas da <i>E. grandiflorus</i> avaliada nas doses 10,30 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre a inibição de produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS.....	87
Figura 21: Atividade da fração diclorometânica de <i>E. grandiflorus</i> avaliada nas doses 10,30, 90 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre a inibição de produção de IL-1 β pelas células THP-1 estimuladas por LPS.....	88
Figura 22: Atividade da sub-fração 63-66/ácido palmítico obtido por cromatografia em coluna de sílica gel flash a partir da segunda filtração de metanol das partes aéreas da <i>E. grandiflorus</i> avaliada nas doses 10,30 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre a inibição de produção de IL-1 β pelas células THP-1 estimuladas por LPS.....	89
Figura 23: Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento do extrato etanólico 96° GL obtido por percolação das partes aéreas da <i>E. grandiflorus</i>	51
Tabela 2: Rendimento do extrato diclorometânico obtido por maceração das partes aéreas <i>E. grandiflorus</i>	51
Tabela 3: Rendimento dos extratos em diferentes proporções de diclorometano, acetato de etila obtidos por percolação das partes aéreas <i>E. grandiflorus</i>	52
Tabela 4: Massa das frações enriquecidas em compostos de média e baixa polaridade obtidas a partir das partições do extrato etanólico a 96° GL com acetato de etila/diclorometano/hexano das partes aéreas <i>E. grandiflorus</i>	53
Tabela 5: Sistema de eluição perfil exploratório para o CLUE-DAD-FR	55
Tabela 6: Sistema de eluição perfil exploratório para CLUE-DAD-MS	56
Tabela 7: Rendimento das frações obtidas da purificação de DCM 1 (Item 2.2.4) com carvão ativado e terra diatomácea	57
Tabela 8: Eluentes utilizados no fracionamento da fração metanólica 1B por cromatografia em coluna de sílica gel flash	58
Tabela 9: Massa das reuniões das frações provenientes da coluna de sílica gel flash originadas a partir da fração metanólica 1B	59
Tabela 10: Atribuições ao espectro de RMN ¹ H da sub-fração 63-66 (400 MHz, CDCl ₃)	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Artrite gotosa
BSA	Albumina bovina sérica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLUE-DAD	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjos de diodos
CLUE-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL1	Quimiocina C-X-C motif. Ligante 1
CXCLR-1	Receptor da quimiocina C-X-C motif. Ligante 1
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
EtOAc	Acetato de Etila
FT-IV	Infravermelho com transformada de Fourier
ICAM-1	Molécula de adesão celular-1
IL-1 β	Interleucina IL-1 Beta
INF	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
mBSA	Albumina bovina sérica metilada
NF-kB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
PMA	Phorbol-12 Miristato-13Acetato
PBS	Tampão salino fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI-1640	Meio com L-Glutamina e sem bicarbonato de sódio
SBF	Soro fetal bovino
THP-1	Células de leucemia monocítica humana aguda
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral alfa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tempo de retenção
UMA	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Proteína vascular de adesão molecuar-1
XO	Xantina oxidase

LISTA DE ESTRUTURAS MOLECULARES

1. Isoorientina
2. Swertiajaponina
3. Swertisina
4. Isovitexina
5. Ácido chicórico
6. Ácido caftárico
7. Campesterol
8. Sitosterol
9. Stigmasterol
10. Ácido linolênico
11. Ácido dodecanóico
12. Ácido caféico
13. Ácido ferúlico
14. Ácido isoferúlico
15. Ácido transaconítico
16. Echinodol
17. Ácido Echinoico
18. Solidagolactona
19. Ácido harwíckico
20. Derivado clerodânico 1
21. Derivado clerodânico 2
22. Derivado clerodânico 3
23. Derivado clerodânico 4
24. Fitol
25. 6,16-dihidróxi-clerodan-13-en-15,16-olídeo-3-ona

26. Harpagosídeo
27. Isoquercetina
28. Rutina
29. Liconopolídeo
30. Eremantolídeo C
31. Lupeol
32. Luteolina
33. Apigenina
34. Genisteina
35. Astilbina
36. Quercetina
37. Miricetina
38. Liquiritigenina
39. Isoliquiritigenina
40. Procianidina
41. Morina
42. Eriodictiol
43. Okanina
44. Resveratrol
45. Ácido Lithospérmico
46. Geranina
47. Corilagina
48. Ácido gálico
49. Ácido Elágico
50. Berberina
51. Colchicina
52. Piperina

53. Arctigenina
54. Filantina
55. Hipophyllantina
56. Philtetralina
57. Casearina
58. Caseargewiina
59. Trans-crotonina
60. Trans-Desidrocrotonina
61. Cajucarinolídeo
62. Ácido 13 (16) -dien-19-oico
63. Andrografolideo
64. Ácido 9-12 octadecadienoico (Ácido linoleico)
65. Ácido Palmítico/Ácido hexânóico
66. Ácido docosaexaenoico
67. Ácido oleico
68. Ácido láurico
69. Ácido esteárico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Espécies de chapéu de couro.....	21
3.1.1. Características botânicas.....	21
3.2. Composição química da <i>Echinodorus grandiflorus</i>	22
3.3. Atividades biológicas da <i>Echinodorus grandiflorus</i>	26
3.4. Fisiopatologia da artrite gotosa (AG).....	28
3.5. Atividade antiartrítica gotosa de extratos, frações, e produtos naturais derivados de plantas.....	34
3.6. Atividade anti-inflamatória de constituintes de média e baixa polaridade de plantas.....	43
3.6.1. Diterpenos: aplicação no tratamento da artrite gotosa.....	43
3.6.2. Ácidos graxos com atividade anti-inflamatória.....	45
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	48
4.1. Equipamentos.....	48
4.1.2. Solventes e Reagentes.....	49
4.1.3. Substância de Referência.....	49
4.1.4. Vidrarias e Materiais diversos.....	49
4.1.5. Revelador utilizado na Cromatografia em Camada Delgada.....	50
4.1.6. Material Vegetal.....	50
4.2. Obtenção dos derivados vegetais das partes aéreas da <i>Echinodorus grandiflorus</i>	50
4.2.1. Extrato Etanólico.....	50
4.2.2. Extrato diclorometânico obtido por maceração (enriquecidos em compostos de média e baixa polaridade).....	51
4.2.3. Extratos obtidos com diferentes proporções de acetato de etila, diclorometano (enriquecidos em compostos de média e baixa polaridade).....	51

4.2.4. Obtenção das frações enriquecidas em compostos de média e/ou baixa polaridade a partir do extrato etanólico.....	52
4.3. Análises cromatográficas qualitativa dos extratos e frações.....	54
4.3.1. Cromatografia em Camada Delgada de Sílica.....	54
4.3.2. Condições cromatográficas para obtenção dos perfis exploratórios por CLUE-DAD.....	54
4.3.2.1. Preparo das Amostras.....	54
4.3.2.2. Condições cromatográficas para obtenção dos perfis exploratórios de extratos e frações por CLUE-DAD-MS.....	55
4.3.2.3 Fracionamento da fração DCM 1 (Item 4.2.4) com carvão ativado/terra diatomácea.....	56
4.3.2.4 Fracionamento da fração metanólica 1 B por cromatografia em coluna de sílica gel flash.....	58
5. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO ISOLADO....	60
5.1 Cromatografias gasosas acopladas ao espectrômetro de massas com detector de impacto eletrônico.....	61
6. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	61
6.1. Materiais.....	61
6.2. Ensaio de Atividade Biológica <i>in vitro</i>	62
6.2.1. Inibição da produção de IL-1 β e TNF- α	62
6.2.1.1. Cultivos de Células THP-1.....	62
6.2.1.2. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade pelo método da sulforrodamina B.....	62
6.2.1.3. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti TNF- α e anti IL-1 β	63
6.2.1.4. Análise estatística.....	64
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
7.1. Otimização das condições extrativas das partes aéreas da <i>Echinodorus grandiflorus</i> visando obter constituintes de média e baixa polaridade (Itens 4.2.4).....	64
7.2. Enriquecimento a partir do extrato etanólico das partes aéreas da <i>Echinodorus grandiflorus</i> compostos de média e baixa polaridade.....	68

7.3. Purificação da fração diclorometânica com carvão ativado e terra diatomácea (Item 4.3.2.3).....	70
7.4. Fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel flash da fração metanólica 1B (Item 4.3.2.4).....	75
7.5. Elucidação estrutural da sub-fração 63-66.....	76
7.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória da <i>Echinodorus grandiflorus</i>	84
8. CONCLUSÕES.....	91

1. INTRODUÇÃO:

O conhecimento, sobre o uso tradicional de plantas medicinais, é transmitido ao longo das gerações e apresenta um papel de destaque na cultura, na medicina e na alimentação da sociedade como um todo (STEHMANN & SOBRAL et al., 2017; LIMA-SARAIVA, et al., 2015, NUNEZ & COSTA, 2016, ATANOSOV et al., 2015). As plantas medicinais são uma fonte imensurável de compostos biologicamente ativos com grande potencial terapêutico, podendo ser utilizadas *in natura* para obtenção de chás, na produção de fitoterápicos contendo frações enriquecidas em compostos biologicamente ativos e na obtenção dos compostos isolados, classificados como fitofármacos (SHEN, 2015). O Brasil é reconhecido como um país de megabiodiversidade, nesse contexto, as plantas medicinais e seus derivados apresentam destaque principalmente na atenção primária à saúde (OLIVEIRA, OLIVEIRA & MARQUES, 2016; ANTONIO, TESSER, & MORETTI-PIRES, 2013; CRAGG & NEWMAN, 2013; CRAGG & NEWMAN, 2016). A flora brasileira compreende 34.916 espécies vegetais pertencentes aos grupos das: briófitas, licófitas, samambaias (pteridófitas), gimnospermas e angiospermas, grande partes dessas espécies ainda não foram avaliadas quanto a possível aplicabilidade terapêutica. Estes dados demonstram uma grande potencialidade do Brasil em desenvolver medicamentos baseados em princípios ativos encontrados em plantas, o que justifica a expansão das pesquisas científicas, desenvolvimento e inovações nessa área (STEHMANN & SOBRAL, et al., 2017, LIMA-SARAIVA et al., 2015; ASSIS et al., 2015, JOLY et al., 2011).

A despeito da grande potencialidade, os avanços na produção tecnológica de fitoterápicos ainda permanecem incipientes no Brasil, principalmente devido à falta de investimentos do setor público e privado (ZUANAZZI & MAYORGA, 2010; ASSIS et al., 2015).

No entanto, apesar das dificuldades financeiras, grupos de pesquisa nacionais buscam o desenvolvimento de medicamentos provenientes de plantas para o tratamento de doenças para as quais o arsenal terapêutico ainda é ineficaz ou escasso. Nesse contexto, destaca-se a busca de um medicamento com atividade antiartrítica.

A artrite é uma patologia “das articulações” sendo uma das causas mais frequentes de dor e incapacidade física em adultos, levando à redução da qualidade de vida e à procura por assistência médica. O termo artrite é uma denominação comum para doenças com lesões articulares, dor, inflamação e incapacidade física. Apresentam mais de 100 diferentes formas, sendo as mais prevalentes osteoartrite, artrite reumatoide e gotosa, (OLIVIEIRO, et al; 2017).

O processo inflamatório participa da fisiopatologia dessas doenças articulares, esse evento fisiológico é comandado por mediadores pró-inflamatórios que terão como função controlar a inflamação. Esses mediadores pró-inflamatórios são substâncias liberadas na área lesada tecidual ou por alguma célula ativada que irão conduzir o processo inflamatório. Dentre esses pode-se destacar as interleucinas (IL-6 e IL-1 β), e o fator de necrose tumoral (TNF- α). As interleucinas estão presentes nas células como os macrófagos, monócitos e nos fibroblastos, atuam como marcadores de indução da inflamação, regulam as reações imunológicas, entre outros eventos fisiológicos. Já o TNF- α é encontrado nos monócitos, macrófagos e linfócitos-T, sendo estes capazes de ativar a coagulação, estimula a expressão de moléculas de adesão e da apoptose (POLUHA & GROSSMANN, 2018, OLIVEIRO, et al 2017).

Dentre as várias formas da doença, as duas mais frequentes são a artrite reumatoide (AR) e a artrite gotosa (AG) (LAEV & SALAKHUTDINOV, 2015), as quais causam prejuízo nas atividades cotidianas do paciente e levam a graves danos econômicos para a sociedade (AVOUAC, GOSSEC & DOUGADOS 2006; FRICHETTE & BARDIN, 2010).

Na terapia anti- AR e AG são utilizados em primeira linha diversos agentes anti-inflamatórios que causam durante uma utilização prolongada, relevantes reações adversas. Desta forma, existe uma busca crescente de novos agentes terapêuticos que sejam eficazes, mais seguros e de baixo custo (LAEV & SALAKHUTDINOV, 2015).

Especificamente na inflamação, são descritos diversos produtos naturais provenientes de plantas que são capazes de modular a expressão de mediadores pró-inflamatórios e, portanto, apresentam potencial para o tratamento da artrite. Dentre dos compostos naturais, existe diversas classes químicas como os flavonoides, quinonas, catequinas, polifenóis e compostos lipofílicos exemplificados nas classes de terpenos e ácidos graxos, as quais apresentam atividade anti-inflamatória, (LAEV

& SALAKHUTDINOV, 2015; INTAHPHUAK, KHONSUNG & PANTHONG, 2009), sendo estes últimos objeto de estudo do presente trabalho.

Diversas espécies vegetais ocorrentes no Brasil apresentam potencial para o desenvolvimento de fármacos com atividade antiartrítica. Dentre elas destacam-se *Echinodorus grandiflorus*, conhecida popularmente como chapéu-de-couro e utilizada tradicionalmente como anti-inflamatória e diurética, entre outros usos. O presente trabalho visa investigar o potencial anti-inflamatório dessa espécie, bem como identificar constituintes bioativos com potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de AR e/ou AG.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um método extrativo eficaz e obter derivados vegetais enriquecidos em constituintes de média e baixa polaridade com atividade anti-inflamatória, provenientes das partes aéreas da *Echinodorus grandiflorus*.

2.2. Objetivos específicos

1-Obter extratos, frações e sub-frações das partes aéreas *E. grandiflorus* enriquecidos em compostos com atividade anti-inflamatória;

2-Avaliar o perfil químico dos derivados vegetais obtidos em 1 utilizando de técnicas cromatográficas hifenadas;

3-Avaliar o efeito dos derivados obtidos sobre a produção de citocinas como IL-1 IL-1 β e TNF- α em culturas de células THP-1 estimuladas por lipossacarídeos (LPS).

4-Realizar a prospecção fitoquímica visando isolar e realizar a caracterização estrutural dos constituintes bioativos por técnicas espectroscópicas usuais

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Espécies de chapéu de couro

O gênero *Echinodorus* compreende 27 espécies, classificadas como monocotiledôneas pertencentes à família da Alismataceae. São plantas aquáticas, e apresentam folhas coriáceas e flores brancas na forma de inflorescência. As espécies mais conhecidas no Brasil são: *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli e *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae) denominadas popularmente como chapéu-de-couro. Ao todo no Brasil, existem 18 espécies referentes ao gênero *Echinodorus*. Algumas dessas espécies são empregadas na medicina popular, são elas: *E. grandiflorus*, *E. paniculatus* Mich, *E. argentinensis* Rataj e *E. macrophyllus*. A nomenclatura popular difere de acordo com a região do país. Os nomes mais citados são: “chapéu-de-couro”, “aguapé”, “chá-do-brejo”, “chá-mineiro”, “congonha-do-brejo”, “erva-do-brejo”, entre outros.

As monografias dessas espécies são encontradas nas Farmacopeias Brasileira 1º e 2º edições (Pharmacopeia 1926, Farmacopeia, 1959) referentes à espécie *E. macrophyllus*. Já a monografia da *Echinodorus grandiflorus* foi publicada na quinta edição da Farmacopeia Brasileira (Farmacopeia 2010b). Ambas as espécies são utilizadas popularmente com as mesmas finalidades terapêuticas: como diurético, anti-inflamatório, colagogo, hipotensor, depurativo, tônico, prostatite, estomatite, gengivite, sífilis, afecções renais e de garganta, doenças da pele, eliminação do ácido úrico e prevenção da arteriosclerose (MARQUES et al., 2017; GRANDI, 2014; SILVA; BASTOS & TAKAHASHI, 2009).

3.1.1. Características botânicas

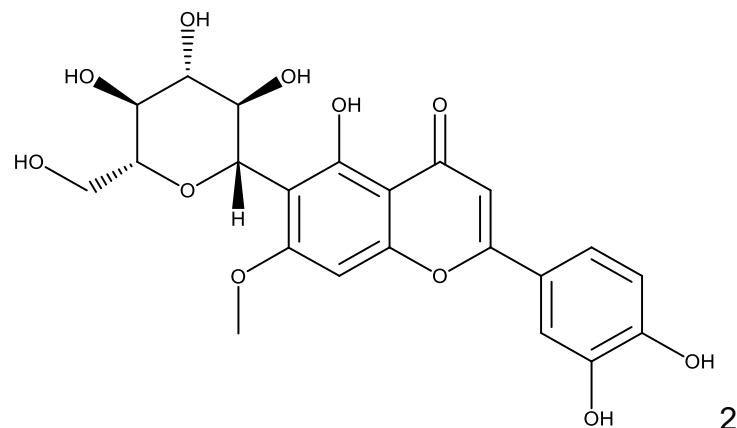
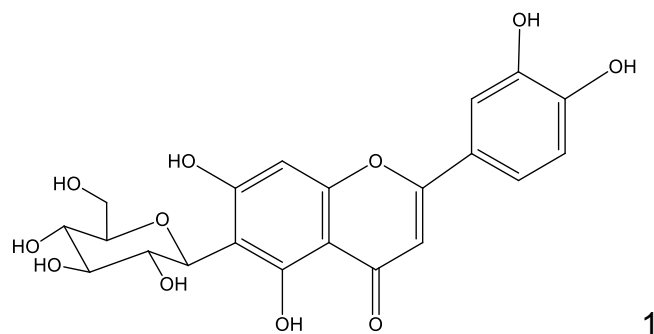
E. grandiflorus (Cham. & Schltdl.) Micheli é uma planta herbácea de habitat aquático ou semi-aquático, apresenta como características a presença de rizomas, folhas cordadas e pecioladas. As inflorescências e as flores são brancas e hermafroditas, os carpelos são livres e os estames numerosos. O fruto é agregado de aquênios (MARQUES, et al., 2017; LEHTONEN, 2009) Figura 1.

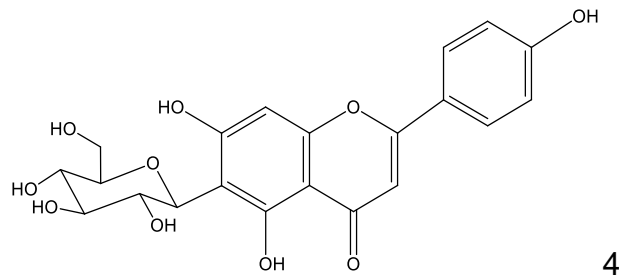
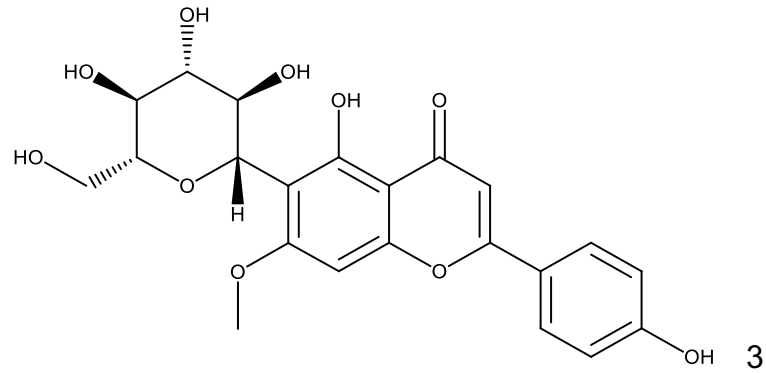
Figura 1: Fotos da espécie *E. grandiflorus* (Cham & Schlechtl.) conhecida como "chapéu de couro" (MARQUES, 2017)



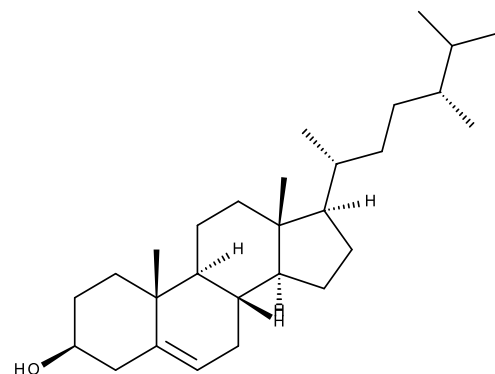
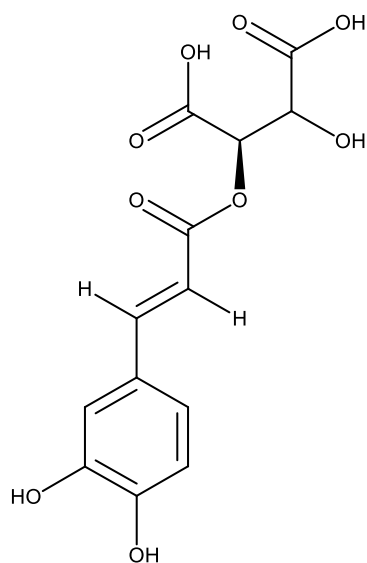
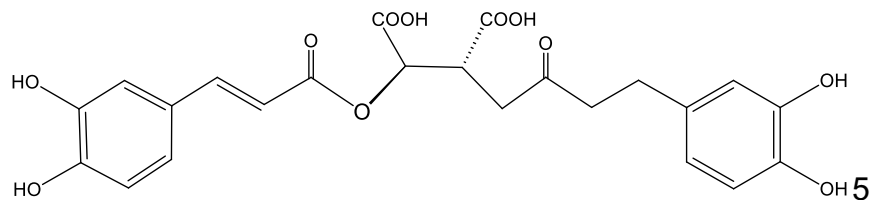
3.2. Composição química da *E. grandiflorus*

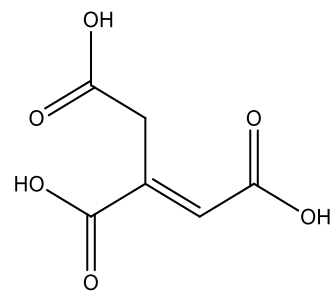
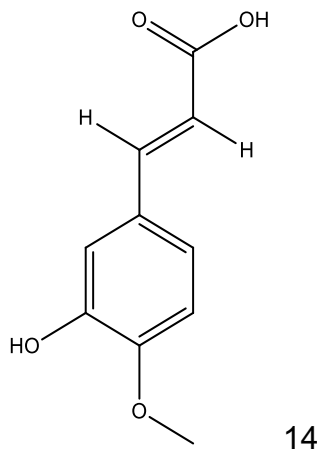
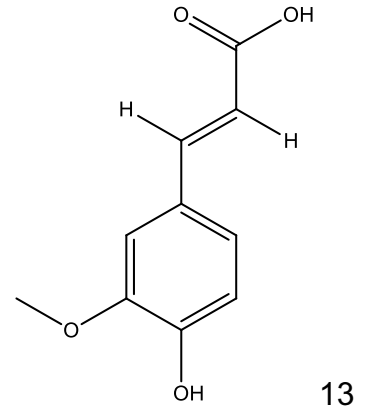
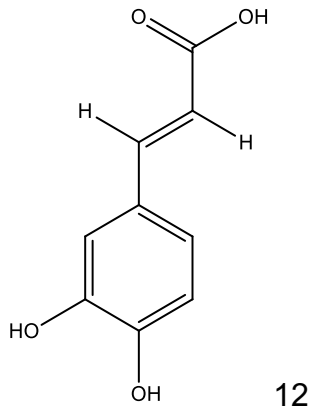
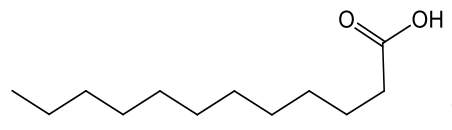
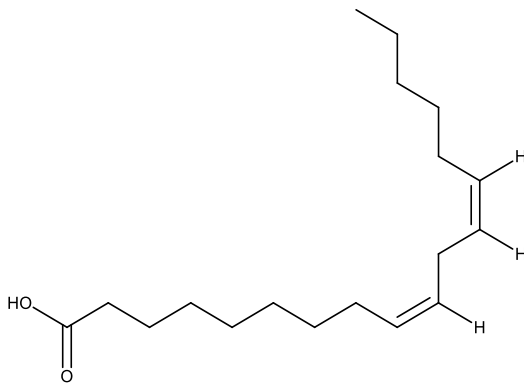
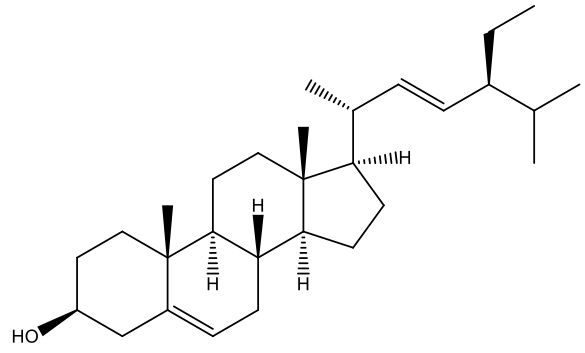
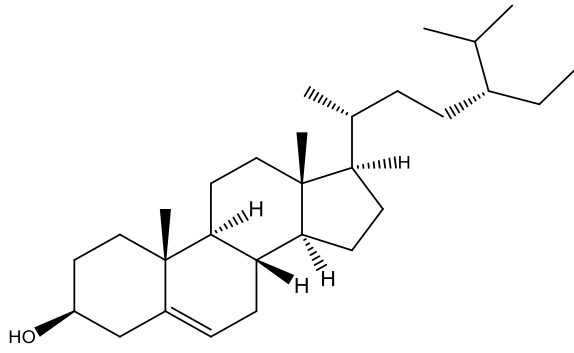
Constituintes químicos de diferentes classes já foram isolados das folhas de *E. grandiflorus*, incluindo diterpenos, C-heterosídeos de flavonas como a isoorientina **(1)**, swertiajaponina **(2)**, swertisina **(3)**, isovitexina **(4)**.



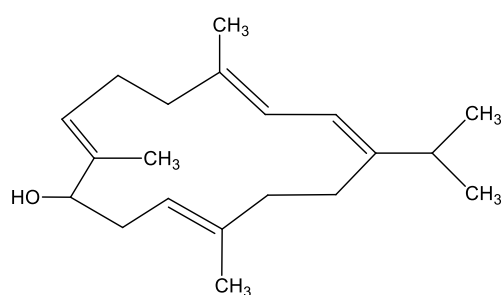


Os derivados do ácido o-hidroxicinamoil tartárico (ácidos chicórico **(5)** e caftárico **(6)**), esteroides como: campesterol **(7)**, sitosterol **(8)** e estigmasterol **(9)**, além dos ácidos graxos (ácidos linolênico **(10)** e dodecanóico **(11)**), arilpropanoides simples (ácido caféico **(12)**, ferúlico **(13)** e isoferúlico **(14)**) e ácido trans-aconítico **(15)** (DIAS et al., 2013).

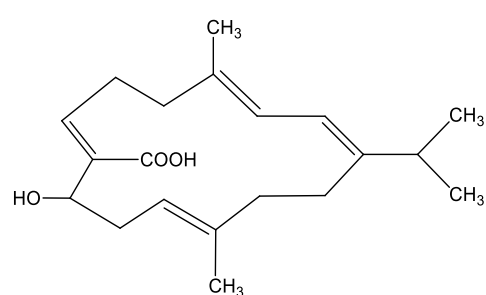




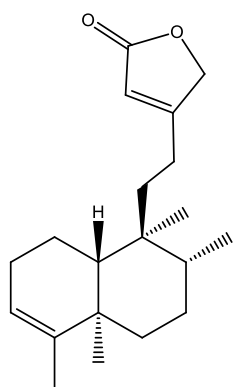
Os diterpenos isolados da espécie possuem esqueletos cembrânicos, clerodânicos e lineares. Os diterpenos cembrânicos incluem o echinodol (**16**) e o ácido echinóico (**17**); já os de esqueleto clerodânico compreendem o clerodan-3,13-dien-16-15-olídeo (solidagolactona) (**18**), o ácido hardwíckico (**19**) e quatro outros derivados clerodânicos (**20**, **21**, **22**,**23**); além do fitol, um diterpeno linear (**24**), (TANAKA, 1999). GARCIA e colaboradores (2010), isolaram dois outros diterpenos clerodânico, em pesquisas desenvolvidas com o extrato diclorometânico de folhas das espécies: 6-hidróxi-clerodan-13-en-15,16-olídeo-3-ona e 6,16-dihidróxi-clerodan-13-en-15,16-olídeo-3-ona (**25**).



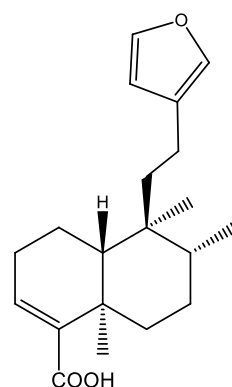
16



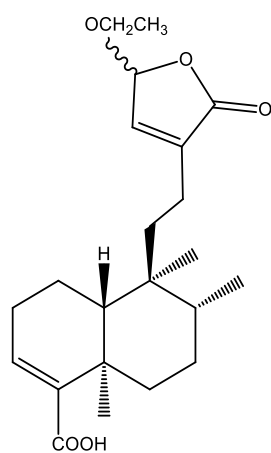
17



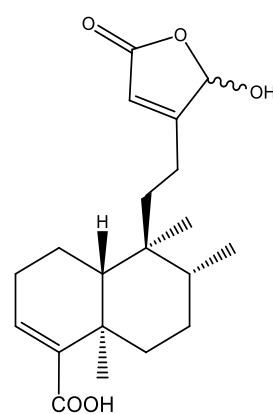
18



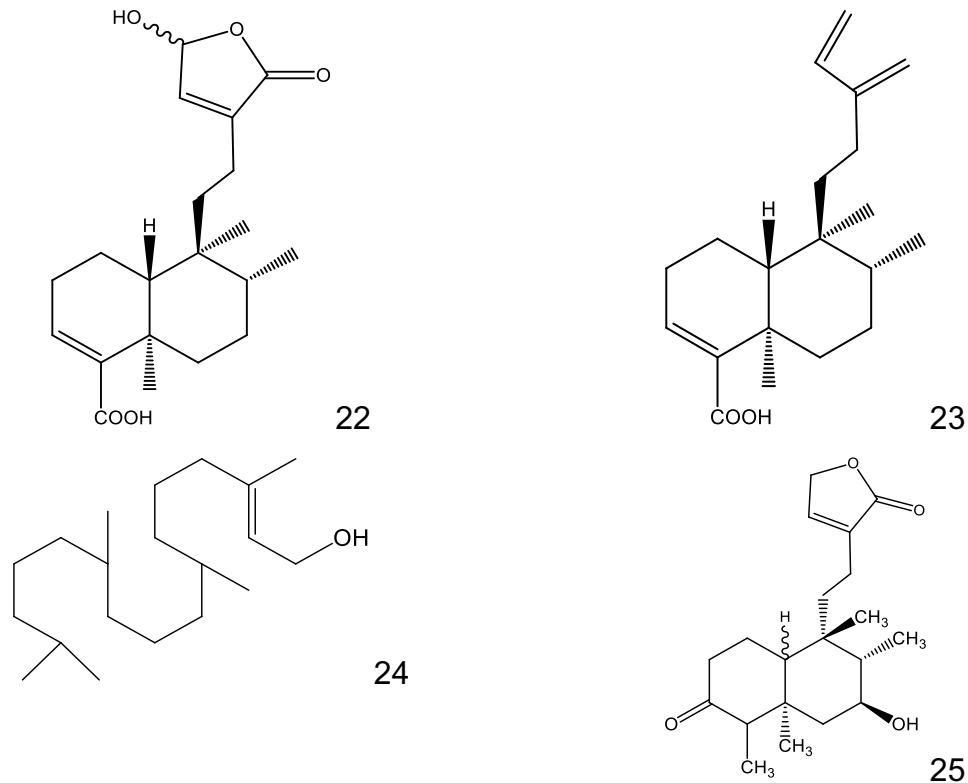
19



20



21



3.3. Atividades biológicas de *E. grandiflorus*

De acordo com D e colaboradores (2006), o extrato metanólico dos rizomas de *E. grandiflorus* apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica. Os autores avaliaram a ação anti-inflamatória por via oral do extrato no modelo de edema de pata induzido por carragenina. A porcentagem de inibição do edema foi de 16,67%, 36,67% e 50%, nas dosagens de 100, 200 e 400 (mg/kg) em comparação ao controle positivo de indometacina (10 mg/Kg). Observou-se que na dose de 400 mg/kg houve uma redução significativa do volume do exsudato. Já na dose de 200 mg/kg verificou-se uma inibição da migração leucocitária. Adicionalmente, avaliou-se a analgesia via inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. O extrato metanólico inibiu as contorções em 34,30%, 35,84% e 36,07%, respectivamente.

Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, a atividade antiedematogênica de extratos e frações de folhas de *E. grandiflorus* foi avaliada em modelo de edema induzido por carragenina em camundongos, (GARCIA et al., 2010). Os extratos hidroetanólicos a 50% e 70% administrados por via oral, apresentaram atividade inibitória do edema na concentração de 1000 mg/Kg, 2 horas após a injeção da carragenina, reduzindo o edema em 57,6% e 59,5% respectivamente.

Posteriormente, avaliou-se a ação antiartrítica dos extratos etanólicos a 70% e das frações enriquecidas em flavonoides de *E. grandiflorus* em modelo de artrite induzida por antígeno em ratos (GARCIA et al., 2016 a). Tanto o extrato etanólico a 70% quanto a fração enriquecida em flavonoides reduziram o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e para o tecido periarticular, bem como os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido periarticular. O extrato etanólico a 70% reduziu o número de células e inibiu o acúmulo dos neutrófilos na cavidade sinovial nas três doses administradas (100, 300, 1000 mg/Kg). Já a fração enriquecida em flavonoides, ensaiada nas doses de 0,7, 3,0, 7,2 mg/Kg, reduziu o recrutamento de leucócitos na cavidade sinovial. A dose de 7,2 mg/Kg reduziu o exsudato inflamatório na cavidade do joelho e minimizou a ação hipernoceptiva. Além disso, a fração enriquecida em flavonoides reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β na maior dose ensaiada. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, GARCIA e colaboradores. (2016 b), avaliaram a atividade de extratos e frações de folhas de *E. grandiflorus* sobre a liberação de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS. Foram testados extratos etanólicos das folhas a 30%, 50%, 70% e 96%, além de extrato aquoso e diclorometânico. O extrato etanólico a 50%, nas concentrações 10 e 30 ($\mu\text{g/mL}$), inibiu em $59,9\% \pm 24.7$ e $100\% \pm 0,0$ respectivamente, a liberação do TNF- α nas células THP-1 estimuladas por LPS. Os extratos diclorometânico e aquoso promoveram uma resposta potente a 90 $\mu\text{g/mL}$ em relação à dexametasona (0,1 μm) ($90 \pm 14\%$ e $83 \pm 9\%$ respectivamente). Na menor concentração ensaiada (10 $\mu\text{g/mL}$), observou-se efeito inibitório da liberação de TNF- α para os extratos que possuíam swertiajaponina, swertisina e ácido trans-aconítico em sua composição. A isovitexina, avaliada isoladamente, inibiu moderadamente a liberação de TNF- α (cerca de 40%), avaliada nas concentrações de 10, 30, 90 $\mu\text{g/mL}$ enquanto o ácido trans-aconítico inibiu em aproximadamente 75% a liberação do mediador inflamatório nas concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$.

Cardoso, Pereira & Lainetti (2005) avaliaram a atividade hipocolesterolemia do chá ("abafado") a 5% e a 2,5% de *E. grandiflorus* em camundongos. A administração do chá a 5% reduziu os níveis plasmáticos de colesterol total dos animais tratados com solução oleosa de colesterol a 2%. Além disso, este mesmo grupo estudou a atividade diurética do chá de folhas de *E. grandiflorus* a 5%, administrado a camundongos, sendo observado um aumento da diurese (CARDOSO, PEREIRA & LAINETTI, 2003).

O efeito hipotensor do extrato etanólico bruto de *E. grandiflorus* foi investigado em ratos espontaneamente hipertensos. A injeção intraperitoneal do extrato etanólico (300–1000 mg/kg) provocou redução na pressão arterial média, observando-se redução no débito cardíaco e na resistência vascular sistêmica. Segundo os autores, a ação anti-hipertensiva pode estar relacionada com a liberação de óxido nítrico (vasodilatador vascular) e com a estimulação de receptores das vias colinérgicas muscarínicas e do fator de ativação plaquetária (PAF), (LESSA et al., 2008).

Prando e colaboradores (2016) investigaram a ação diurética e anti-hipertensiva das frações solúveis em etanol (obtidas pela extração com água fervente e adição três volumes de etanol após resfriamento) de *E. grandiflorus* em ratos normotensos e com hipertensão renovascular. A administração oral diária da fração (300 mg/kg), durante 7 dias, aumentou significativamente a diurese, efeito observado após o segundo dia de tratamento. A administração do extrato etanólico nas doses de 100 e 300 mg/kg reduziu os níveis da pressão arterial média em $3,2 \pm 0,6$, e $11,0 \pm 1,1$ mm Hg, respectivamente. No artigo é discutido que a atividade anti-hipertensiva do extrato de *E. grandiflorus* é desencadeada pela ativação dos receptores de bradicinina e muscarínicos, alterando diretamente as etapas envolvidas na produção de óxido nítrico e prostaglandinas.

3.4. Fisiopatologia da artrite gotosa (AG)

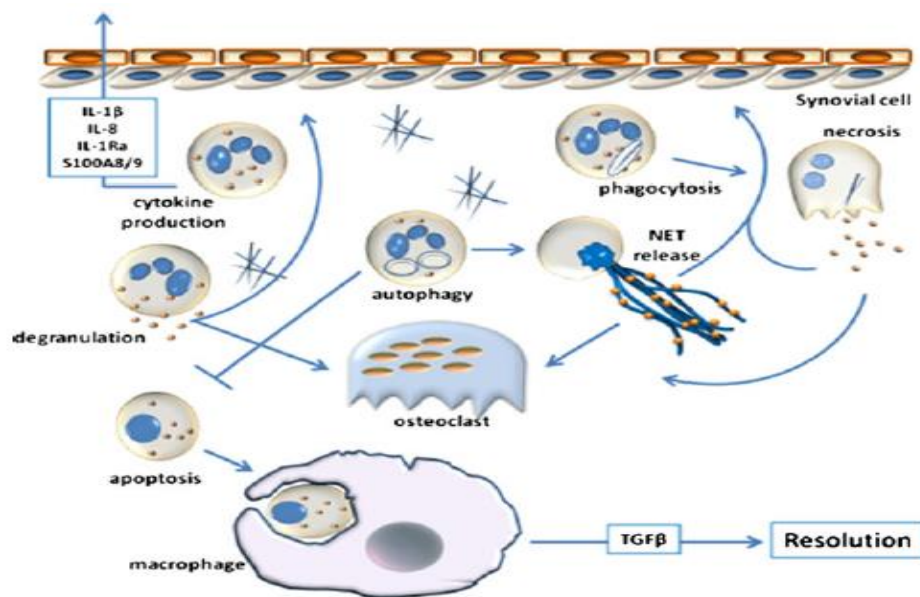
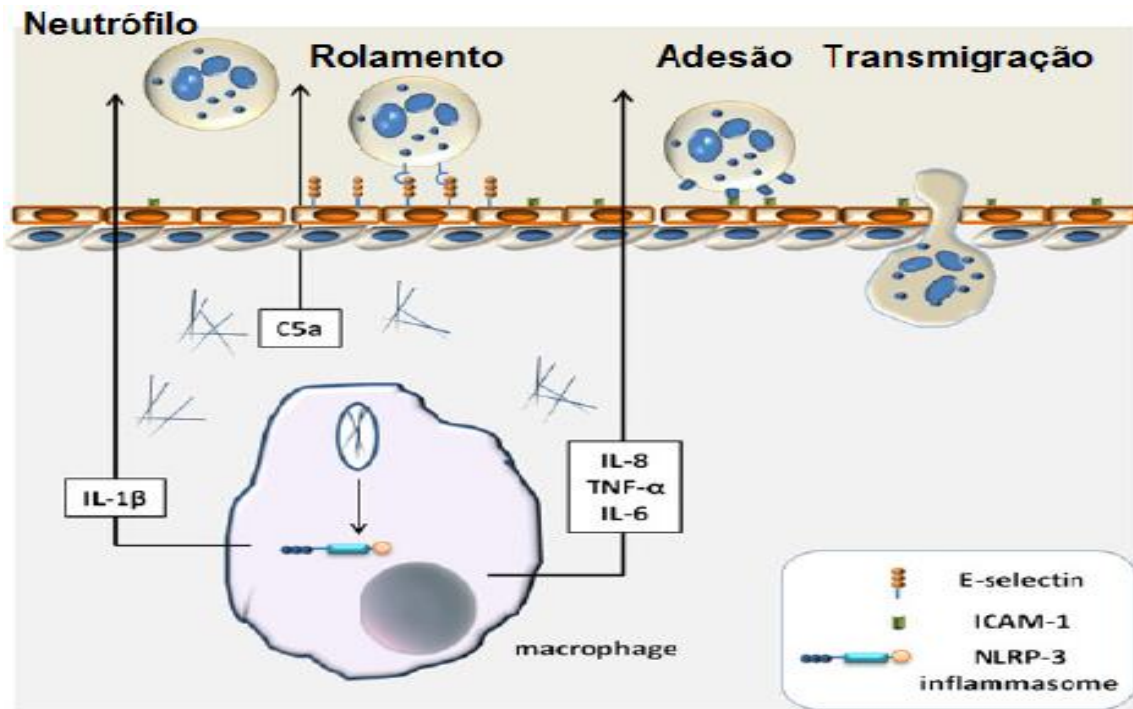
A artrite gotosa é uma doença inflamatória caracterizada por hiperuricemia, com quadros agudos de artrite, na presença de cristais de urato monossódico e infiltração de leucócitos no líquido sinovial, causando deformações nas articulações. O que pode afetar a qualidade de vida do paciente, (AZEVEDO et al., 2017, KUO, et al., 2015). Os episódios inflamatórios determinam em crises agudas e/ou crônicas, resultantes do nível de gravidade da doença. Segundo com KIM, Y. e colaboradores (2017) existem três fases principais da gota: i) hiperuricemia assintomática, ii) gota intercrítica e iii) gota tofácea crônica. O quadro agudo transcorre da reação inflamatória iniciada pela deposição dos cristais de urato de sódio (gerados pela degradação das purinas) no tecido articular, desencadeando episódios súbitos de dor intensa, sensibilidade, rubor, calor e tumefação nas articulações. As articulações mais afetadas são joelhos, tornozelos, pés, mãos, punhos e cotovelos. O ácido úrico é formado pela metabolização das purinas mediada pela xantina oxidase. Adenina e guanina (bases púricas) são assimiladas principalmente de uma dieta rica em

proteínas, consumo de bebidas alcoólicas e alimentos ricos em frutoses (KHANNA et al., 2012; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, KUO, et al., 2015, SINGH & KAUSHIK, 2017).

Mutações genéticas promovem, em última instância, mudanças no sistema enzimático alterando a produção e/ou a metabolização de ácido úrico. Entre as alterações mais frequentes, são: aumento da atividade da fosforribosil pirofosfato sintetases (PRPP) e a deficiência da hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT). A primeira está envolvida diretamente na síntese das purinas, enquanto a segunda aumenta o metabolismo de guanina e hipoxantina em ácido úrico (DIPIRO, 2009). Os pacientes com AG, apresentam níveis de ácido úrico superiores a 7 mg/dL e, conseqüentemente, os cristais de ácido úrico depositam-se no fluido articular, cartilagens, ossos, tendões e outros tecidos, causando inflamação no líquido sinovial (KHANNA et al., 2012; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA; KIM et al, 2017).

Durante o processo inflamatório da gota, linfócitos, monócitos, macrófagos e outras células inflamatórias liberam citocinas pró-inflamatórias, sendo as principais interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Essas citocinas atuam conjuntamente com outros mediadores em um sistema complexo induzindo reações inflamatórias em cadeias (JIANG et al., 2013). A interleucina-8 (IL-8) também tem um papel importante no processo via ativação da proteína G e fosfolipase C, estimulando o fluxo dos neutrófilos, para o sítio inflamado, local onde atuarão como agentes da inflamação aguda (RIDER & JORDAN, 2010). Neste processo ocorre a participação de NLRP3 (inflamassoma) com liberação de IL-1 β , que desempenha um papel importante na iniciação das crises dolorosas de AG. O inflamassoma atua sobre a enzima caspase, uma endoprotease capaz de regular e controlar a inflamação e a morte celular, e esta tem a capacidade de ativar a IL-1 β . Assim, a resposta inflamatória é intensificada pela ativação de neutrófilos e mastócitos induzindo a liberação de uma série de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros fatores tais como espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas e enzimas lisossômicas (PAIVA-OLIVEIRA, et al. 2012, DALBETH et al., 2016).

Figura 2: Esquema de Sinalização da Fisiopatologia da Artrite gotosa



O excesso dos cristais de ácido úrico pode promover a formação de cálculos renais, nos ureteres e na bexiga. Devido a presença desses cristais nas regiões do aparelho urinário, existe o risco de desenvolvimento de doenças renais como a nefrolitíase (CRUZ, 2006; MOUNT, 2013).

Adicionalmente, a AG pode estar associada com a síndrome metabólica, interferindo nos níveis de lipídeos, na glicemia e na pressão arterial. Como consequência, existe um aumento do risco do paciente desenvolver problemas cardíacos, o que demonstra a gravidade em potencial desta doença. Sua prevalência é maior em homens a partir dos 45 anos; a incidência aumenta com o envelhecimento e atinge em maior número a população negra (NOVAES, 2008; KIM, et al., 2017). O aumento da incidência da AG, nas mulheres, ocorre principalmente após o período da menopausa, isso porque, o estrógeno, que deixa de ser produzido, apresenta uma ação uricosúrica, ou seja, aumenta a excreção do ácido úrico (KUO, et al., 2015).

Para a Sociedade Brasileira de Reumatologia, o tratamento da gota consiste na associação da terapia farmacológica com uma dieta adequada, com o objetivo de aliviar a dor, minimizar as reações inflamatórias na fase aguda e prevenir e evitar lesões nas articulações. Com essa finalidade o tratamento da gota basicamente divide-se em duas etapas: manejo da crise aguda e na terapia de longo prazo. A primeira fase da terapia tem o objetivo de aliviar a dor, diminuir a inflamação e a incapacitação articular e para isso são usados agentes anti-inflamatórios. Já na segunda etapa visa a diminuição das concentrações séricas de ácido úrico, bem como, prevenir novas crises (AZEVEDO et al., 2017).

A colchicina é o fármaco usualmente empregado para reduzir o componente inflamatório da AG, promove redução da dor e alívio da tumefação. No entanto, este fármaco não atua sobre a concentração dos uratos. Sua principal atuação é na inibição da divisão celular pela sua ligação direta a tubulina e consequente inibição da polimerização dos microtúbulos que é uma etapa imprescindível envolvida no processo de mitose. No âmbito da gota, essa função interfere diretamente na atividade dos neutrófilos, impedindo a diapedese, a mobilização e a degranulação lisossomal, responsável por liberar substância pró-inflamatórias, agentes quimiotáticos de leucócitos. Além disso, a colchicina inibe a formação do inflamassoma NLRP3, complexo proteico importante para o processamento e a liberação de citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 induzidas por cristais de ácido úrico (AZEVEDO, et al., 2017; SINGH & KAUSHIK, 2017, KHANNA et al., 2012).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) diminuem a dor nos quadros de inflamação aguda. Essa classe age farmacologicamente na inibição das enzimas cicloxigenases (COX), que catalisam a transformação do ácido araquidônico derivado de fosfolipídios de membrana em prostaglandinas (agentes inflamatórios). Os AINES

podem ser não seletivos (ibuprofeno, indometacina e naproxeno), inibidores da COX do tipo 1 e 2, ou seletivo, para COX-1 (aspirina) ou para a COX-2 (celecoxib). Os principais efeitos adversos relacionados com o uso dos AINES são danos gastrointestinais, como ulceração, sangramentos e perfuração, (AZEVEDO et al., 2017, GOODMAN & GILMAN, 2005).

Os esteróides são medicamentos anti-inflamatórios potentes, porém sua administração deve ser realizada com precaução, devido aos graves efeitos colaterais (KIM et al., 2017). Apesar deles apresentarem diversos efeitos positivos na supressão da resposta inflamatória, tais como a inibição da resposta imune e da síntese das prostaglandinas e citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α).

Uma outra possibilidade de terapia engloba o uso de antagonistas do receptor de IL-1 β , como por exemplo o anakinra que é uma proteína recombinante não glicosilada que apresenta uma alteração em relação a IL-1 β , pela adição de uma metionina terminal na cadeia de aminoácidos. Porém este tratamento é de alto custo, e o fármaco ainda não é licenciado na maioria dos países (AZEVEDO, et al., 2017; SINGH & KAUSHIK, 2017, KHANNA et al., 2012). Outros exemplos de antagonista do receptor de IL-1 β são: canakinumabe e rilonacepte, todos biológicos. Dessa classe o canakinumabe é liberado pela *European Medicines Agency* (EMA); e pelo FDA, *Food and Drug Administration* (EUA). A situação desses medicamentos no Brasil, ainda não foi deliberada (AZEVEDO, et al., 2017).

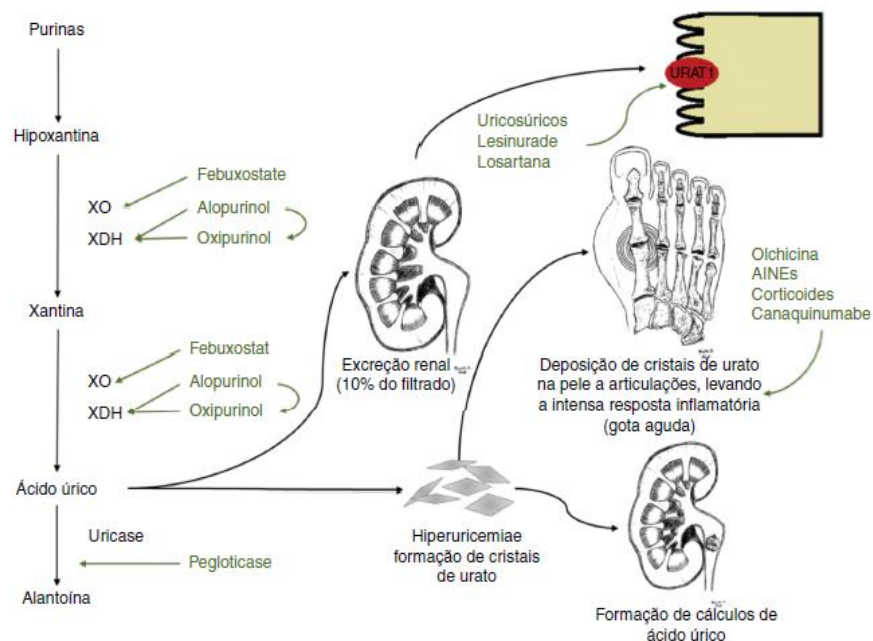
Os inibidores da xantina oxidase são drogas que diminuem a concentração de uratos por meio da inibição de sua síntese. Os fármacos capazes de inibir essa enzima são o alopurinol e o febuxostato. O primeiro é conceituado como de primeira linha na redução de urato, por ser considerado uma opção terapêutica eficaz. Dentre dos efeitos colaterais descritos estão, erupção cutânea, eosinofilia, hepatite e insuficiência renal. O febuxostato é empregado em caso de falha ou impossibilidade do uso de alopurinol, porém seu uso é limitado devido ao seu custo (AZEVEDO, et al., 2017; KHANNA et al., 2012, KUO, et al. 2015, SINGH & KAUSHIK, 2017).

Já os agentes uricosúricos, como a probenecida, tem como mecanismo de ação, o aumento da excreção renal de ácido úrico, via inibição dos transportadores de ânions no túbulo contorcido proximal (URAT1), que são responsáveis pela reabsorção de urato. A principal limitação do uso desses fármacos está ligada ao aumento da concentração de ácido úrico nos ductos coletores renais e conseqüente predisposição para formação de cálculos renais (AZEVEDO et al., 2017).

No caso do tratamento da gota aguda, presente em diversas articulações e com dor intensa, a terapia combinada é aconselhada. O uso concomitante de AINEs, colchicina e/ou prednisolona podem promover uma resolução mais rápida da inflamação (TERKELTAUB et al., 2009). Uma alternativa como terapia farmacológica é o emprego de fármacos como os bloqueadores de canais cálcio e antagonistas do receptor de angiotensina; como losartana. Pois ambos têm a propriedade de diminuir o risco de incidência da gota, por conseguirem aumentar a excreção do ácido úrico (HAINER et al., 2014, AZEVEDO, et al. 2017). Vale frisar que a farmacoterapia com o losartana, para o tratamento da AG deve ser realizado com cautela nos pacientes normotensos, com intuito de controlar a ação hipotensora deste .

A escolha da terapia é baseada nos sinais e sintomas do paciente e necessita de modificações periódicas. Um parâmetro importante para escolha do melhor esquema terapêutico consiste em avaliar o histórico do paciente (hipertensão, diabetes mellitus tipo II, obesidade, ingestão excessiva de álcool, fatores dietéticos, presença de urolitíase ou uso de medicamentos que elevem o urato sérico). A educação sobre a terapia alimentar e melhorias nos hábitos de vida devem ser feitas, principalmente para os pacientes com dor crônica (KHANNA et al., 2012).

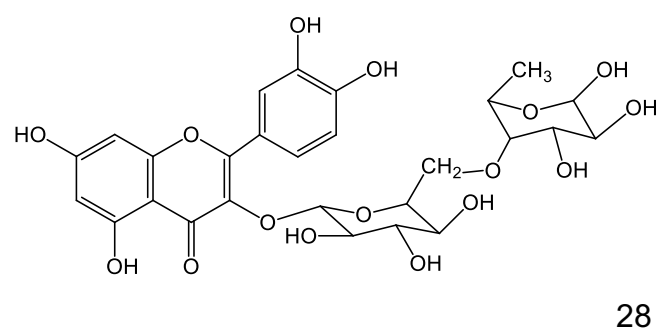
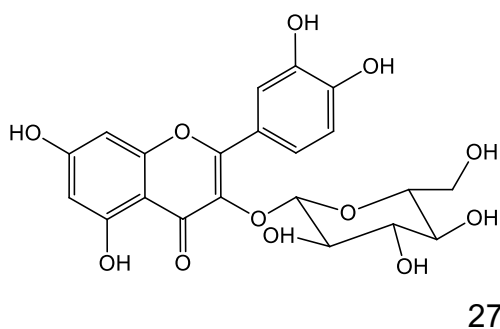
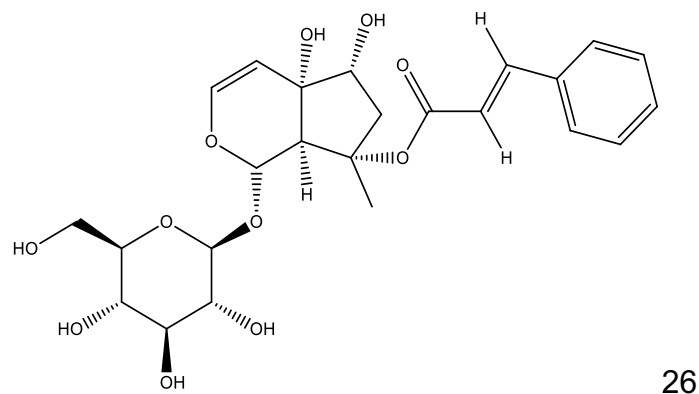
Figura 3: Medicamentos e suas vias de ação do tratamento da gota

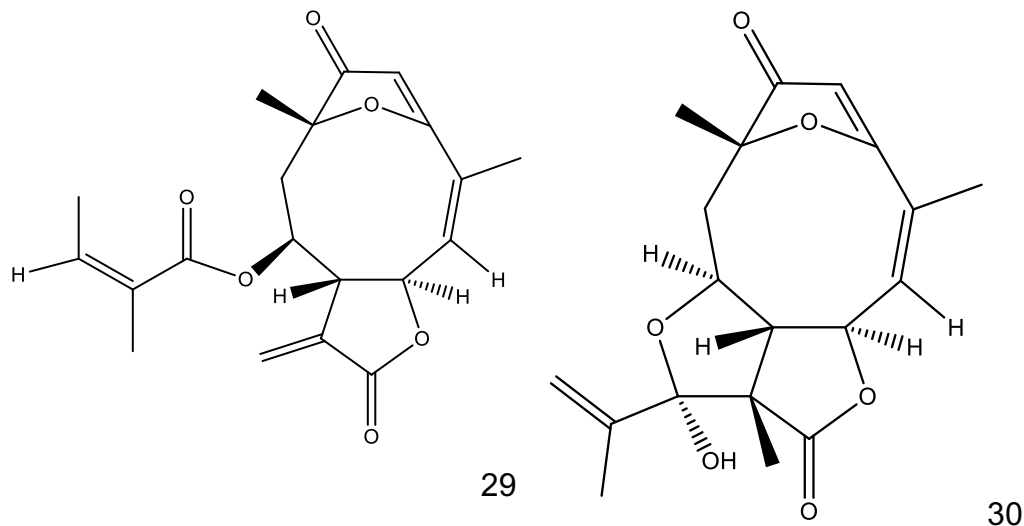


Fonte: Azevedo et al., 2017

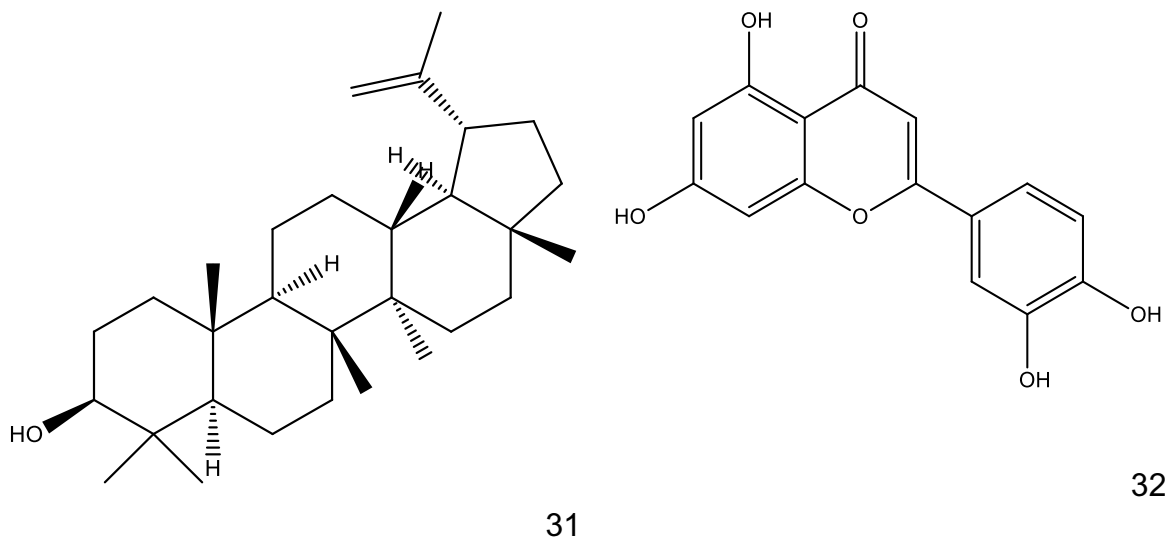
3.5. Atividade antiartrítica gotosa de extratos, frações e produtos naturais derivados de plantas

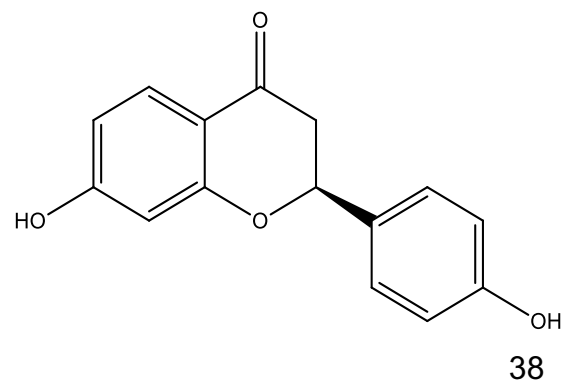
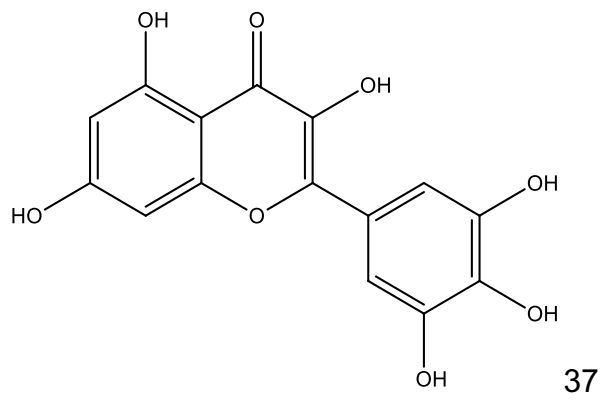
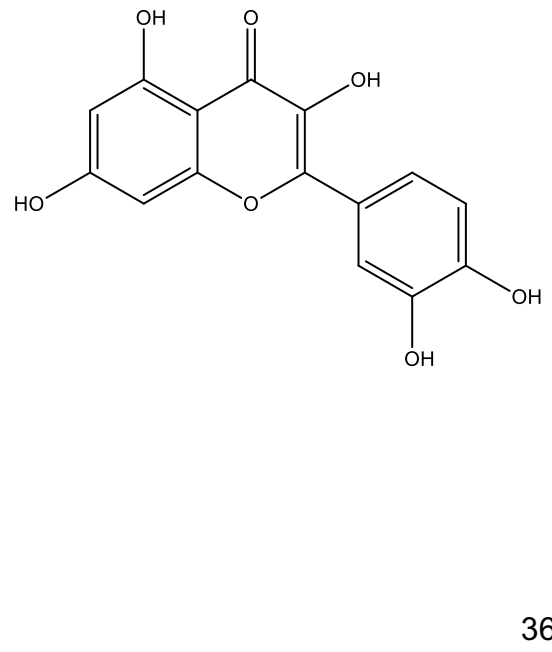
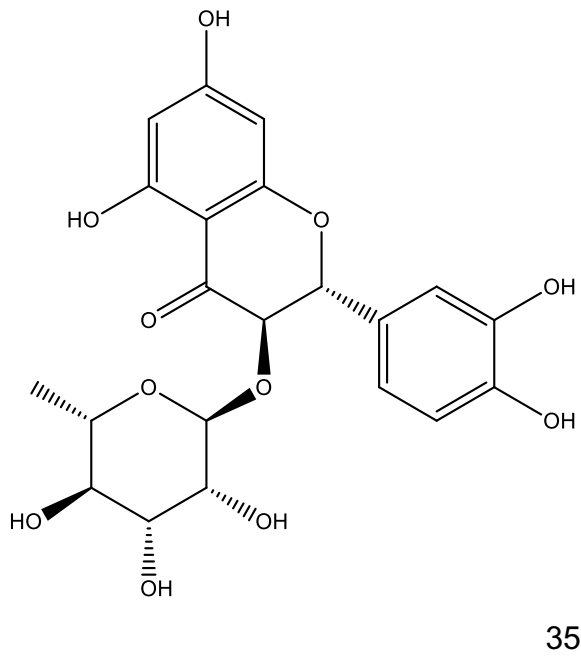
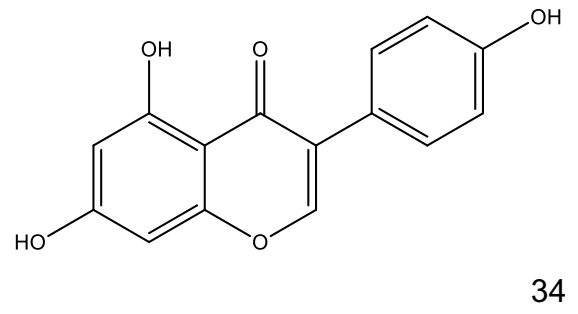
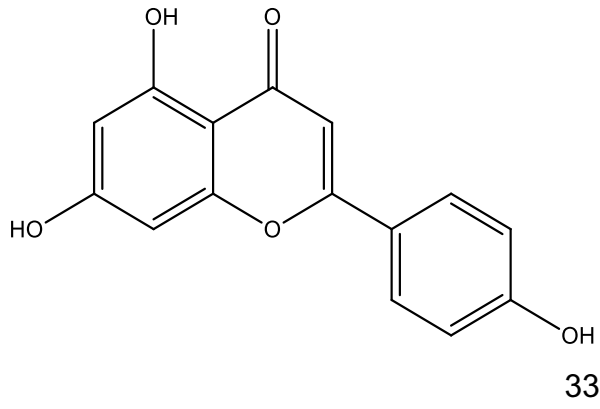
Corp e Pendry (2013) apresentaram, em um trabalho de revisão, uma lista de mais de 100 espécies de plantas medicinais utilizadas no tratamento dos quadros de artrite crônica e aguda na medicina popular. Destacam-se as espécies *Apium graveolens* L. (salsão), *Urtica dioica* L. (urtiga), *Harpagophytum procumbens* (Bunch) D. C. ex Meisn (garra-do-diabo), *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (ulmeira) e *Salix* spp. (salgueiro). O *Harpagophytum procumbens* (garra-do-diabo) apresenta como seu principal constituinte um monoterpene do tipo iridoide, o harpagosídeo (**26**). INABA e colaboradores (2010) notificaram que o extrato etanólico das raízes de *H. procumbens*, bem como o harpagosídeo (**26**), reduziram *in vitro* os níveis de TNF α , IL-6 e IL-1 β em macrófagos de camundongos estimulados por LPS. Já a urtiga, apresentou ação diurética, auxiliando na eliminação de ácido úrico, e conseqüentemente reduzindo a concentração sérica deste. Provavelmente esta propriedade está relacionada com os flavonoides isoquercetina (**27**) e rutina (**28**), encontrados nas folhas e nas partes aéreas floridas da urtiga (WEGENER, 2011, HALDER & SHARMA, 2017; DEWICK, 2009; CORP & PENDRY, 2013).

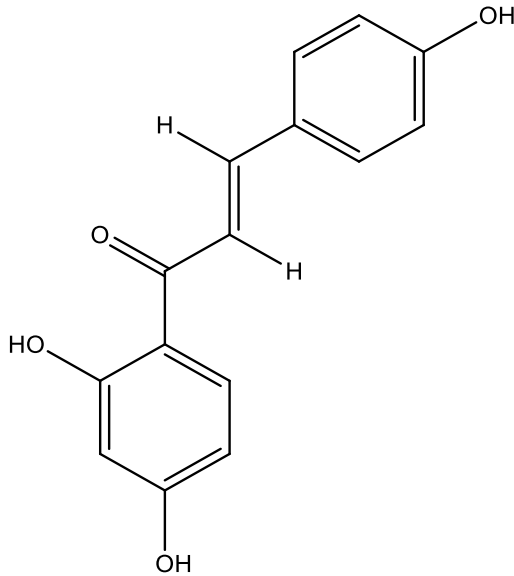




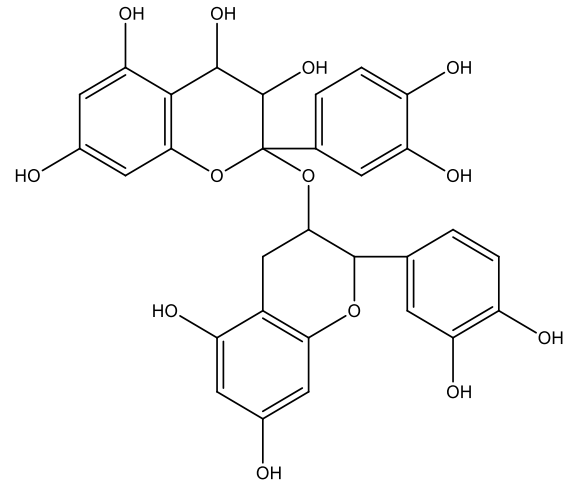
SOUZA e colaboradores (2012) relataram que o extrato etanólico bruto (125 e 250 mg/kg) e a fração de acetato de etila (62,5 e 125 mg/Kg) das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa* Spreng, popularmente conhecida como “arnica campestre”, apresentou atividade anti-hiperuricêmica pela ação sobre a enzima hepática xantina oxidase em camundongos, bem como atividade anti-inflamatória em ensaio de edema de pata. Acredita-se que a ação anti-inflamatória da arnica campestre ocorra por sinergismos entre os seguintes metabolitos secundários: as lactonas sesquiterpênicas (licnofolídeo **(29)** e eremantolídeo C **(30)**), o fitoesteroide β -sitosterol **(8)**, o triterpeno lupeol **(31)** e os flavonoides luteolina **(32)** e apigenina **(33)**. Esses constituintes químicos podem atuar na inibição da migração de neutrófilos e das citocinas envolvidas no processo inflamatório agudo, sendo uma possível opção para o tratamento da AG.







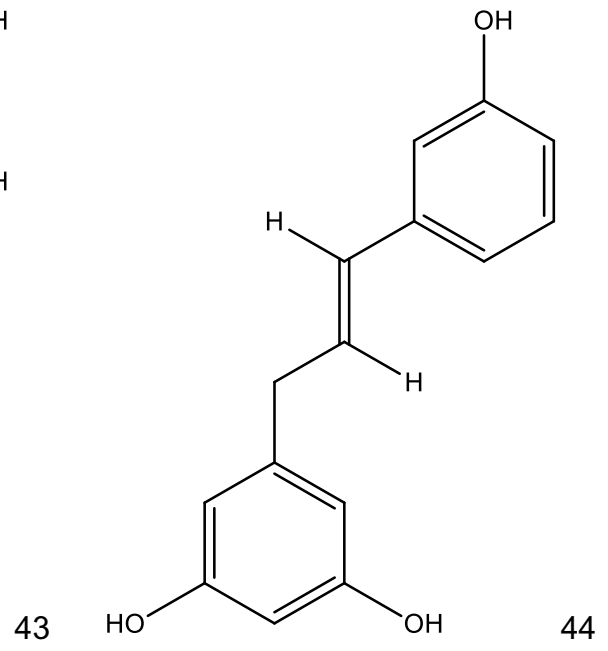
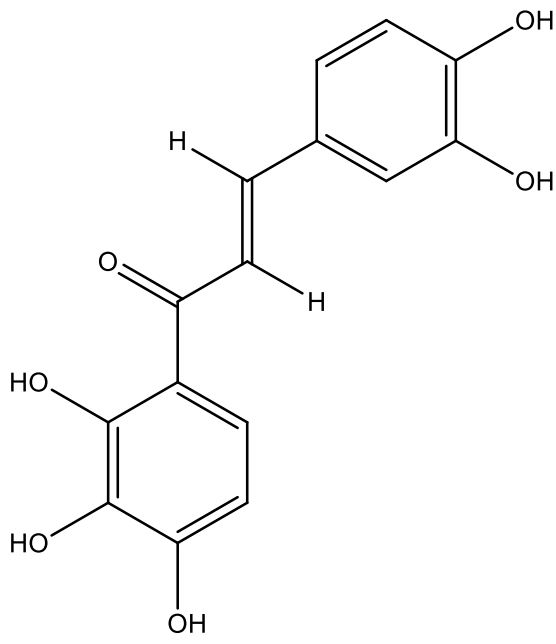
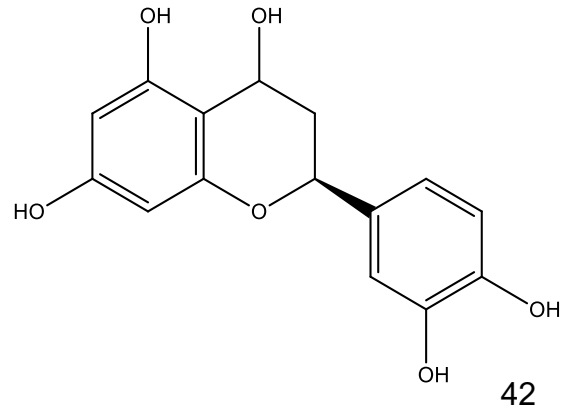
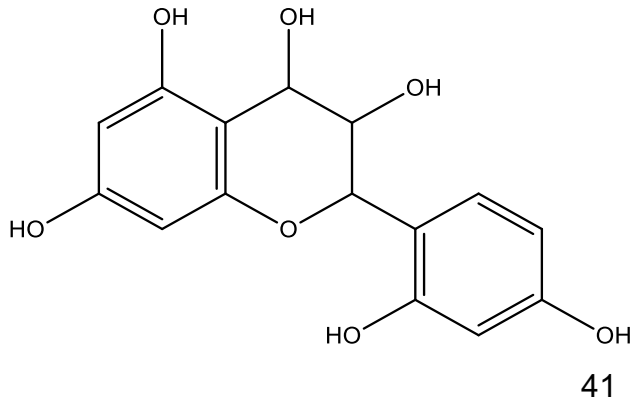
39

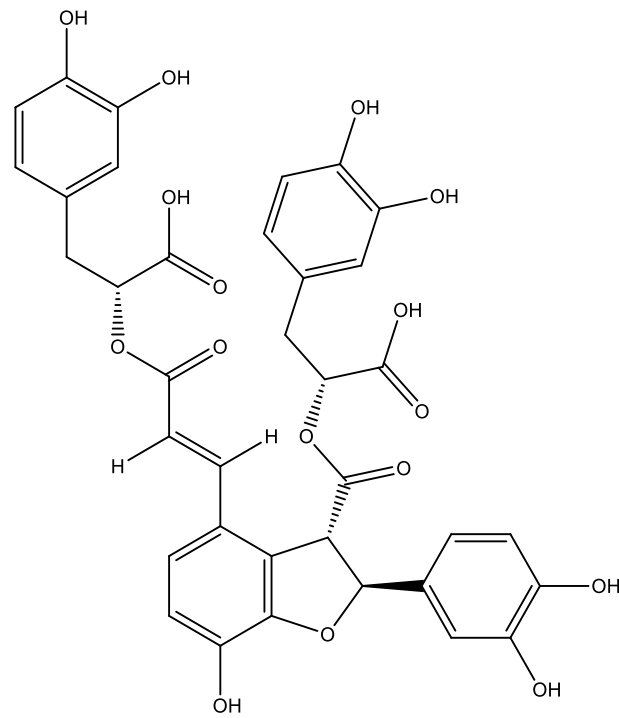


40

Existem vários relatos na literatura de produtos naturais de plantas, que na forma isolada, apresentam atividade antigota. Estão incluídos diversos flavonoides como genisteína (**34**), astilbina (**35**), apigenina (**33**), quercetina (**36**), miricetina (**37**), liquiritigenina (**38**), isoliquiritigenina (**39**), rutina (**28**), procianidina (**40**) e luteolina (**32**) que apresentam atividade antigota. Esses compostos foram avaliados em estudos *in vitro* e/ou *in vivo* e apresentaram ação inibitória da enzima XO. (CHEN et al., 2011; CIMANGA et al., 1999; HUANG et al., 2011; ZHU, et al., 2004, MURUGAIYAH & CHAN, 2009).

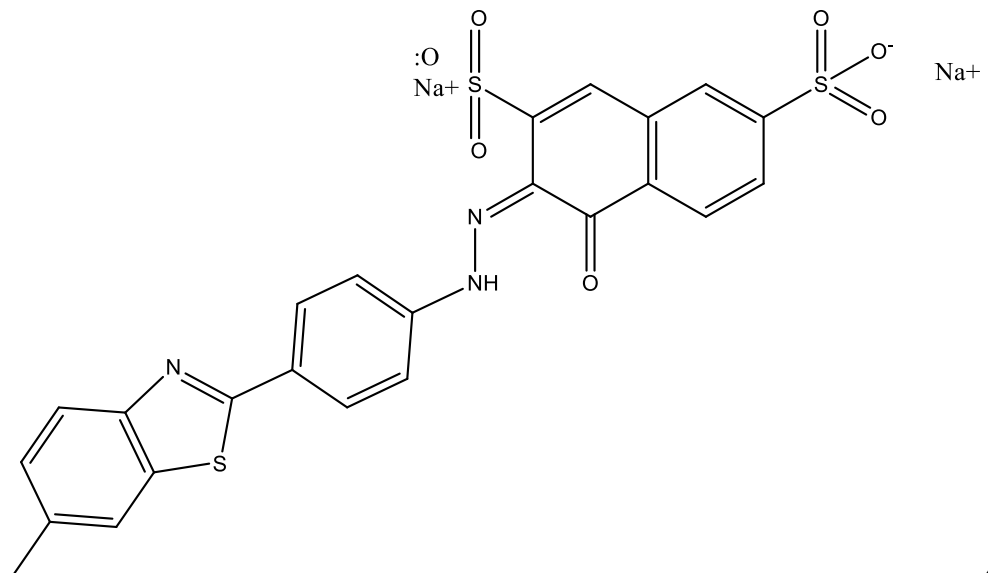
Morina (**41**), rutina (**28**) e quercetina (**36**) apresentaram tanto atividade inibidora de XO quanto ação uricosúrica (SHI et al., 2012). Já a luteolina (**32**) e apigenina (**33**) apresentam efeito anti-inflamatório (SOUZA et al., 2012). Os compostos fenólicos da espécie *Populus nigra* L, tais como eriodictiol (**42**), okanina (**43**), ácido caféico (**12**) e resveratrol (**44**) são inibidores da enzima XO (BOUMERFEG et al., 2009; CHEN et al., 2011; HAVLIK et al., 2010; NGUYEN et al., 2004; OWEN & JOHNS, 1999). O resveratrol (**44**) e o ácido lithospérmico (**45**) apresentam tanto a atividade inibitória de XO como efeitos anti-inflamatórios, na redução de fatores inflamatórios, tais como NOS, e a COX-2 (AGGARWAL et al., 2004; LIU et al., 2008; AGGARWAL et al., 2006; ORALLO et al., 2004).



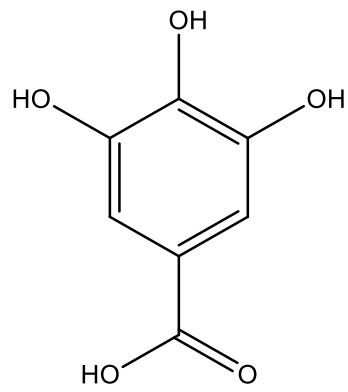
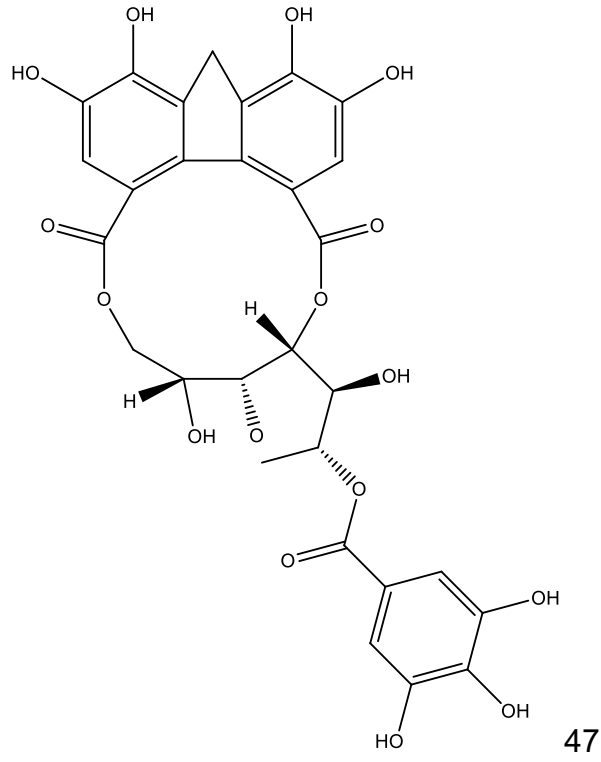


45

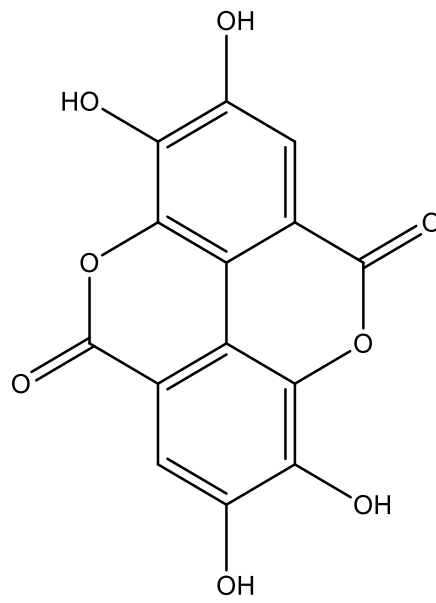
Taninos como geranina (**46**), corilagina (**47**) e ácido gálico (**48**) mostram efeitos uricosúricos, enquanto o ácido elágico (**49**) é um inibidor de XO (HOU et al., 2012; VIVOT et al., 2001; WU et al., 2010).



46

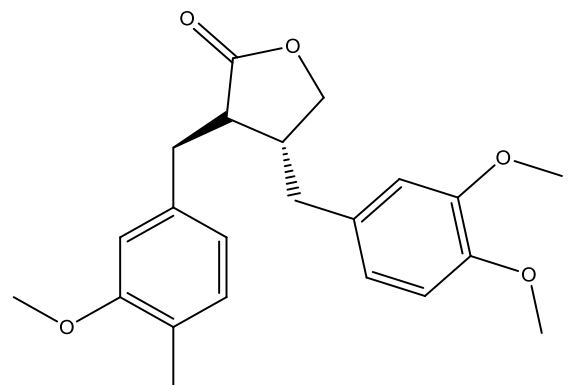
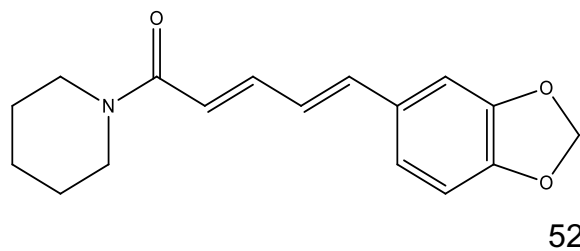
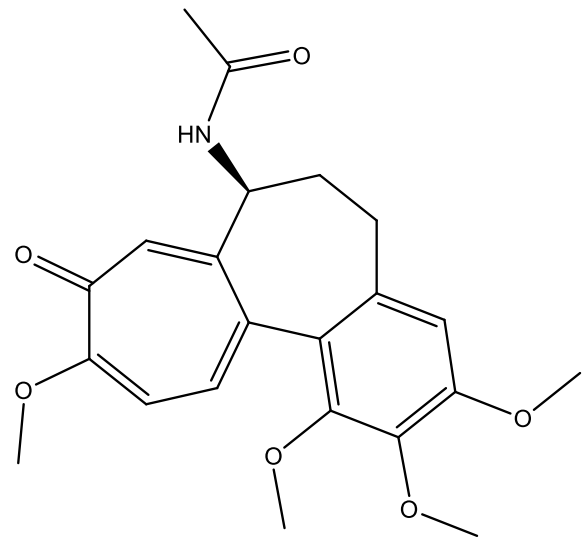
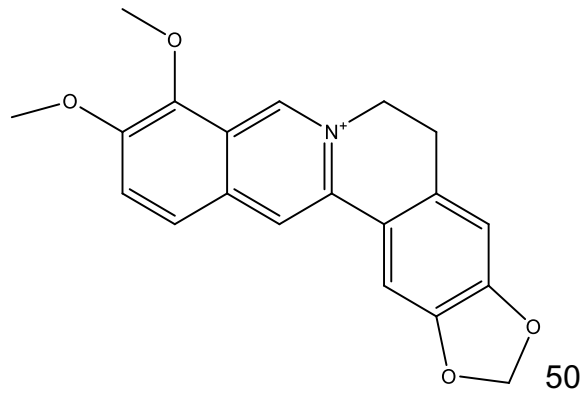


48

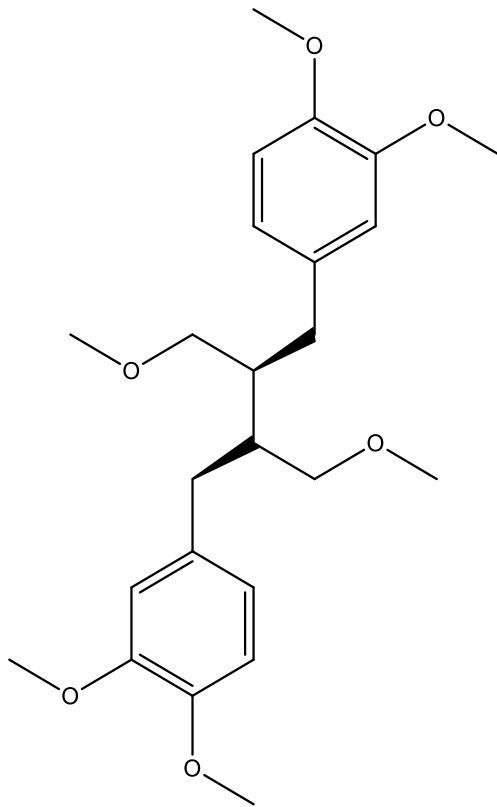


49

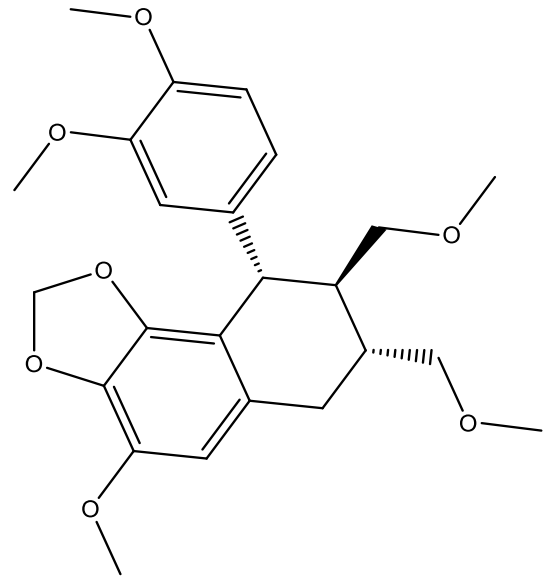
Na classe dos alcaloides, a berberina (**50**) apresenta ação inibidora de XO (KONG et al., 2004), enquanto a colchicina (**51**) e piperina (**52**) tem efeitos anti-inflamatórios (AHERN et al., 1987; SABINA, NAGAR & RASOOL, 2011).



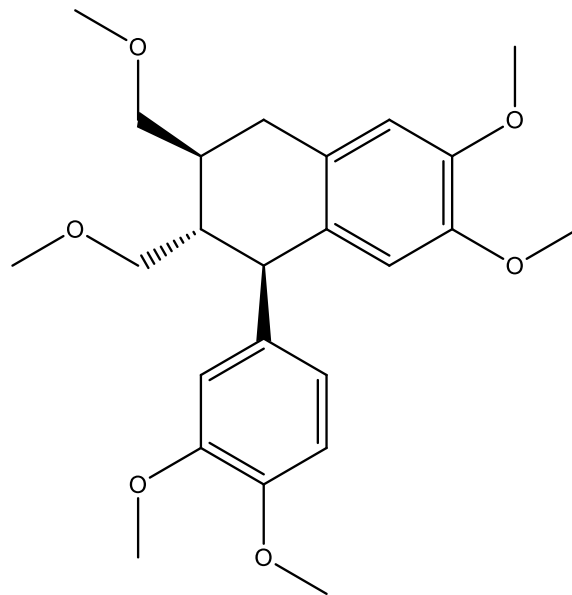
As lignanas exercem atividades anti-inflamatórias via inibição da via iNOS, como a arctigenina (**53**) e outras três lignanas (filantina (**54**), hipophyllanthina (**55**) e a philtetralina (**56**) possui tanto ação inibidora de XO quanto efeitos uricosúricos. Já os triterpenos, como o lupeol (**31**), apresentam efeitos anti-inflamatórios (KOU, et al., 2009; MURUGAIYAH & CHAN, 2009; SOUZA et al., 2012).



54



55



56

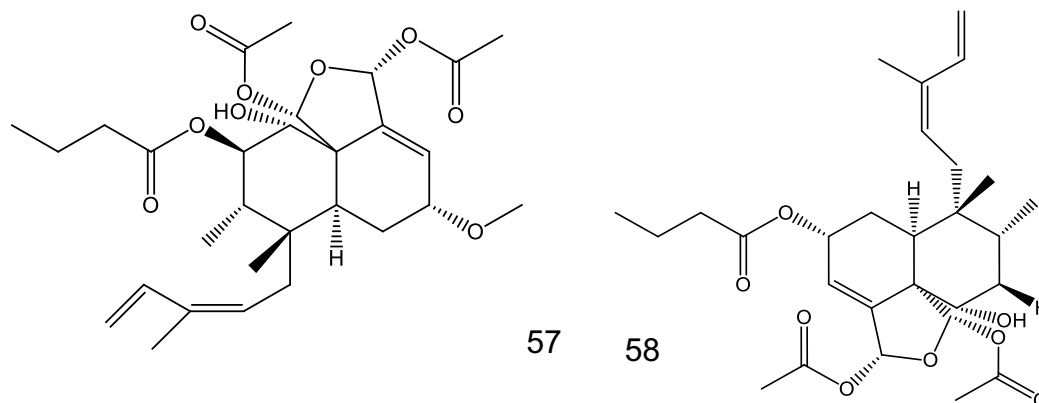
Em síntese, nos estudos *in vitro*, flavonoides, alcaloides, óleos essenciais, compostos fenólicos, taninos e cumarinas apresentam ação inibidora da xantina oxidase (XO), enquanto lignanas, triterpenóides e xantofilas atuam a partir dos seus efeitos anti-inflamatórios. Já em estudos *in vivo*, óleos essenciais, lignanas,

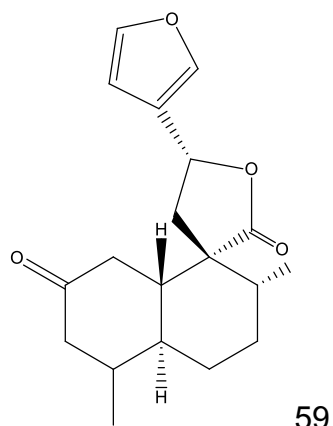
flavonoides e taninos mostram efeitos duplos, promovendo a redução da produção de ácido úrico e da inflamação.

3.6. Atividade anti-inflamatória de constituintes de média e baixa polaridade de plantas

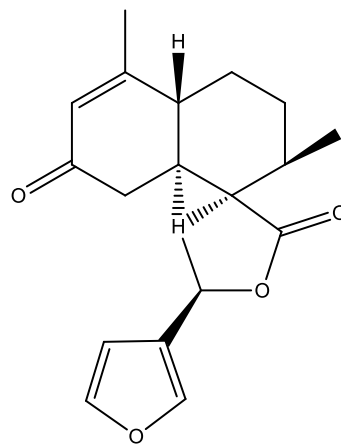
3.6.1. Diterpenos: aplicação no tratamento da artrite gotosa

Os diterpenos são compostos terpenóides particularmente abundantes nas famílias Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae e Salicaceae, entre outras. A classificação dessa classe química é definida de acordo com o anel presente na sua estrutura. Existe os diterpenos lineares, e os cíclico, entre os diterpenos bicíclicos destacam-se os clerodânicos e os labdânicos. Os diterpenos podem modular vias de sinalização celular envolvidas na resposta inflamatória crítica do corpo, tais como a ativação de Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta (NF-κB), um importante regulador de genes relacionados com a resposta inflamatória e imunológica (GIANG et al., 2003, HERAS & HORTELANO, 2009, KIM, et al., 2013, LI, et al., 2015). Portanto, algumas espécies apresentam atividade anti-inflamatória devido a presença dessa classe química. Da espécie *Casearia sylvestris* Swart, conhecida como guassatonga, foram isolados os diterpenos clerodânicos, casearina (**57**) e caseargrewiina (**58**). Esses diterpenos apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante à indometacina (10mg/Kg), quando avaliados nas doses de 0,5; 2,5 e 5,0mg/Kg em modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos (PIERRI, 2013). A espécie *Croton cajucara* Benth exibe atividade anti-inflamatória, relacionada à presença dos diterpenos trans-crotonina (**59**) e trans-desidrocrotonina (**60**). Essas substâncias, avaliadas na dose de 50 mg/kg, inibiram de forma significativa o edema induzido por carragenina em pata de rato 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do estímulo inflamatório, resultando em uma inibição máxima de 54,4%, 2 horas após a injeção de carragenina.



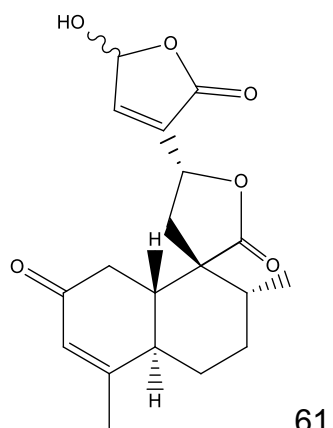


59

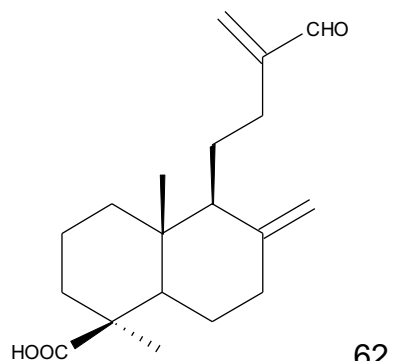


60

O cajucarinolídeo (**61**) induziu a inibição *in vitro* da fosfolipase A2 (PLA2) enzima essencial para a produção do ácido araquidônico, conseqüentemente interfere na biossíntese de mediadores inflamatórios lipídicos (ICHIHARA et al., 1992). Kim e colaboradores (2013) isolaram um diterpeno labdânico da *Thuya orientalis* (L) ENDL o ácido 15-nor-14-oxolabda-8(17),13(16)-dien-19-oico (**62**) e outros 6 diterpenos, com atividade anti-inflamatória a partir do fracionamento do extratos metanólicos das folhas, em frações sucessivas de acetato de etila e n-butanol.



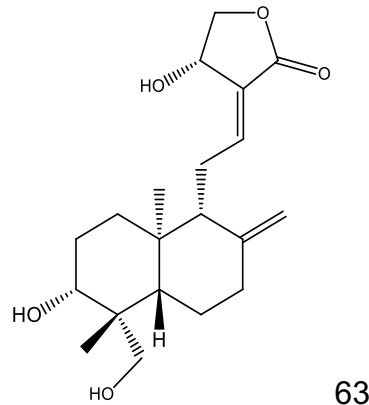
61



62

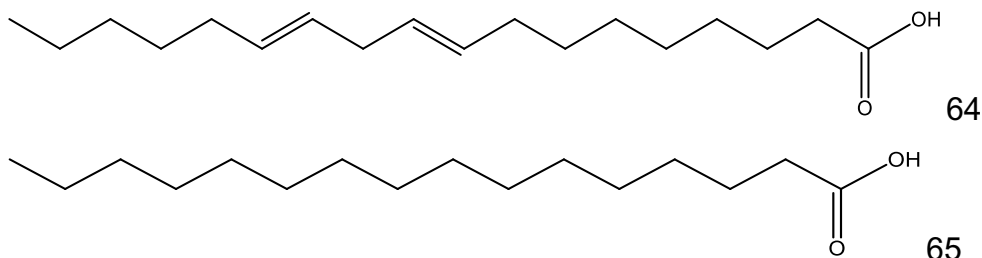
Este diterpeno mostrou-se potente entre os compostos isolados para a inibição de produção de NO induzida por LPS (IC_{50} 1: 3.56 mM). Além disso, este composto foi capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios e realizar a supressão da expressão das enzimas inflamatórias iNOS e COX-2. Uma outra possibilidade de mecanismo desse derivado consiste na atenuação da atividade transcricional induzida por LPS via rota NF- κ B. Assim este estudo demonstrou que os diterpenos labdânicos presentes na *Thuya orientalis* (L) ENDL apresentam atividade anti-inflamatórias pela supressão da atividade NF- κ B e fosforilação da ERK. Portanto

foi comprovada a utilização dessa espécie na medicina popular para tratamento de doenças como a gota e dermatites. De uma maneira geral, os diterpenos labdânicos conseguem modular a rota do NF- κ B, por isso podem ser utilizados na terapia anti-inflamatória. Um outro exemplo, dessa classe de diterpenos com propriedade anti-inflamatória é o andrografolideo (**63**), isolado da *Andrographis paniculata* Wall (TRAN; WONG; CHAI, 2017).



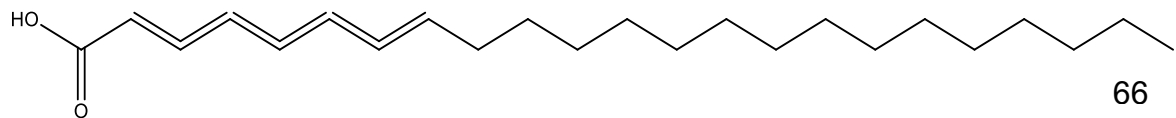
3.6.2. Ácidos graxos com atividade anti-inflamatória

Rotimi; Rotimi; Obembe (2014) realizaram estudos *in silico* com ácidos graxos isolados de *Cucurbita pepo* L. e demonstraram que o ácido 9-12 octadecadienoico (ácido linoleico) (**64**) liga-se diretamente à molécula do NF- κ B. Os autores sugerem que esse ácido graxo inibe a ativação de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α que controlam a cascata do processo inflamatório. O ácido hexadecanóico/ácido palmítico (**65**), um ácido graxo saturado, liga-se ativamente a enzima fosfolipase A2 (PLA2) o que o torna um possível composto com efeito anti-inflamatório (APARNA, et al., 2012).

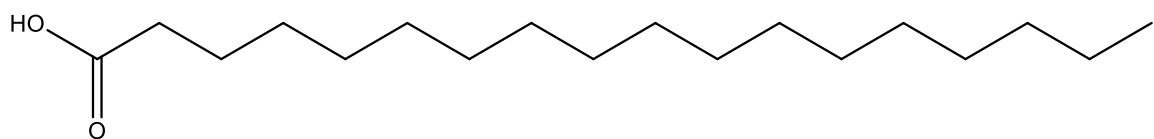
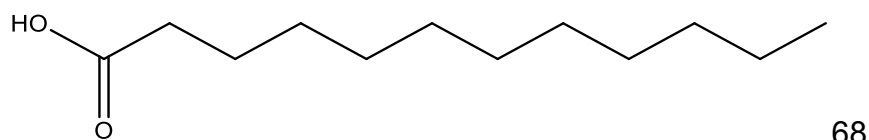
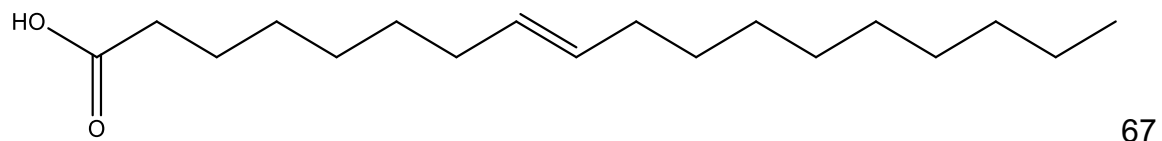


Os inibidores da PLA2 podem atuar como agente anti-inflamatórios, pois essa enzima libera o ácido araquidônico das membranas celulares, e este é responsável pela síntese de mediadores lipídicos que são relacionados com a resposta

inflamatória, como prostaglandinas e os leucotrienos (ALMEIDA, et al., 2013). Ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico, ácido α -linoleico e o ácido docosahexaenóico, apresentaram propriedades anti-inflamatórias, em resposta ao estímulo de LPS, no modelo utilizando células monocíticas humanas THP1, via a inibição da expressão dos genes das seguintes citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α (ZHAO G., et al., 2005, SNODGRASS, et al., 2016). Segundo Olson e colaboradores (2013), o ácido docosahexaenóico (**66**), inibe o fator nuclear κ B (NF- κ B) e conseqüentemente interfere na ativação do receptor do tipo Toll 4 (TLR4), diminuindo a produção das citocinas inflamatórias.



Segundo Hamdi, e colaboradores (2018), o extrato de éter de petróleo das folhas da *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) Juss. é rico em ácidos graxos, e estes constituintes tem potencial anti-inflamatório e analgésico. Destacam-se o ácido α -linoleico (**64**), ácido palmítico (**65**), ácido oleico (**67**), ácido láurico (**68**), ácido esteárico (**69**), entre outros. O ácido γ -linoleico inibe a ciclooxigenase 2, diminui a produção de óxido nítrico e da interleucina IL-1 β . Neste trabalho, o efeito analgésico e anti-inflamatório observado, é creditado a alta concentração do ácido palmítico (**65**) presente no extrato. De uma forma geral, os ácidos graxos podem atuar, sinergicamente ou isoladamente.



Já os ácidos graxos de cadeia curta, obtidos a partir de fermentação bacteriana, como o acetato, propionato e o butirato, podem trazer benefícios no tratamento de doenças inflamatórias. Estudos demonstraram que não somente reduzem a produção de fatores pró-inflamatórios incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO, mas também estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, (LIU, et al., 2012).

De acordo com a revisão bibliográfica feita por SCHMEDA-HIRSCHMANN e colaboradores (2014); os ácidos graxos de animais da Amazônia Peruana apresentaram efeito anti-inflamatório. O efeito anti-inflamatório tópico e oral do óleo de *Crocodylus niloticus* foi evidenciado pela redução do edema em 60,8% três horas após administração oral e 57,5% doze horas após administração tópica. No artigo discutiu-se sobre a relação direta da atividade anti-inflamatória com a inibição da PLA2, COX1 e COX2; e a inibição das citocinas envolvidas no processo IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α , as quais em excesso desencadeiam o surgimento de doenças inflamatórias crônicas.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Equipamentos

- Balança analítica Mettler, modelo AB 204;
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000;
- Banho de ultra-som Unique, modelo USC 1400;
- Banho de ultra-som Thornton, modelo T 50;
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786);
- Centrifuga Microprocessada QUIMIS®;
- CLUE Acquity; Waters (Modelo Class), Detector- PDA $\epsilon\lambda$; Sample manager (FTN); Quaternary solvent manager;
- GC-MS-QP2010 ULTRA (Shimadzu) - Departamento Química UFMG;
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95;
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética 200 MHz - (Departamento de Química, ICEX, UFMG);
- Espectrômetro de infravermelho FT-IR Perk-(Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR);
- Purificador de água Milli-Q Plus;
- Lâmpada UV para cromatografia Spectroline, modelo 977 C (254 e 365 nm);
- Liofilizador Thermo, modelo Savant Modulyo D Freeze Dryer-115 com capacidade para 69 L;
- Micropipetas Peguepet, vol. ajustável de 10 - 100 μL e 100 - 1000 μL ;
- Moinho de facas Marconi, modelo MA680.

4.1.2 Solventes e reagentes

- Solventes grau CLAE: acetonitrila e metanol - Tedia;
- Solventes grau P.A: *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol - Neon;
- Ácidos grau P.A: acético glacial, ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido fosfórico - Merck;
- Álcool etílico comercial - Minálcool;
- Carvão ativado pó - Synth;
- Terra diatomácea (Celite);
- Sílica gel G60 - Macherey-Nagel (CCD);
- Sílica flash gel 60, 230-400 mesh, 0,04-0,063 mm - Macherey-Nagel.

4.1.3. Substância de Referência

- Andrografolídeo-Sigma-Aldrich (EUA)

4.1.4. Vidrarias e materiais diversos

- Microtubo plástico de 2 mL do tipo safe-lock, Eppendorf;
- Borrifador de vidro;
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex;
- Colunas cromatográficas de vidro de dimensões variadas;
- Acquity CLUE[®] BEH C18 1.7 μm ; 2.1 x 50 mm column - Ultra performance LC;
- Lichrocart[®] 250-4, RP 18e (5 μm) Cartridge;
- Coluna: Rxi-1MS 30m x 0,25mm x 0,25 μm (Restek);
- Cromatoplasmas de vidro para CCD, 5x10; 10x10 cm;
- Frascos de penicilina;
- Funil sinterizado nº 3, 30 mL;
- Papel indicador de pH Universal, 0 - 14 – Merck;
- Percoladores de aço;

- Ponteiras de plástico (10, 100, 1000 µL) – Corning;
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para injetor automático em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

4.1.5. Revelador utilizado na cromatografia em camada delgada de sílica (CCD) - (WAGNER & BLADT; 1993)

- Revelador Anisaldeído sulfúrico:

Para o preparo do revelador foi adicionado lentamente sob banho de gelo 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85 mL metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem.

4.1.6. Material vegetal

Para realização do presente estudo foram utilizadas as partes aéreas de *E. grandiflorus*, adquiridas de fonte comercial (Laboratório Catedral), no mês de maio de 2013, contendo o certificado de análise e de autenticidade. A droga vegetal foi obtida pulverizada e armazenada em um recipiente hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e calor.

4.2. Obtenção dos derivados vegetais das partes aéreas de *E. grandiflorus*

4.2.1. Extrato etanólico

O extrato etanólico utilizado no presente trabalho foi produzido a partir da percolação exaustiva da droga vegetal empregando etanol comercial à 96° GL. As percolações foram realizadas em triplicata usando diferentes massas de droga vegetal conforme descrito na tabela 1. Posteriormente, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. Os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, até sua completa secagem.

Tabela 1: Rendimento do extrato etanólico 96° GL obtido por percolação das partes aéreas da *E. grandiflorus*

Massa de droga vegetal utilizada (g)	Massa obtida do extrato (g)	Rendimento (% m/m)
100	12,27	12,27
300	39,5	13,17
304	29,21	9,6

4.2.2. Extrato diclorometânico obtido por maceração (enriquecidos em compostos de média e baixa polaridade)

O extrato diclorometânico utilizado no presente trabalho foi obtido pela extração a partir de 10 g da droga vegetal com 100 mL de diclorometano por 3 horas. Após a filtração em papel de filtro, o processo extrativo foi repetido duas vezes totalizando 300 mL do solvente extrator que foi eliminado em evaporador rotatório, sem aplicar a pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. Os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, até sua completa secagem. A massa do extrato resultante da maceração bem como o rendimento dela está descrito na tabela 2.

Tabela 2: Rendimento do extrato diclorometânico obtido por maceração das partes aéreas *E. grandiflorus*

Massa de droga vegetal utilizada (g)	Tipo de extração	Massa obtida do extrato (mg)	Rendimento (m/m %)
10	Maceração	109	1,090

4.2.3. Extratos obtidos com diferentes proporções de acetato de etila:diclorometano (enriquecido em compostos de média e baixa polaridade)

Os extratos acetato de etila:diclorometano utilizados no presente trabalho foram obtidos pela extração a partir de 10 g da droga vegetal com 100 mL de diferentes proporções dos solventes extratores por 3 horas (tabela 3). Após a filtração em papel de filtro, o processo extrativo foi repetido duas vezes totalizando 300 mL do solvente extrator que foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. Os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, até sua completa secagem. Posteriormente à secagem, os extratos foram

submetidos à solubilização diferencial em banho de ultrassom utilizando de 2 mL de hexano a 8°C (tabela 3).

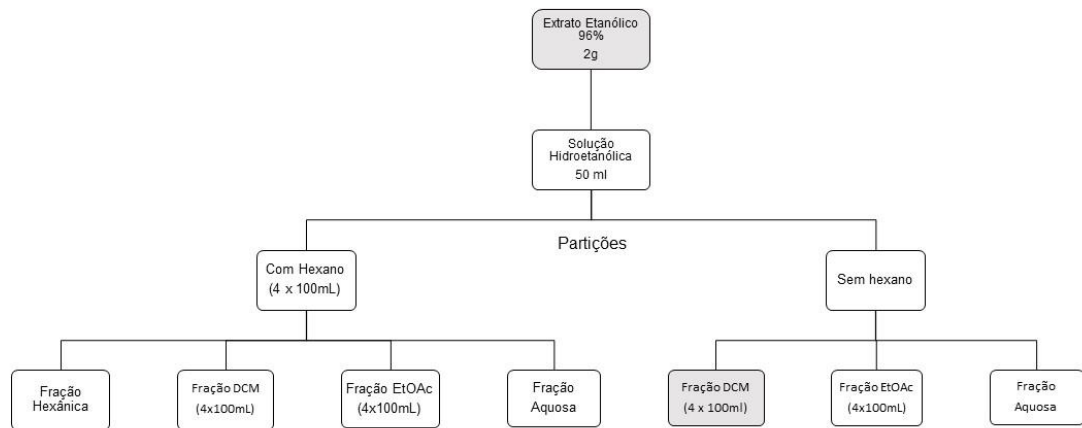
Tabela 3: Rendimento dos extratos em diferentes proporções de diclorometano, acetato de etila obtidos por percolação das partes aéreas *E. grandiflorus*

Massa de droga vegetal utilizada (g)	Solvente	Massa do Extrato (mg)	Rendimento (m/m %)	Massa obtida após solubilização diferencial com 2mL de hexano (mg)
10	EtOAc:DCM 1:9	223,600	2,236	219,8
10	EtOAc:DCM 2:8	244,500	2,445	204,3
10	EtOAc:DCM 3:7	174,800	1,748	143,7
10	EtOAc:DCM 1:1	170,600	1,706	145,0

4.2.4. Obtenção de frações enriquecidas em compostos de média e/ou baixa polaridade a partir do extrato etanólico (item 4.2.1)

Uma porção de 2 g do extrato etanólico obtido no item 4.2.1 foi ressuspensa em água (50 mL) e particionada inicialmente com hexano (4 x 100 mL) e posteriormente com acetato de etila ou diclorometano (4 x 100 mL), resultando nas frações hexânicas e acetato de etila ou diclorometano. Adicionalmente, este procedimento foi realizado sem a prévia partição com hexano. As frações hexânicas, diclorometânica e acetato de etila, enriquecidas em compostos de média e/ou baixa polaridade, foram concentradas em evaporador rotatório e os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador até sua completa secagem (Fluxograma 2; Tabela 4) (GARCIA et al., 2011).

Figura 4: Fluxograma das frações enriquecidas em Compostos lipofílicos

Tabela 4: Massa das frações enriquecidas em compostos de média e baixa polaridade obtidas a partir das partições do extrato etanólico a 96° GL com acetato de etila/diclorometano/hexano das partes aéreas *E. grandiflorus*

Tipo de extração	Fração	Massa do extrato (g)
Partição direta com DCM 1	Fase aquosa	0,927
	Fase DCM	0,548
Partição direta com ETOAc 2	Fase aquosa	0,834
	Fase ETOAc	0,635
Partição com Hexano e DCM 3	Fase aquosa	0,789
	Fase Hexano	0,201
	Fase DCM	0,260
Partição com Hexano e ETOAc 4	Fase aquosa	*
	Fase Hexano	0,154
	Fase ETOAc	0,0759

*amostra perdida devido crescimento fúngico

4.3. Análises cromatográficas qualitativa dos extratos e frações:(Itens: 4.2.1, 4.2.2,4.2.3,4.2.4)

A composição química qualitativa dos extratos etanólicos, aquosos, bem como das frações provenientes das partições e das purificações cromatográficas foram avaliadas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDs) e por cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (CLUE-FR).

4.3.1. Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)

Foram usadas placas de vidros recobertas por sílica gel 60 G, como fase estacionária, empregando eluentes diversos. Como revelador foi usado anisaldeido-sulfúrico (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI 1993). As placas foram observadas sob luz visível e UV (254 e 365 nm) antes e após revelação.

4.3.2. Condições cromatográficas para obtenção dos perfis exploratórios por CLUE-DAD:

4.3.2.1. Preparo das amostras:

Pesou-se cerca de 5 mg de cada amostra em microtubo plástico do tipo safe-lock, e adicionou-se 1 mL de metanol grau HPLC. As amostras foram solubilizadas com auxílio de banho ultrassom, por 20 minutos e em seguida, centrifugou-se por 10.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante (4 µL) foi empregado nas análises por CLUE-FR. Para obtenção dos perfis cromatográficos utilizou-se coluna Acquity CLUE® BEH C18 1.7 µm; 2.1 x 50 mm column- Ultra performance LC, detecção no UV_{210 nm} fluxo de 0,3 mL/min e temperatura de análise foi de 40°C. O volume injetado de cada amostra foi de 4 µL. Utilizou-se gradiente de água e acetonitrila acidificadas com ácido fosfórico (0,1% H₃PO₄), conforme descrito na tabela 5. Para o preparo das fases móvel dessa etapa, foram empregados solventes grau CLAE e água ultrapura obtida de sistema Mili-Q. No início das análises, foi injetado como branco o solvente empregado na solubilização das amostras, MeOH (4 µL).

Tabela 5: Sistema de eluição perfil exploratório para o CLUE-DAD-FR

Tempo	ACN/0,1 % H ₃ PO ₄	H ₂ O/ 0,1% H ₃ PO ₄
0	5	95
12	95	5
14	95	5
15	5	95

4.3.2.2. Condições cromatográficas para obtenção dos perfis exploratórios de extratos e frações (CLUE-DAD-MS)

Os perfis de extratos e frações obtidas neste presente trabalho foram avaliados empregando-se sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (Waters) acoplado a detector DAD na faixa de 210 a 500 nm e em interface com espectrômetro de massas triplo quadrupolo (TQD) (Waters Micromass) no modo de ionização positivo e negativo. Utilizou-se coluna de fase reversa (Acquity CLUE BEH C18, Waters; 50 × 2,1 mm d.i. 1,7 µm) acoplada a uma pré-coluna (Acquity CLUE BEH C18 VanGuard pre-column, Waters; 2,1 × 5 mm d.i. 1,7 µm) para a realização das análises. Para a fonte de ionização por eletronspray (ESI), tanto no modo positivo e negativo, as seguintes condições foram empregadas: voltagem do capilar de 3,50 kV; voltagem do cone de 30 V; temperatura da fonte de 118 °C; enquanto a temperatura e o fluxo do gás de dessolvatação foram de 364 °C e 695 L h⁻¹, respectivamente. O fluxo do gás no cone utilizado foi de 59 L/Hr e a energia de colisão foi de 4.00 e 20.00 V no MS e no MSMS, respectivamente. A eluição foi feita com gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% ácido fosfórico, fluxo de 0,3 mL/ min e temperatura da coluna de 40 °C. O volume de injeção das amostras foi de 3 µL para os extratos e frações (5 mg/mL em MeOH) e substâncias puras (1 mg/mL em MeOH). Em todas as etapas, foram empregados solventes grau HPLC e água ultra-pura, obtida em sistema Milli-Q. Fez-se adicionalmente, um branco para MeOH utilizado nas análises. O intervalo de massas avaliado foi da relação massa / carga (m/z) de 100 a 2000 kDa. O sistema de eluição do CLUE-DAD-MS está descrito na tabela 6.

Tabela 6: Sistema de eluição perfil exploratório para CLUE-DAD-MS

Tempo (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0	95	5
10	5	95
11	95	5
13	95	5

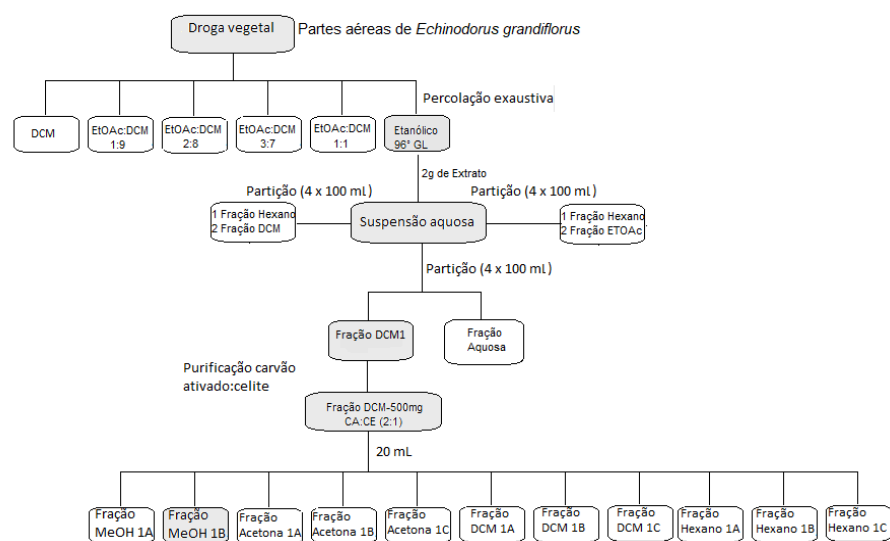
4.3.2.3. Fracionamento da fração DCM1 (item 4.2.4) com carvão ativado/terra diatomácea

A fração DCM1 proveniente da partição do extrato etanólico das partes aéreas de *E. grandiflorus* foi submetida a um fracionamento em funil sinterizado N° 3 (30 mL) empacotado com 2 g de celite e 5 g de carvão ativado. A amostra DCM1 (400 mg) foi solubilizada em 20 de metanol e eluída no funil sinterizado com auxílio de pressão negativa. Foram obtidas frações de 20 mL com os seguintes solventes metanol (A e B) acetona (A, B e C), diclorometano (A, B e C) e n-hexano (A, B e C) (tabela 7). A massa total de DCM1 empregada na purificação foi de 7,304 g. Ao todo, foram realizadas 15 repetições como descritas acima. Os resíduos obtidos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, até sua completa secagem.

Tabela 7: Rendimento das frações obtidas da purificação de DCM 1 (Item 2.2.4) com carvão ativado e terra diatomácea

Fração	Massa (mg)	Teor adsorvido (% m/m)
Metanólica1 A	484,300	6,630
Metanólica1 B	495,200	6,779
Acetônica1 A	467,00	6,393
Acetônica1 B	243,00	3,337
Acetônica1 C	363,00	4,969
DCM1 A	602,200	8,244
DCM1 B	618,100	8,462
DCM1 C	247,800	3,392
Hexânica1 A	159,700	2,186
Hexânica1 B	13,900	0,190
Hexânica1 C	20,300	0,277
Total	3714,5	50,86

Figura 5: Fluxograma das sub-frações (metanólicas, acetônicas, diclorometânicas e hexânicas) obtidas por filtração de pressão negativa com CA/CE (Itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.3.2.3)



4.3.2.4. Fracionamento da fração metanólica por cromatografia em coluna de sílica gel flash (CCS) (Item 4.3.2.3)

A fração metanólica 1B foi submetida a fracionamento utilizando cromatografia em coluna de sílica gel flash visando o isolamento de compostos de média e baixa polaridade. Empregou-se uma porção de 470 mg da fração metanólica 1B que foi incorporada em 2 g de sílica gel flash, em gral de porcelana. O resíduo foi adicionado cuidadosamente no topo da coluna preparada com 120 g de sílica gel flash (0,04-0,063 mm; 230-400 MESH) (dimensões da coluna empacotada: 60 x 3 cm d.i.), procedendo-se à eluição com solventes de polaridade crescente. Para a eluição foram empregados 200 mL de cada eluente utilizado, o volume recolhido em cada fração foi de 10 mL. A reunião das frações obtidas baseou-se nas análises dos perfis cromatográficos por CCD e CLUE. O esquema de eluição, assim como, as massas das frações reunidas obtidas a partir da fração metanólica 1B estão representadas nas tabelas 8 e 9 e na figura 3, respectivamente.

Tabela 8: Eluentes utilizados no fracionamento da fração metanólica 1B por cromatografia em coluna de sílica gel flash

Eluentes	Frações
DCM (100)	1 a 20
DCM:EtOAc (80:20)	21 a 40
DCM:EtOAc (60:40)	41 a 60
DCM:EtOAc (40:60)	61 a 80
DCM:EtOAc (20:80)	81 a 100
EtOAc (100)	101 a 120
EtOAc:MeOH (98:2)	121-140
EtOAc:MeOH (96:4)	141-160
EtOAc:MeOH (94:6)	161-180
MeOH (100)	Metanólica

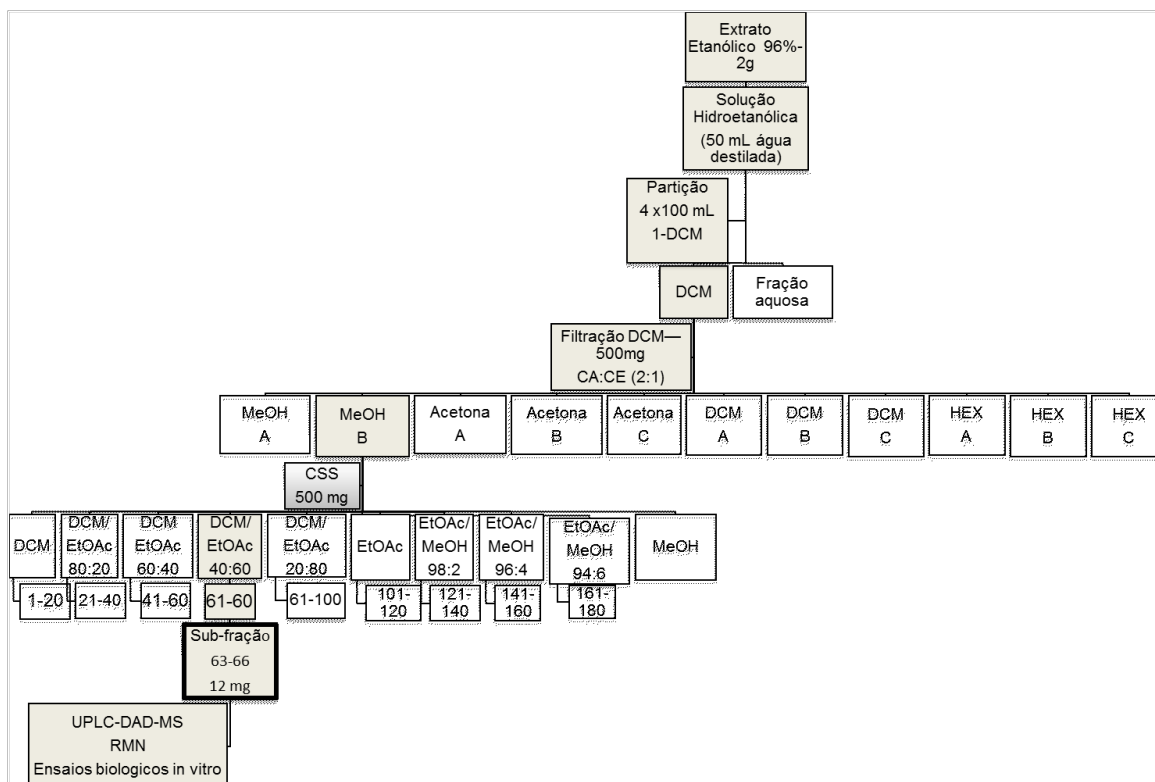
Tabela 9: Massa das reuniões das frações provenientes da coluna de sílica gel flash originadas a partir da fração metanólica 1B

Reuniões	Massa (mg)	Reuniões	Massa (mg)
1-29	10,7	82-90	11,1
30-39	3	91-95	3,3
40-48	8,1	96-110	8,3
49-50	1,3	111-118	4,4
51-57	5,3	119-122	11,3
58-62	13,6	123-128	3,1
63-66*	12	129-135	3,5
67-68	2,6	136-149	5,3
69-76	9,8	150-180	15,4
77-81	6,8	Metanólica	290

*Fração utilizada para análises espectrométricas e em ensaios *in vitro*

Foram realizadas diversas tentativas de isolamento de compostos bioativos das demais frações metanólicas e acetônicas. Empregaram-se novos esquemas de eluição em CCS e purificação adicional por CLAE-preparativo. Devido a pequena massa obtida das frações após esses procedimentos e a baixa de pureza obtida, não se pode caracterizar de forma inequívoca os compostos presentes.

Figura 6: Fluxograma da purificação da sub-fração 63-66 obtida do fracionamento com a fração metanólica 1B (Itens 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4, 4.3.2.3,4.3.2.4)



5. ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO ISOLADO

A sub-fração 63-63 obtida após o processo de purificação em coluna de sílica apresentou pureza adequada e foi submetida a análises de IV, CLUE-DAD-MS e CG-MS e RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros no IV foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR Spectrum One. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos no Depto. de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400, a 25°C , utilizando-se o tetrametilsilano (TMS), como referência interna. O solvente deuterado utilizado na análise foi clorofórmio (CDCl_3).

5.1. Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas com detector de impacto eletrônico

As análises foram realizadas em um equipamento GC-MS-QP2010 ULTRA (Shimadzu). Coluna: Rxi-1MS 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Restek). Temp coluna: 100°C (3min), 10°C /min, a 300°C (7 min). Injetor: 300°C Split (1:50), Interface CG-MS a 300°C. Detector MS (Impacto eletrônico a 70eV) a 300°C. Gás de arraste: Hélio a 3.0 ml/min. Vol. de injeção: 2 μ L. Software de aquisição de dados: GCMS Solution (Shimadzu). Biblioteca espectral: NIST11. Amostras foram analisadas como derivados TMS (sililados). Uma alíquota de 25 μ L da amostra diluída em THF foi colocada em tubo de microcentrifuga e adicionou-se 25 μ L do agente sililante (MSTFA). A reação foi conduzida em forno de micro-ondas doméstico ELETROLUX MT030 na potência 30% por 2,5 minutos. O tubo com a amostra sililada foi resfriado e a amostra foi submetida a análise por CG-MS. A metilação dos ácidos graxos livre foi desenvolvida pela adição de 100 μ l BF₃ metanólico (14%), seguida de aquecimento durante 10 minutos a 60°C. Os produtos de metilação foram extraídos com 100 μ l de hexano e analisados por CG-MS. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia, no Departamento de Química (UFMG), pela Dra. Vany Ferraz.

6. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os extratos e frações obtidos no presente trabalho e especificamente a sub-fração purificada 63-66 foram selecionados para realização dos ensaios *in vitro* de inibição da produção de IL-1 β e TNF- α .

6.1. Materiais

Os reagentes utilizados foram Kit ELISA TNF- α humano (DY210 Duo Set), Kit ELISA TNF- α humano (DY410 Duo Set), Kit ELISA IL1- β Humano (DY201 Duo Set), todos fabricados pela R&D systems. Lipopolissacarídeo (LPS), meio de cultura RPMI, bicarbonato de sódio, fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, tampão fosfato salino (PBS), phorbol-12 miristato-13 acetato (PMA), hidróxido de sódio, Tween 20 e urato monossódico foram adquiridos da Sigma Aldrich. Também foram utilizadas pipetas sorológicas descartáveis estéreis da TPP; placas de 96 poços para cultivo celular, sistema de filtração esterilizante, capacidade para 500 e 1000 mL, membrana de 0,22 μ m ambos da Corning, placas de 96 poços para imunoensaio, Nunc, tubos de

plástico tipo *safe-lock*, Eppendorf. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

6.2. Ensaios de atividade biológica *in vitro*

6.2.1. Inibição da produção de IL -1 β e TNF- α

A potencial atividade anti-inflamatória de frações e substâncias isoladas foram avaliadas *in vitro* quanto à inibição da produção de TNF- α e IL-1 β em culturas de células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Os ensaios de viabilidade celular e de inibição da produção de TNF- α e IL-1 β foram realizados no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo Doutorando José Hugo Gomes e pela Mestranda Marina Pereira Rocha.

6.2.1.1.1 Cultivo de células THP-1

As células THP-1 (células de leucemia monocítica humana aguda, ATCC TIB-202) foram mantidas em garrafas de cultura em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, em meio RPMI enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Preparou-se uma suspensão celular de 1 x10⁶ para 10 mL por placa, e posteriormente adicionou-se 2 μ L de PMA. O PMA é utilizado para diferenciar os monócitos humanos (THP-1) durante 48 horas em macrófagos. Pipetou-se 100 μ L da suspensão celular em todos os poços utilizados na placa. A placa foi incubada na estufa por 6 horas e foi verificada a aderência celular. O meio RPMI foi eliminado e adicionou-se 100 μ L de novo meio RPMI 2% de soro fetal bovino (SFB) em todos os poços a serem ensaiados.

6.2.1.1.2. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade pelo método da Sulforrodamina B

A sulforrodamina B é um corante brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfônicos, que tem capacidade de ligar-se à componentes proteicos de células previamente fixadas com ácido tricloroacético. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à massa celular, uma vez que a ligação do corante com o conteúdo proteico é estequiométrica (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

As amostras foram solubilizadas em DMSO e diluídas com meio RPMI 2% de (SFB), com o objetivo de obter as seguintes concentrações (10, 30 e 90 μ g/mL). Foi preparado um branco com DMSO, ensaiando na maior concentração utilizada nos ensaios. O DMSO foi diluído com meio RPMI 2% de soro fetal bovino de forma idêntica a amostras ensaiadas. A dexametasona, padrão positivo, teve sua concentração

ajustada em 0,1 μM por poço. A placa foi incubada por 3 horas com 100 μL de cada solução amostra. Após esse período, foi adicionado 20 μL de LPS em todos os poços com exceção no controle de meio sem o LPS, onde foi adicionado 20 μL de meio RPMI 2% (SFB). Após esse procedimento, as placas foram incubadas por 24 horas e na sequência centrifugadas por 5 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante de cada poço (120 μL) foi retirado e congelado para análises de citocinas. Foram adicionados 100 μL de ácido tricloroacético 10% (p/v) em cada cavidade. Em seguida, as placas foram mantidas a 4 °C por 1 hora. Após esse período, as cavidades foram lavadas com água destilada e as placas foram mantidas a temperatura ambiente para secagem. Após totalmente secas, foram adicionados 100 μL da solução de sulforrodamina B 0,057% (p/v) em cada cavidade e o corante foi mantido nas placas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período as cavidades foram lavadas quatro vezes com 200 μL de uma solução de ácido acético 1% (v/v) para remover o corante não ligado às proteínas. Novamente as placas foram mantidas a temperatura ambiente para secagem. Após totalmente secas foram adicionados 100 μL da solução de Tris base 10mM (pH 10,5) em cada cavidade para solubilizar o corante ligado as proteínas celulares. Em seguida, foram realizadas as leituras na mesma placa a 510nm em um espectrofotômetro de placas modelo Spectra Max Plux 384, da marca Molecular Devices®, utilizando o *software* Softmax Pro 6.51®. Foram realizados três experimentos independentes. Após subtrair todos os valores do branco (Tris base), a porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela porcentagem de absorbância em relação ao controle não tratado de células, que foi considerado como 100% de viabilidade celular.

$$VC = \left(\frac{A - B}{C - B} \right) \times 100$$

Onde A, B e C são os valores de absorbância ou densidade ópticos medidos a 510 nm (DO510) das cavidades nas quais estão presentes as células tratadas com amostras (A), branco (B) e células tratadas com o diluente das amostras (C), respectivamente.

6.2.1.1.3. Avaliação *in vitro* da atividade anti-TNF- α e anti- IL1- β

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μL /poço de uma solução de anticorpo de captura (anticorpo de camundongo anti-TNF- α humano ou anticorpo de camundongo anti-IL1- β humano), na concentração de 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS. Essa solução permaneceu em contato com a placa *overnight*, a 4 °C. Posteriormente, as

placas foram lavadas (quatro vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1 %) em um lavador de placas automático. Em seguida, foram adicionados 200 µL/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de 2 horas, seguido da adição do padrão de TNF- α (1000 a 15,6 pg/mL) ou IL1- β (250 a 3,91 pg/mL) e das amostras (100 µL do sobrenadante/poço). Após 18 horas de incubação a 4 °C, as placas foram lavadas, adicionando-se às mesmas 100 µL/poço de uma solução de anticorpo de detecção biotinizado (anticorpo de cabra anti-TNF- α humano ou anticorpo de cabra anti IL1- β) na concentração de 500 e 200 ng/mL em solução diluente contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS, respectivamente. Essa solução permaneceu em contato com a placa *overnight*, a 4 °C. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (R&D system). Após 20 a 30 minutos, a placa foi novamente lavada, seguindo-se adição do tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio (Merck). 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 de ELISA, no comprimento de onda de 490 nm.

6.2.1.1.4 Análise estatística

A CI_{50} , concentração da amostra que induzir 50% de inibição da produção de IL-1 β e TNF- α , foi determinada através de regressão não linear das curvas concentração-resposta (CCR) obtidas nos experimentos, utilizando-se o programa Prisma GraphPad 4.0 (GraphPad Software Inc., EUA). As análises estatísticas foram realizadas com teste t de Student não-pareado. Resultados foram considerados significativamente distintos quando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Otimização das condições extrativas das partes aéreas de *E. grandiflorus* visando obter constituintes de média e baixa polaridade

A caracterização de extratos e frações de origem vegetal constitui uma tarefa desafiadora devido a diversidade de compostos presentes. Entre as técnicas analíticas existentes para o controle de qualidade e caracterização dos produtos vegetais, está a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). A aplicabilidade da

CLUE neste contexto ocorre principalmente pela sua facilidade de operação, alta exatidão e precisão em análises quantitativas (JIANG et al., 2010).

Na literatura existem vários relatos do isolamento e identificação de diterpenos e ácidos graxos em espécies do gênero *Echinodorus* (TANAKA, 2000, PIMENTA 2002). Tanaka (2000) isolou os ácidos dodecanóico e o linolênico do extrato de acetato de etila dos pecíolos da *Echinodorus grandiflorus*. Pimenta (2002) relatou a presença de ácidos graxos nas folhas desta espécie, entre eles o ácido palmítico. Portanto, os ácidos graxos podem ser encontrados nos derivados vegetais provenientes das partes aéreas dessa planta. Esta classe química apresenta como característica físico-química básica polaridade baixa, ou seja, na grande maioria, os grupos cromóforos estão ausentes. Estes são responsáveis pelo o efeito de conjugação nas estruturas químicas e pela absorvidade das estruturas químicas (GUARRASI, et al 2010; PIERRI et al, 2017).

Dessa forma, a escolha da melhor condição extrativa foi respaldada principalmente na avaliação dos rendimentos extrativos, agregada às análises dos perfis cromatográficos obtidos em diferentes condições extrativas. Idealmente, foi considerada relevante a presença de picos nos terços médio e final dos cromatogramas, uma vez que durante as análises foi utilizado um gradiente de eluição de acetonitrila em água de 5% até 95%. Teoricamente, os compostos de interesse deveriam ser eluídos nessa região do cromatograma. Adicionalmente, a análise dos perfis dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector DAD, foi também decisiva para escolha da condição extrativa ideal, visto que diterpenos e ácidos graxos apresentam máximos de absorção entre 200-240 nm (GUARRASI, et al 2010; PIERRI et al, 2017).

Avaliou-se inicialmente o uso de solventes de baixo custo como o etanol 96° GL frente ao uso de solventes menos polares como o diclorometano e misturas entre diclorometano e acetato de etila. O uso de solventes menos polares seria justificado pela polaridade dos compostos desejados e para a se obter uma extração mais seletiva, para os compostos de média e baixa polaridade.

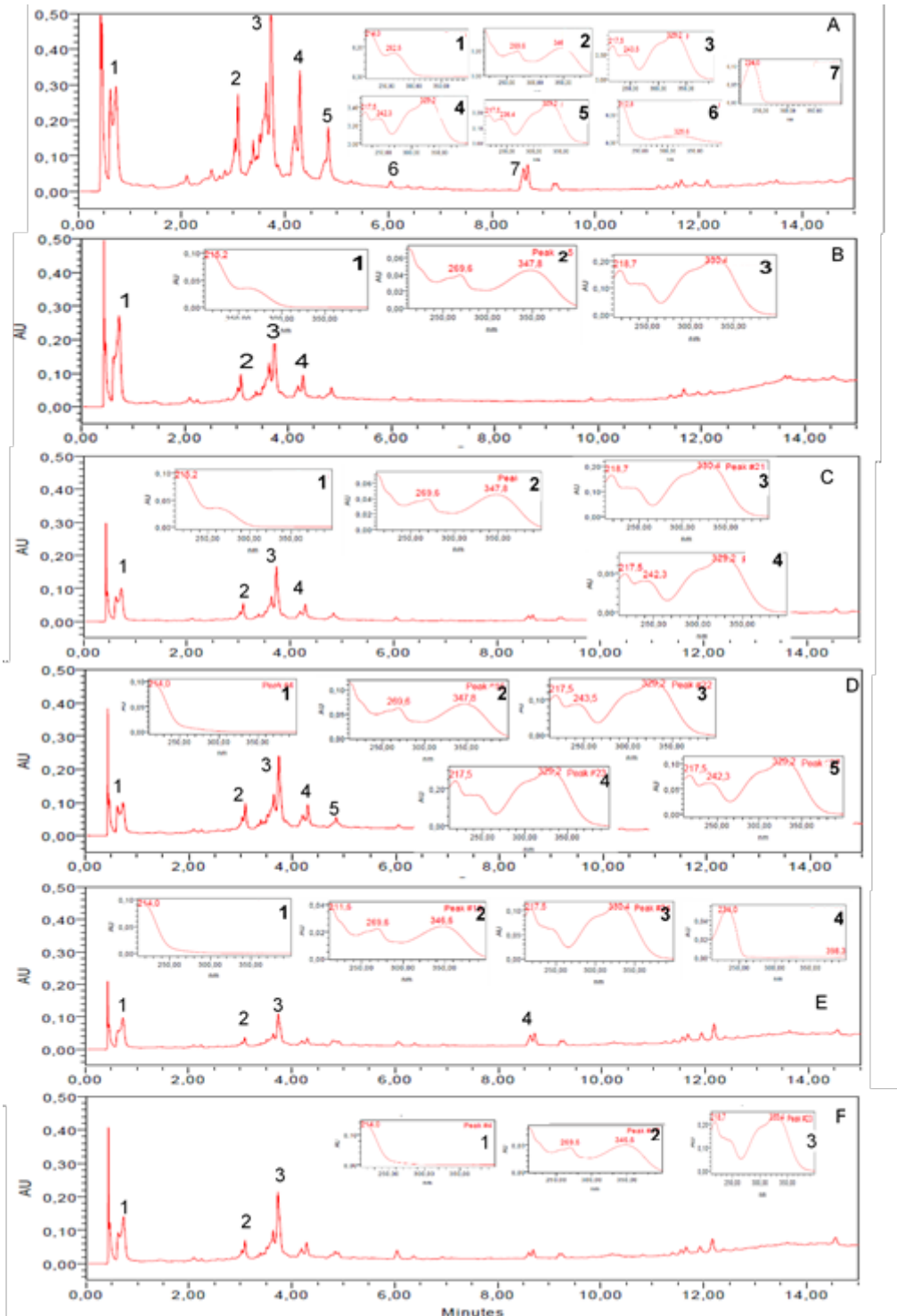
As Tabelas 1, 2 e 3 (item 4.2.1; item 4.2.2; item 4.2.3; pág. 39-41) apresentam os rendimentos dos processos extrativos empregados. Nota-se que a percolação exaustiva com etanol 96° GL foi o processo extrativo que apresentou melhor rendimento (média de três procedimentos \bar{x} 11,68 m/m; \pm 1,86) enquanto a maceração com diclorometano e as diferentes misturas entre diclorometano e acetato de etila

(1:9; 2:8; 3:7; 1:1) apresentaram rendimentos extrativos que variaram de 1,1% até 2,4%. O menor rendimento observado para solventes menos polares poderia se contrapor pela presença de picos mais intensos e com espectro de UV compatíveis com ácidos graxos e diterpenos.

As análises dos cromatogramas obtidos para os diferentes extrativos mostraram que com o uso de solventes menos polares não se observou uma mudança relevante no perfil cromatográfico dos extratos, principalmente em relação aos compostos de média e baixa polaridade (Figura 7).

Observa-se claramente uma maior frequência de picos com tempo de retenção entre 3 e 5 minutos, que no entanto, não apresentam espectros de UV compatíveis com diterpenos e ácidos graxos. Os picos com tempos de retenção superiores a 5 minutos apresentaram intensidade semelhante entre todos os extratos analisados. É importante ressaltar, que os cromatogramas não foram gerados com a mesma escala em relação à intensidade de absorção. Com base nas observações acima e, sustentados pelo maior rendimento observado na percolação com etanol 96° GL, conclui-se que esse método extrativo apresentou os melhores resultados. Adicionalmente, não se pode descartar o menor custo e toxicidade do etanol em relação aos demais solventes utilizados.

Figura 7: Cromatogramas dos extratos das partes aéreas de *E. grandiflorus* obtidos com diferentes solventes/ métodos extrativos. A: extrato etanólico (Percolação); B: extrato diclorometânico (Maceração); C: extrato DCM:EtOAc (1:9; Maceração); D: extrato DCM:EtOAc (2:8; Maceração); E: extrato DCM:EtOAc (3:7; Maceração); F: extrato DCM:EtOAc (1:1; Maceração). (Iténs 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) Condições cromatográficas via item 4.3.2.2.



7.2. Enriquecimento a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *E. grandiflorus* em compostos de média e baixa polaridade (Itém 4.2.4)

Conforme discutido no item 7.1 o método de extração empregado no presente trabalho foi a percolação exaustiva utilizando etanol 96° GL como solvente extrator. O etanol é um solvente corriqueiramente empregado em extrações, pois apresenta capacidade de extrair compostos de alta, média e baixa polaridade. Como o objetivo de enriquecer o extrato em compostos de média e baixa polaridade (diterpenos e ácidos graxos) realizou-se a partição do extrato etanólico entre solventes imiscíveis. Esta estratégia tem como objetivo concentrar compostos lipofílicos na fração orgânica e eliminar compostos de alta polaridade na fração aquosa.

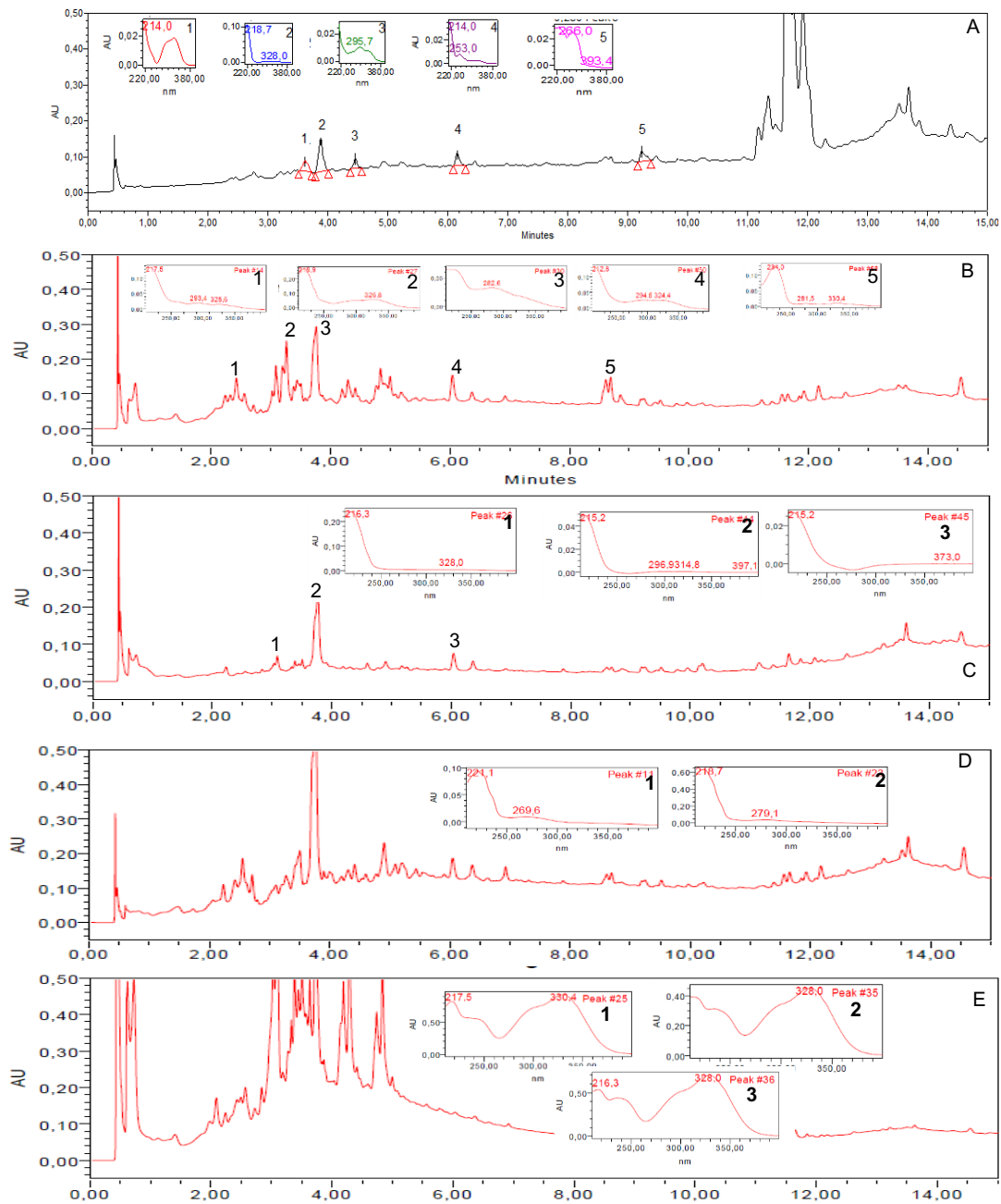
Os solventes de escolha para enriquecer as frações em compostos de média e baixa polaridade foram: hexano (Hex), diclorometano (DCM) e acetato de etila (EtOAc). O hexano é um solvente apolar utilizado para desengordurar extratos vegetais, enquanto o acetato de etila é um solvente mais polar, quando comparado com o DCM e o Hex, desta maneira tem a capacidade de extrair em maior extensão compostos de média e alta polaridade. Já o diclorometano é um solvente que exibe uma polaridade moderada, desta forma possui uma afinidade maior por substâncias de média e baixa polaridade.

Foram testadas quatro condições que estão descritas na Tabela 4 (item 4.2.5, pág. 42-43). Duas estratégias foram utilizadas para a realização dos experimentos, a partição direta do extrato etanólico (2g) suspenso em 50 mL de água destilada empregando o diclorometano (4 x 100 mL). A mesma partição direta foi elaborada com acetato de etila (4 x 100 mL). E partições desses dois solventes (4x 100mL) antecedida da partição com hexano (4 x 100 mL). As partições diretas com acetato de etila e diclorometano tiveram como rendimentos 31,7% e 27%, respectivamente. Os procedimentos empregando a partição inicial com hexano tiveram como rendimento 7,7% e 3,8% para hexano e acetato de etila, respectivamente e 10% e 13% para hexano e diclorometano, respectivamente.

A análise dos perfis cromatográficos demonstra que todas as frações avaliadas apresentam picos com espectros de UV compatíveis com diterpenos e ácidos graxos (Figura 8). A comparação do perfil cromatográfico da fração acetato de etila com a fração diclorometano, demonstra que a primeira apresenta um pico TR= 0,48 min compatíveis com compostos de alta polaridade que foram extraídos pelo acetato de etila. Adicionalmente, as frações acetato de etila e diclorometano obtidas após

extração inicial com hexano apresentaram vários picos com tempo de retenção entre 3 e 5 minutos com espectros de UV com perfil não característico de diterpenos e ácidos graxos.

Figura 8: Cromatogramas das frações obtidas por partição entre os solventes imiscíveis no extrato etanólico das partes aéreas da *E. grandiflorus*. A: fração DCM; B: fração EtOAc; C: Fração hexânica; D: Fração DCM obtida da partição antecedida com hexano (3); E: Fração EtOAc obtida da partição antecedida com hexano. (Item 4.2.4) Condição cromatográfica item 4.3.2.2.



A partir da análise combinada entre os perfis cromatográficos e os rendimentos extrativos, considerou-se como melhor procedimento a partição direta com o diclorometano.

7.3. Purificação da fração diclorometânica com carvão ativado e terra diatomácea. Item 4.3.2.3

A purificação com carvão ativado e terra diatomácea (celite) teve como objetivo inicial eliminar a clorofila presente na fração diclorometânica. A clorofila é designação de um grupo de pigmentos fotossintéticos presente nos cloroplastos das plantas. A clorofila apresenta vários subtipos e como consequência essas moléculas apresentam diversas polaridades, que podem dificultar o isolamento dos diterpenos e ácidos graxos de *E. grandiflorus*. O carvão ativado é um material poroso, com uma alta capacidade adsorviva sobre diferentes tipos de compostos, os quais ficam retidos na sua superfície. Este fato é devido as interações de Van Der Waals, resultantes de uma atração intermolecular, dependente da área superficial tanto do material adsorvido (adsorbato) quanto do próprio adsorvente. Já a terra diatomácea é um sedimento amorfo elaborado a partir de carapaças de organismos unicelulares vegetais, como algas microscópicas marinhas, constituída do grupo aluminossilicato. Esta característica faz com que esse material apresente grande quantidade de íons (cátions) o que lhe proporciona propriedade adsorviva e de troca aniônica entre os diferentes materiais. O comportamento de cada adsorvente é determinado pelo fator de afinidade diferencial e consequente a separação entre as diversas substâncias presentes na amostra. Esta característica garante a seletividade da clorofila e de outros compostos que apresentaram afinidade pelas substâncias adsorvivas (RIBEIRO et al., 2001; CARVALHO, 2005, DABROWSKI et al.,2005). Durante a purificação com a terra diatomácea, pode ocorrer perda de material da amostra. Principalmente quando se trata de compostos ácidos como os diterpenos e os ácidos graxos. Isto porque eles podem ficar retidos durante a troca iônica, devido a possibilidade de ocorrer uma desprotonação do grupo ácido, em contato com substâncias aniônicas, como é o caso do celite.

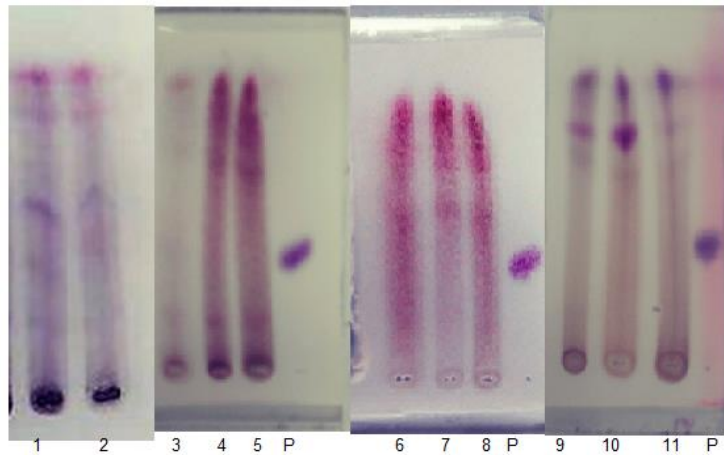
As frações obtidas pela purificação com carvão ativado e celite foram avaliadas por cromatografia em camada delgada e por CLUE-DAD (Figuras 9 e 10).

As análises por CCDs foram realizadas comparativamente ao diterpeno andrografolideo. Para este fim padronizou-se uma fase móvel em que os diterpenos apresentaram um fator de retenção R_f no valor de 0,50.

Adicionalmente, pode-se observar a presença de manchas apresentando cauda, característica de compostos que apresentam grupos funcionais ácidos. Desta forma, com o objetivo de se minimizar esse efeito foi adicionado ácido fórmico à fase móvel. As análises dos perfis cromatográficos das frações demonstram a presença de compostos menos polares do que o andrografolideo ($R_f > 0,5$), a exceção, principalmente, das frações metanólicas 1A e 1B que apresentaram manchas intensas com valores de $R_f = 0,30$ que demonstra a presença de compostos polares (Figura 9). As frações acetônica e diclorometânicas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, já as frações hexânicas apresentaram perfis de menor complexidade em relação às demais frações, destaca-se a presença de três manchas com valores de R_f entre 0,8 e 1,0.

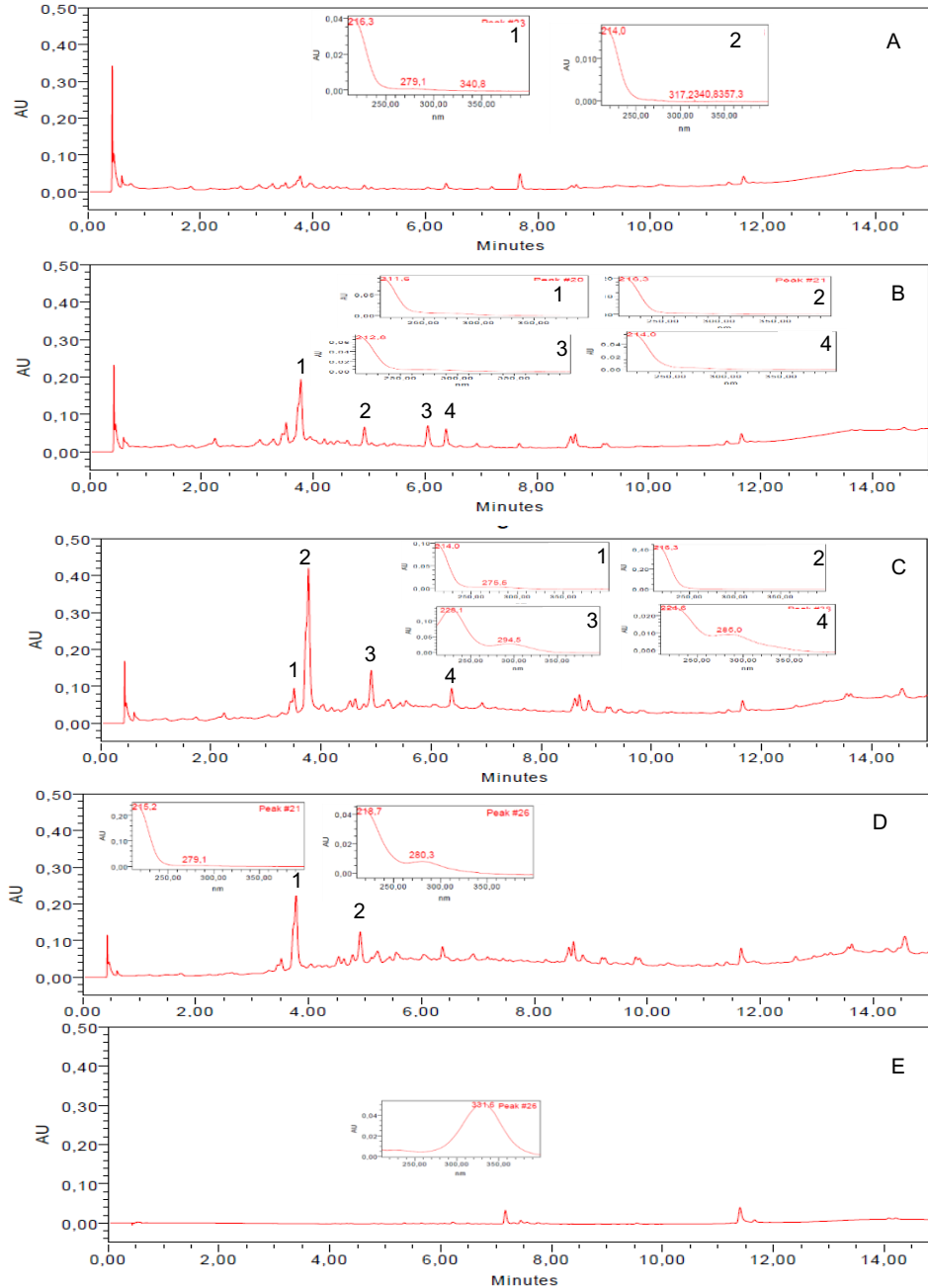
As análises dos perfis cromatográficos por CLUE-DAD demonstraram a presença de picos com tempos de retenção e espectros de UV compatíveis com diterpenos e ácidos graxos (Figura 10). As frações que se apresentaram mais promissoras foram: fração metanólica 1B, frações acetônicas 1A, 1B e 1C e fração diclorometânica 1A. Nota-se principalmente nessas frações a presença de picos com tempo de retenção entre 3 e 7 minutos com espectros UV de compatíveis aos compostos desejados no presente estudo. Em relação à massa total da fração diclorometano purificada, as frações metanólicas 1A e 1B, acetônica 1A, 1B e 1C, diclorometânicas 1A, 1B e 1C e hexânicas 1A, 1B e 1C. A somatória das frações obtidas apresentaram os seguintes rendimentos 13,5%, 14,7%, 20,1% e 2,6%, respectivamente (Tabela 8; item 4.3.2.3 pag. 46). No total, foram recuperados 51% do total do extrato diclorometânico purificado. Os 49% adsorvidos no celite correspondem a eliminação da clorofila, além de retenção de outras substâncias presentes na amostra. É importante ressaltar, que todas as frações obtidas apresentaram visualmente uma diminuição na coloração verde, característica da coloração da clorofila.

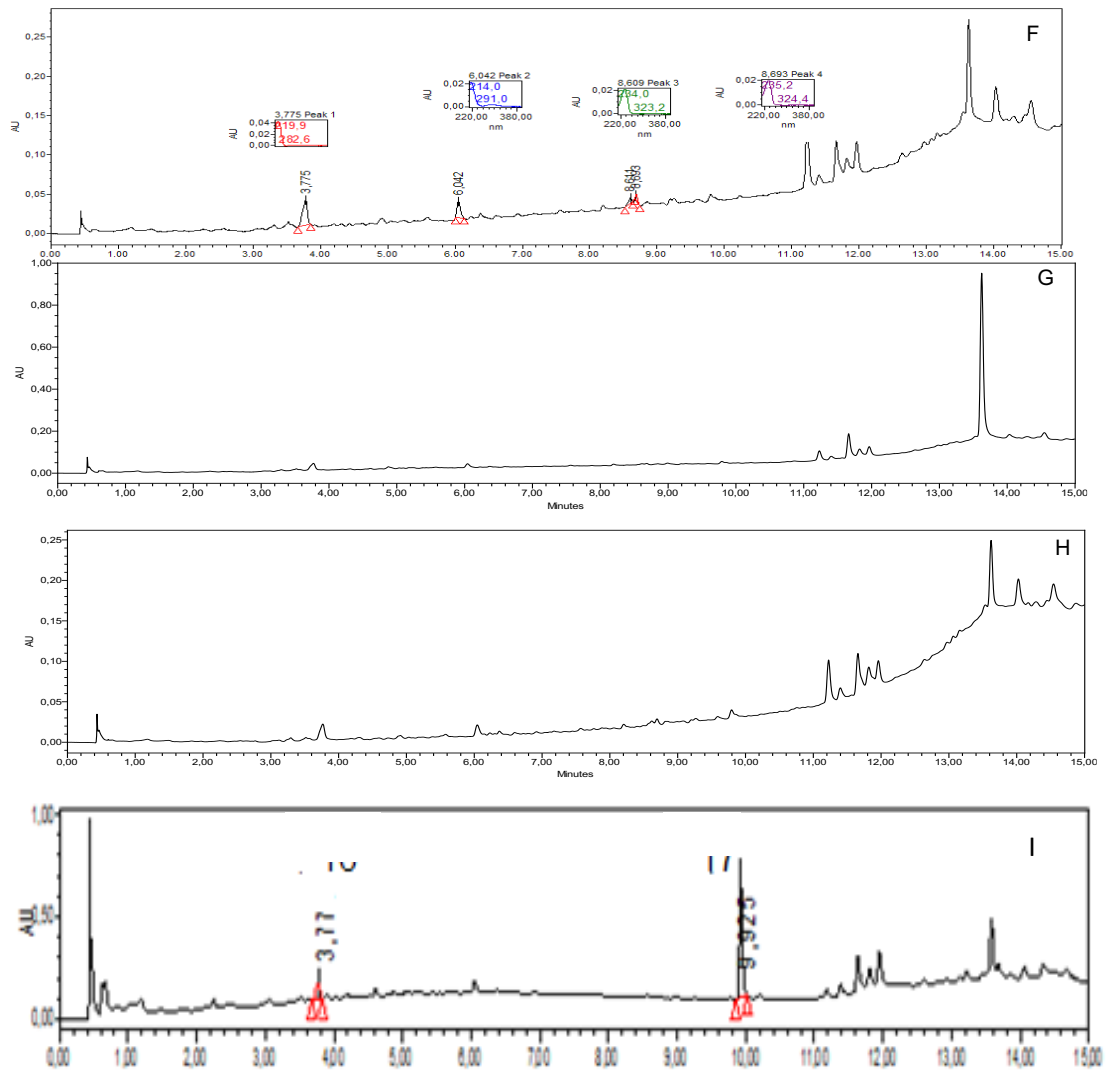
Figura 9: Perfis cromatográficos obtidos por partição entre os solventes imiscíveis no extrato etanólico das partes aéreas da *E. grandiflorus* (Item 4.3.1)

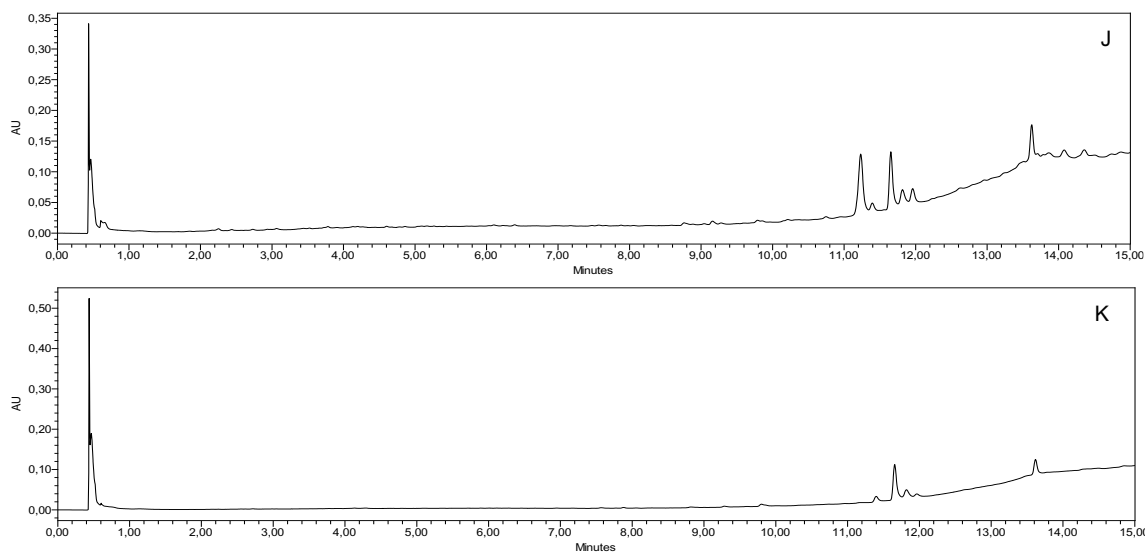


1- fração metanólica 1A; 2- fração metanólica 1B; 3- fração acetônica 1A; 4- fração acetônica 1B; 5- fração acetônica 1C; 6- fração diclorometânica 1A; 7- fração diclorometânica 1B; 8 - fração diclorometânica 1C; 9- fração hexânica 1A; 10- fração hexânica 1B; 11 - fração hexânica 1C; P – andrografolideo; fase móvel: diclorometano:acetato de etila:metanol:ácido fórmico (60:30:10:0,5); revelador: anisaldeído/ácido sulfúrico.

Figura 10: Cromatogramas das frações obtidas por purificação em carvão ativado/celite a partir da DCM1A: fração metanólica 1A; B: fração metanólica 1B; C: fração acetônica 1A; D: fração acetônica 1B; E: fração acetônica 1C; F: fração diclorometânica 1A; G: fração diclorometânica 1B; H: fração diclorometânica 1C; I: fração hexânica 1A; J: hexânica 1B; K: fração hexânica 1C. (Item 4.3.2.3)







7.4. Fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel flash da fração metanólica 1B. Item 4.3.2.4

As frações mais promissoras quanto ao perfil cromatográfico em CLUE-DAD foram: fração metanólica 1B, frações acetônicas 1A, 1B e 1C. Essas frações foram submetidas ao fracionamento sequencial em coluna de sílica gel flash (230-400 Mesh). A opção de utilizar a sílica gel flash foi devido esta possuir partículas menores, capazes de realizar uma eluição mais rápida. Isto é verificado, pois partículas menores tem uma maior superfície de contato e permitem maior eficiência na eluição mesmo em velocidades maiores.

No entanto, apenas com a fração metanólica 1B foi possível obter uma sub-fração com grau de pureza para ser submetida à análises espectroscópicas e enviada para realização de ensaios *in vitro* de inibição de liberação de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, no presente trabalho será apresentada apenas a purificação cromatográfica dessa fração. A estratégia utilizada na coluna cromatográfica empacotada com sílica gel com adsorvente foi desenvolvida com o objetivo de se obter uma resolução máxima entre os diversos componentes presentes na fração. Foi utilizado um gradiente empregando solventes de polaridade crescente (Tabela 9; item 4.3.2.4; pag. 47), no entanto, conforme já discutido no item 7.3, alguns componentes presentes nessa fração apresentaram um grupamento funcional ácido, o que dificulta o isolamento dos compostos na sua forma pura. Principalmente quando se trata de compostos ácidos como os diterpenos e os ácidos graxos. Isto porque eles podem ficar retidos durante a troca iônica, devido a possibilidade de ocorrer uma

desprotonação do grupo ácido, em contato com substâncias que apresentam características menos ácidas como é o caso da sílica.

Os dados apresentados na Tabela 10 (item 4.3.2.4; pag. 47) demonstram que 75% dos componentes foram recuperados nas sub-frações após o processo cromatográfico. Essa diferença provavelmente ocorreu devido ao processo de adsorção irreversível entre os componentes polares presentes na amostra e na sílica.

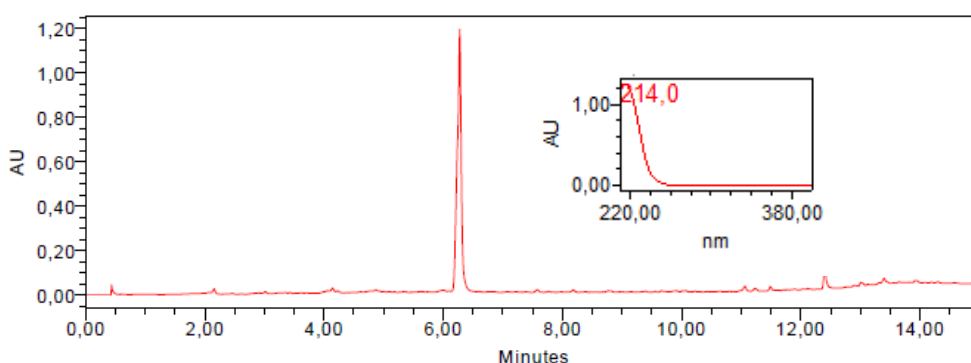
Após a avaliação dos perfis cromatográficos por CCD e CLUE-DAD das sub-frações obtidas constatou-se que a sub-fração 63-66 (12 mg) apresentou pureza elevada, sendo selecionada para elucidação estrutural e ensaio *in vitro*.

7.5 Elucidação estrutural da sub-fração 63-66

A sub-fração 63-66 apresentou-se como sólido branco, com aspecto oleoso em forma de cristais, com mesmos valores de R_f em CCDS (Figura 9), sugerindo composição química semelhante.

O perfil cromatográfico obtido da fração 63-66 por UPLC-DAD indicou a presença de um composto majoritário, com tempo de retenção de aproximadamente 6,4 minutos (Figura 11). O espectro no UV, obtido on line pelo detector DAD (Figura 8), apresentam um máximo de absorção em 214 nm.

Figura 11: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para sub-fração 63-66 com detecção de uv. Condição cromatográfica vide item 4.3.2.2

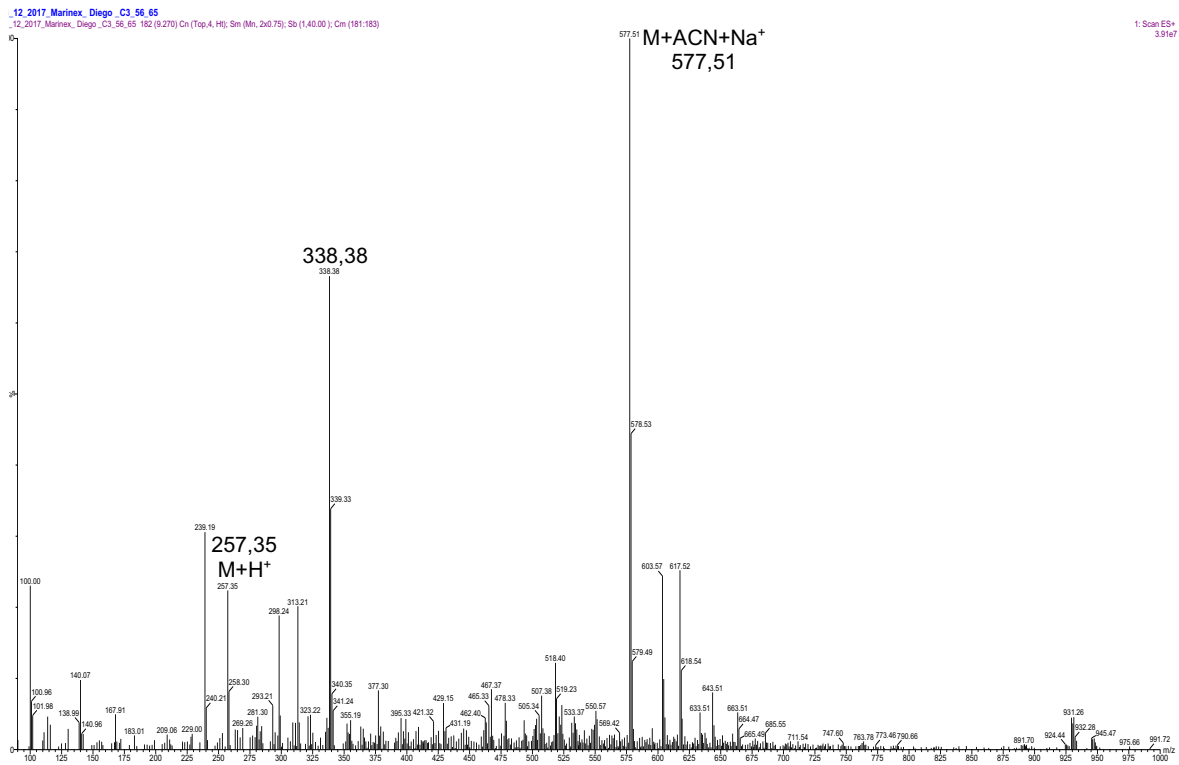


A mesma amostra foi submetida às análises por CLUE-DAD-MS, obtendo-se a ionização positiva $ES+M+H^+ = 257,35$, e $ES- M-H^+ = 255,25$, com provável massa molar de 256 g/mol (Figura 12). Adicionalmente, esta amostra foi analisada por CG-MS e obtida a mesma massa molar e similaridade de 93% com espectro de massa do

ácido hexadecanóico (ácido palmítico) obtida via biblioteca NIST (Figura 13). A presença do ácido palmítico já havia sido relatada anteriormente em espécies de *Echinodorus grandiflorus*. O cromatograma obtido por CG-MS evidenciou outros dois picos com espectro de massas compatível com o ácido palmítico siliado e outro compatível com esteárico (Figura 14).

Figura 12: Espectro de massas obtidos por UPLC-MS-ESI modo positivo (A) e modo negativo (B) para o pico presente da sub-fração 63-66

A



06_12_2017_Marinez_Diego_C3_56_65
06_12_2017_Marinez_Diego_C3_56_65 181 (9.244) On (Top4, HI); Sm (Mn, 2x0.75); S0 (1.40.00)

2 Scan ES-

5.61e6
B

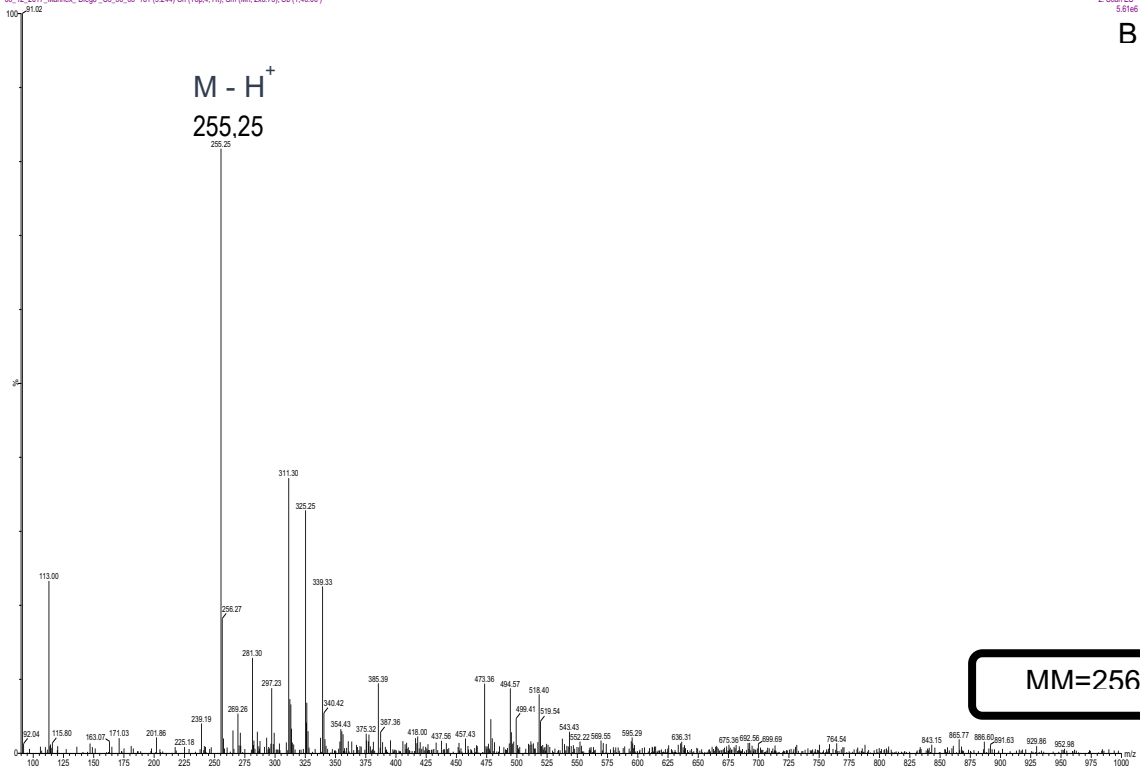


Figura 13: Perfis cromatográficos e espectros de massas da sub-fração 63-66 analisada por CG acoplada ao espectros de massas com ionizador de impacto eletrônico

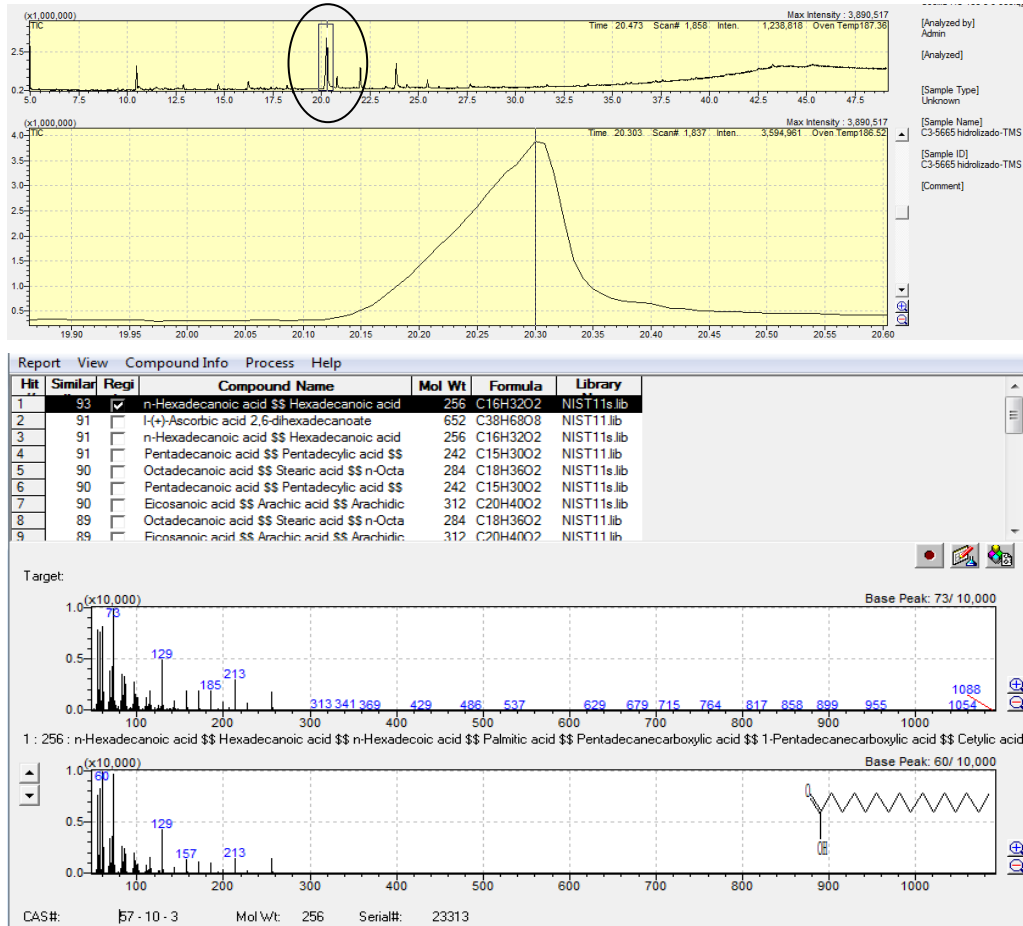
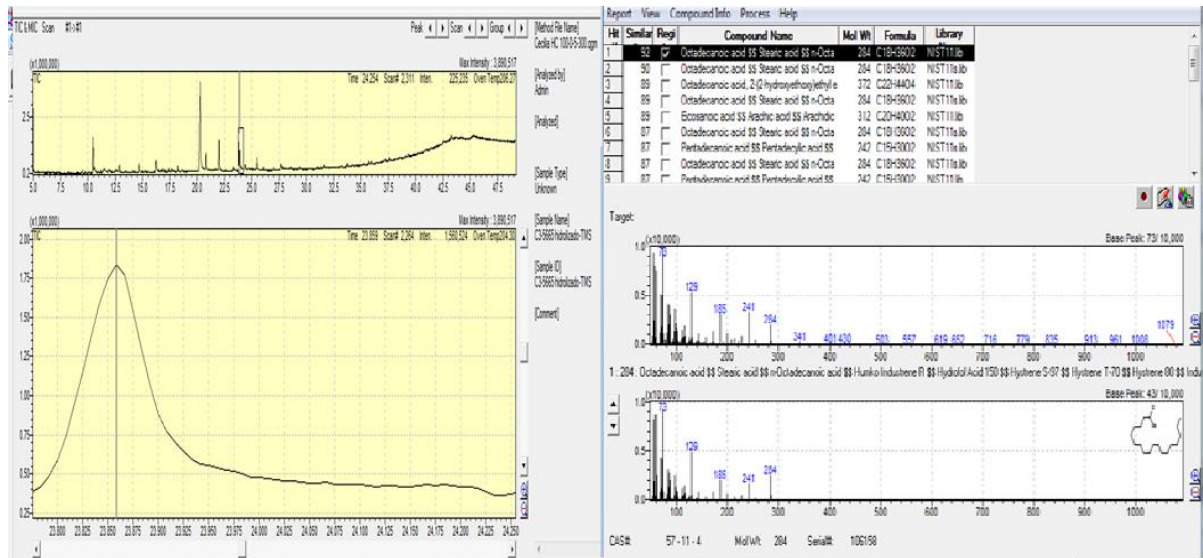


Figura 14: Perfil cromatográfico da sub-fração 63-66. Em detalhe o pico secundário com o espectro de massa compatível com o ácido esteárico



A fim de confirmar inequivocamente a estrutura química do ácido palmítico na fração 63-66, procedeu-se à análise por RMN. O espectro de RMN de ^1H da sub-fração tem um perfil característico de derivado ácido graxo (Figura 15). A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H está descrita na Tabela 10 (400 MHz, CDCl_3)

Figura 15: Espectro de Ressonância nuclear magnética (RMN) de ^1H da sub-fração 63-66 (400 MHz, CDCl_3)

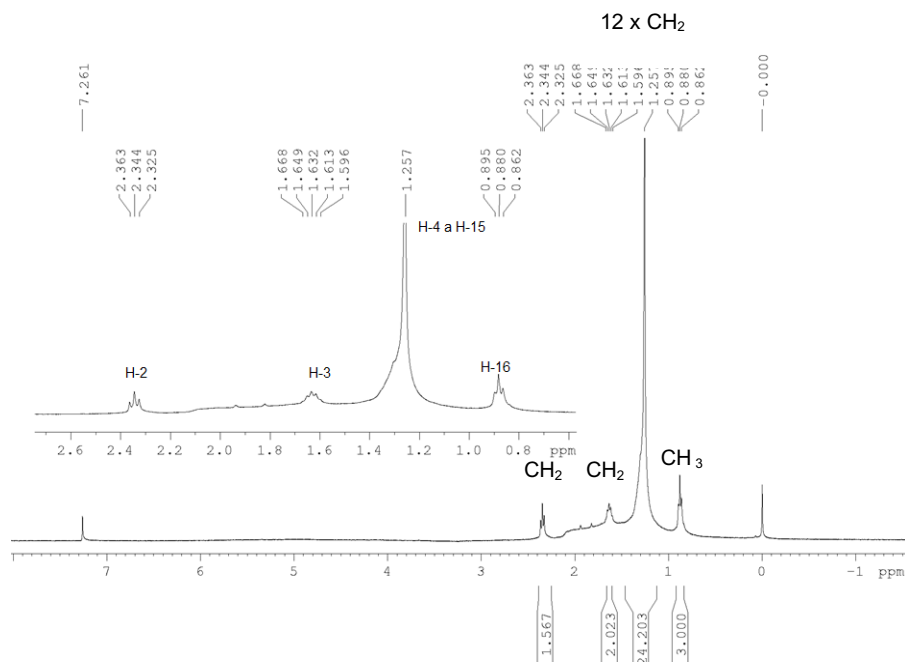


Tabela 10: Atribuições ao espectro de RMN ^1H da sub-fração 63-66 (400 MHz, CDCl_3)

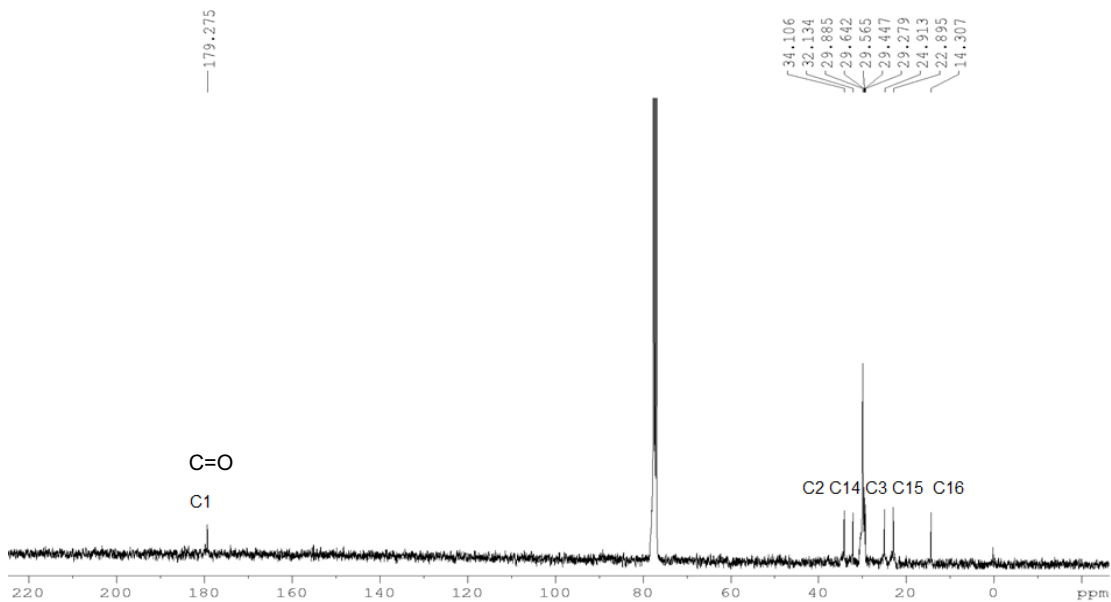
H	M	δ	J	Hz
16	3H (t)	0.880	16,15	6.60
15	5H (s)	1,444	15,4	6,50
2	2H (t)	2.344	2,3	7.60
3	2H (t)	1,632	3,2 3,4	7.20

Os deslocamentos químicos dos sinais de prótons do espectro de RMN ^1H da subfração 63-66 são características de alcanos (alifáticos ou hidrocarbonetos saturados). Os hidrogênios do grupo metila ($-\text{CH}_3$), apresentam prótons mais blindado e, por isso, seus valores de deslocamento químico (0,7-1,3 ppm) são inferiores ao do grupo ($-\text{CH}_2$) (1,2-1,4 ppm) ou ao do grupo ($-\text{CH}$) (1,4-1,7 ppm). Isso porque no caso da RMN ^1H , a densidade eletrônica de um átomo de hidrogênio influencia no efeito "blindagem" deste átomo, frente a um campo magnético, de modo que, quanto menor for a densidade eletrônica, menos "blindado" estará o átomo de hidrogênio em estudo. Um aumento na blindagem implica, também, no aumento da energia necessária para a vibração, significando aumento na frequência e no campo. Portanto, o que faz o grupo metileno e metina terem um maior deslocamento químico e estes apresentarem uma menor densidade eletrônica, do que o grupo metila, (PAVIA, 2010).

Os hidrogênios do grupo CH_3 , produzem picos isolados e agudos, resultando um sinal em tripleto ou duplete. Neste caso, verifica-se um tripleto em 0.88 δ , com um $J= 6.58$ Hz, devido ao acoplamento com os dois hidrogênios dos H15. Para os hidrocarbonetos de cadeia longa, as absorções dos grupos CH e CH_2 podem se sobrepor formando um pico sem resolução, como é observado entre 1,4-1,2 ppm (1.257 δ). O espectro de RMN do composto sugere presença de um grupo carbonila, pois apresenta sinais de hidrogênio (H2) com deslocamento químico entre 2,1-2,5 ppm (2.344 δ), e um $J=7,60$ devido ao acoplamento entre H2 e H3, já que a eletronegatividade deste grupo, diminui a blindagem dos hidrogênios ligados ao carbono alfa carbonílico. Adicionalmente, a somatória da integral aproximadamente de 31 hidrogênios é compatível com $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$, forma molecular do ácido palmítico.

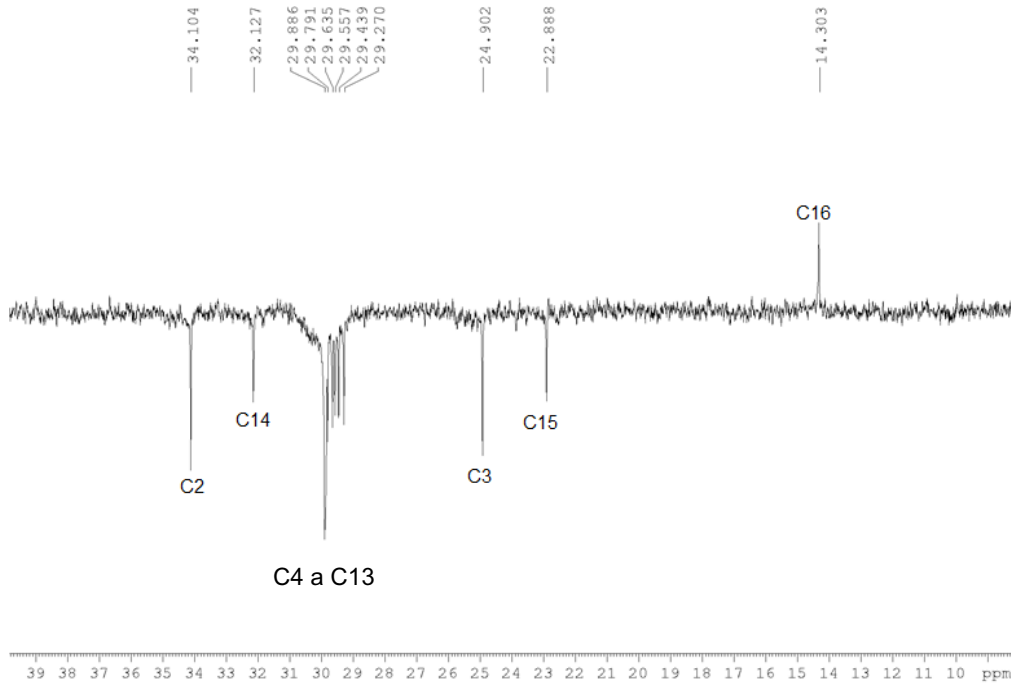
O espectro de ^{13}C RMN da subfração 63-66 é apresentado na Figura 16.

Figura 16: Espectro de Ressonância Nuclear Magnética (RMN) de ^{13}C da sub-fração 63-66 (100 MHz- CDCl_3)



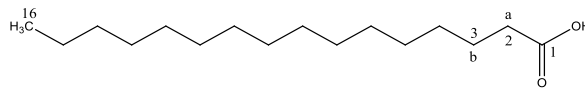
Pode-se observar o perfil característico de um ácido graxo como o ácido palmítico. Um sinal de carbono em 180 ppm referente ao carbono carbonílico, um sinal mais protegido e sinais referentes a grupos metilênicos da cadeia carbônica do ácido graxo entre 22 e 35 ppm. A multiplicidade dos sinais pode ser obtida através do experimento DEPT 135 (Figura 17). Como esperado, o sinal do carbono quaternário da carbonila não é evidenciado, e os sinais dos grupos metilênicos e metila são observados em fases opostas.

Figura 17: Sub-espectro DEPT-135 obtido para a sub-fração (400 MHz, CDCl₃)



Com base em todos os dados espectroscópicos apresentados sobre a fração 63-66 e em comparação com dados citados na (NITBANI *et al*, 2015), podemos inequivocamente afirmar que o ácido palmítico é o componente principal dessa fração (Figura 18). A partir das análises por CG-MS, um método de alta sensibilidade, podemos afirmar que na subfração 63-66 existe uma pequena quantidade de ácido esteárico.

Figura 18: Estrutura química do ácido palmítico



Chemical Formula: C₁₆H₃₂O₂
 Exact Mass: 256,24
 Molecular Weight: 256,42
 m/z: 256.24 (100.0%), 257.24 (17.4%), 258.25 (1.5%)
 Elemental Analysis: C, 74.94; H, 12.58; O, 12.48

7.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória de *E. grandiflorus*

Echinodorus grandiflorus, a espécie selecionada no presente estudo pertence ao gênero *Echinodorus*. Este gênero apresenta uso tradicional em doenças inflamatórias. Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa descreveram a atividade anti-inflamatória de *E. grandiflorus* em modelos *in vitro* e *in vivo* (GARCIA et al., 2010; GARCIA, 2011; GARCIA et al., 2016a; GARCIA et al., 2016b; OLIVEIRA et al., 2018). O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial anti-inflamatório de frações e compostos isolados obtidos das partes aéreas da *Echinodorus grandiflorus*. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada *in vitro* via ensaios de inibição da produção de citocinas pró-inflamatória TNF- α e IL-1 β .

Os ensaios *in vitro* foram realizados com a fração diclorometânica obtida por partição direta do extrato etanólico das partes aéreas e com a sub-fração 63-66, caracterizada inequivocamente com ácido palmítico (vide item 4.2.4;4.3.2.4).

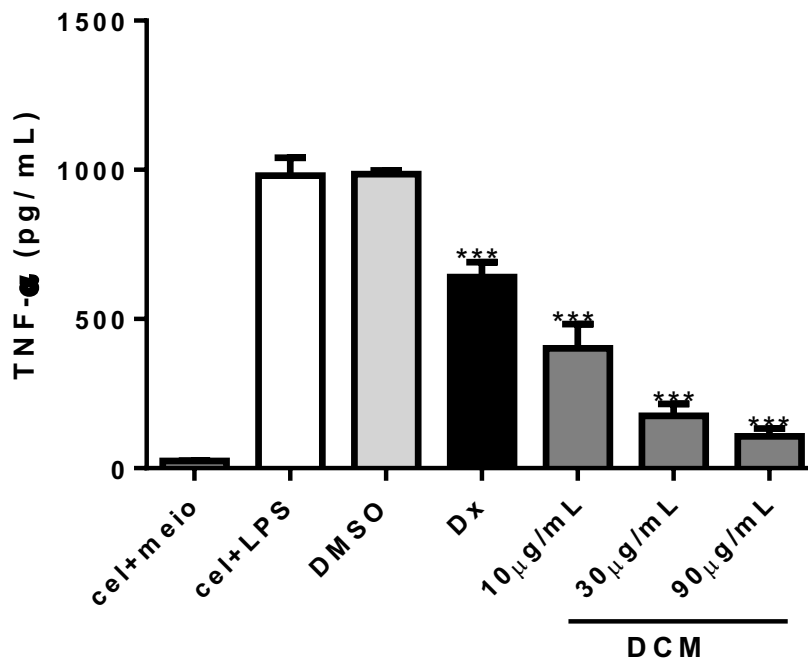
Um pré-requisito para realização dos ensaios *in vitro* consiste na avaliação da viabilidade celular nas concentrações a serem testadas nos ensaios de inibição de liberação de citocinas. A fração diclorometânica apresentou viabilidade acima de 80% nas três concentrações testadas. Os gráficos estão representados pelas Figuras 19 e 20. Já a sub-fração 63-66 apresentou baixa viabilidade celular na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$ e por isso não se avaliou a inibição da liberação de citocinas nessa concentração (Figuras 21 e 22).

Garcia e colaboradores (2016 b) demonstraram, em estudo *in vitro*, que diferentes extratos e frações das folhas de *E. grandiflorus* inibem a produção de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS. Os extratos mais ativos nesse ensaio foram os extratos etanólico a 50%, aquoso e diclorometânico, bem como uma fração enriquecida em flavonoides. No presente trabalho obteve-se inibição significativa de TNF- α e IL-1 β em células THP-1 estimuladas por LPS, para a fração diclorometânica, produzida a partir de partição dos extratos etanólicos das partes aéreas da espécie. A fração DCM apresentou uma porcentagem de inibição para TNF- α , $58,00 \pm 35,17$; $81,59 \pm 21,26$; $88,81 \pm 7,70$ nas concentrações testadas de 10, 30 e 90 ($\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Este resultado pode estar relacionado, principalmente com a composição da fração diclorometânica, enriquecida em ácidos graxos e diterpenos, os quais apresentam uma literatura vasta quanto a atividade anti-inflamatória. Provavelmente, ocorre um efeito sinérgico entre os ácidos graxos, como o ácido

palmítico e o ácido esteárico e os diterpenos, o que intensifica a atividade anti-inflamatória. De acordo com Intahphuak, Khonsung e Panthong (2009); o óleo de coco virgem contém inúmeros ácidos graxos em sua composição, tais como ácido palmítico, esteárico, oleico entre outros, apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em diferentes modelos *in vivo* testados. Em ensaios de inflamação aguda, o óleo de coco apresentou efeitos anti-inflamatórios moderados em modelos de edema de orelha induzida por etil-fenilpropiolato e em edema de pata induzido por carragenina e o ácido araquidônico. Além disso, o óleo de coco demonstrou ação sobre a inflamação crônica, apresentando redução de exsudatos e na formação de granuloma. Estes resultados sustentam os resultados obtidos no presente trabalho. A sub-fração 63-66 (ácido palmítico), na concentração de 10 µg/mL não apresentou atividade para a inibição de TNF- α , pois a porcentagem de inibição obtida foi inferior a 50% ($31,71 \pm 21,39$). No entanto, na concentração de 30 µg/mL, essa subfração foi ativa apresentando uma inibição de $67,39 \pm 13,20$. Contrariamente aos resultados aqui apresentados, Wu et al. (2014) relataram que o ácido palmítico é capaz induzir a expressão do TNF- α nas células da musculatura lisa vascular.

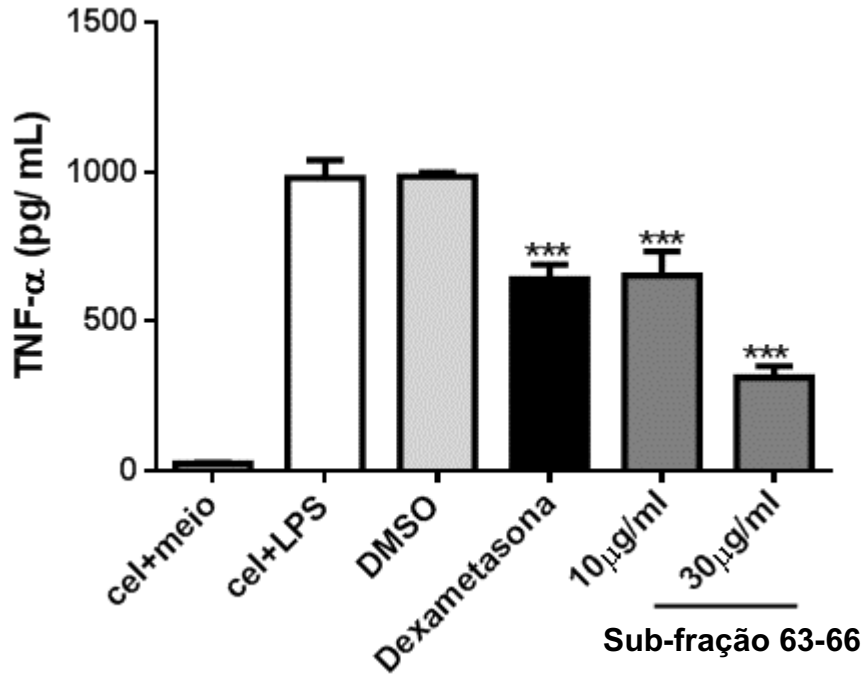
A fração diclorometânica demonstrou ser mais potente em inibir a produção de IL1- β em células THP-1 estimuladas por LPS. Já que inibição de IL-1 β foi de $59,31 \pm 10,44$; $86,84 \pm 9,85$; $94,79 \pm 1,95$. A sub-fração 63-66 (ácido palmítico) inibiu a liberação de IL-1 β apenas na concentração de 30 µg/mL ($55,18 \pm 16,51$). A citocina IL1- β é um dos mediadores centrais da inflamação, dessa forma, sugere-se que a fração diclorometânica apresenta uma propriedade anti-inflamatória mais efetiva, do que a sub-fração 63-66, provavelmente devido ao sinergismo dos diferentes constituintes dessa fração. A fração diclorometânica foi capaz de inibir efetivamente a liberação de IL1- β e TNF- α . Essas citocinas são chaves na cascata inflamatória. TNF- α é uma citocina pro-inflamatória responsável por induzir outros mediadores inflamatórios como INOs e ROS, que conseqüentemente irão intensificar o processo inflamatório. Além disso, TNF- α promove a liberação da IL-1 β , via ativação do NF-kB (BAHIA & SILAKAR, 2010).

Figura 19: Atividade da fração diclorometânica da *E. grandiflorus* avaliada nas doses 10,30,90 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre a inibição de produção de TNF- α pelas células THP-1 estimuladas por LPS



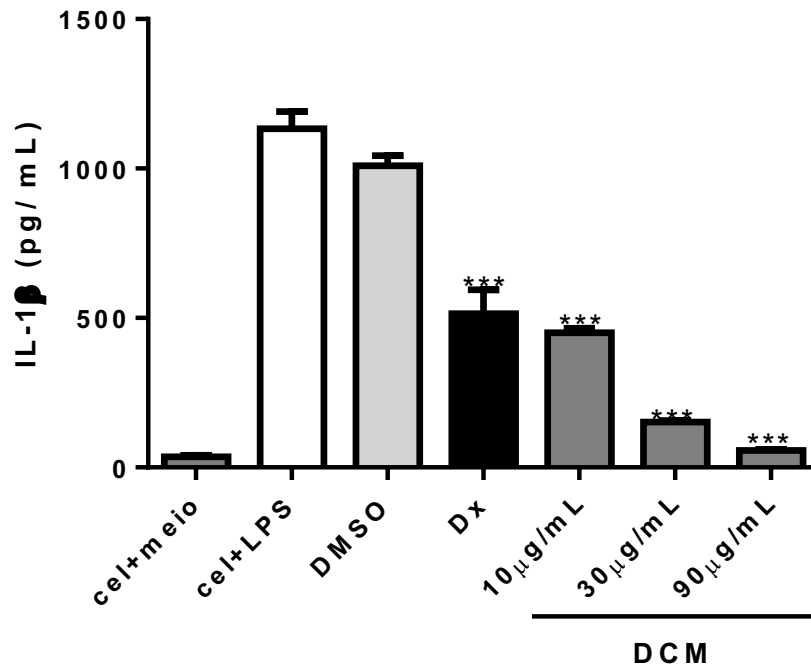
As barras representam EPM (n=3). As médias foram analisadas por análise de variância a um critério (ONE WAY ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,005^{***}$), comparadas ao grupo controle (células +LPS).

Figura 20: Atividade da sub-fração 63-66/ácido palmítico obtida do fracionamento em coluna de sílica gel flash a partir da fração metanólica 1B avaliada nas doses de 10, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ sobre inibição de produção de TNF- α em células estimuladas por LPS



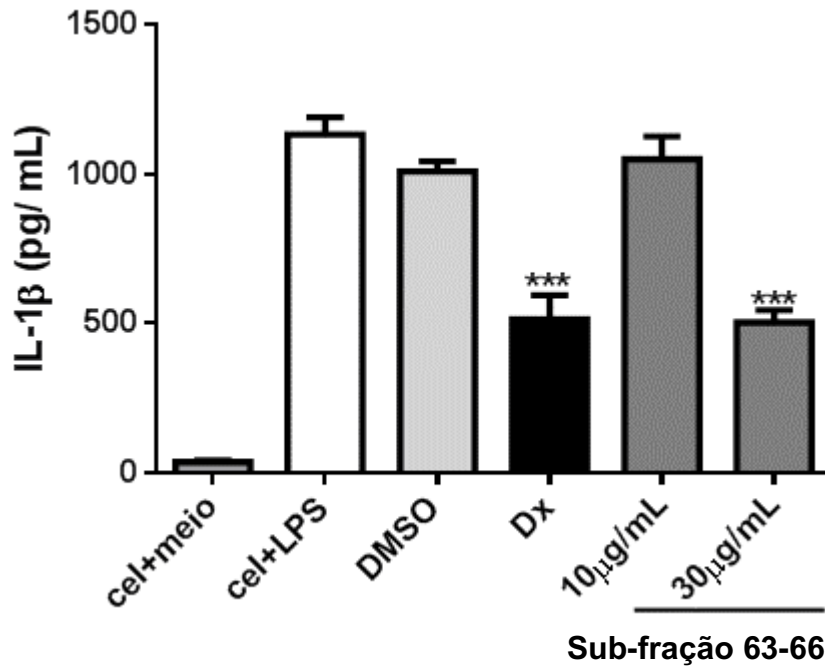
As barras representam EPM (n=3). As médias foram analisadas por análise de variância a um critério (ONE WAY ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,005^{***}$), comparadas ao grupo controle (células+LPS)

Figura 21: Atividade da fração diclorometânica da *E. grandiflorus* avaliada nas doses 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre a inibição de produção de IL-1 β em células THP-1 estimuladas por LPS



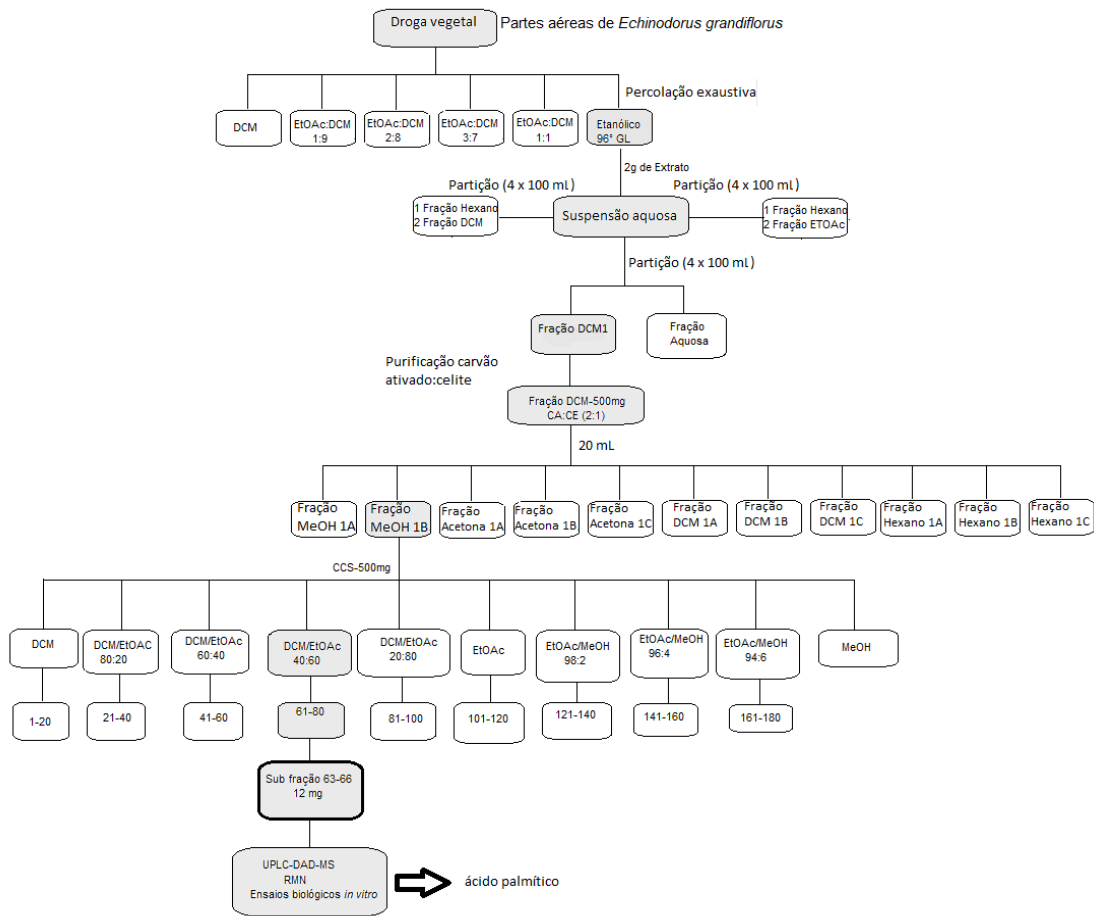
As barras representam EPM (n=3). As médias foram analisadas por análise de variância a um critério (ONE WAY ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,005^{***}$), comparadas ao grupo controle (células + LPS).

Figura 22: Atividade da sub-fração 63-66/ácido palmítico obtido por fracionamento em coluna de gel flash a partir da fração metanólica 1B das partes aéreas da *E. grandiflorus* avaliada nas doses de 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ sobre a inibição de produção de IL-1 β em células THP1 estimuladas por LPS.



As barras representam EPM (n=3). As médias foram analisadas por análise de variância a um critério (ONE WAY ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,005^{***}$), comparadas ao grupo controle (células + LPS).

Figura 23: Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho



8.CONCLUSÕES

A fração diclorometânica obtida e a sub-fração 63-66 apresentaram atividade anti-inflamatória em modelos biológicos *in vitro*, quanto à inibição da produção de TNF- α e IL-1 β em culturas de células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Do ponto de vista químico, análises cromatográficas possibilitaram otimizar o processo extrativo e enriquecimento em ácido graxos e diterpenos classe de compostos citadas na literatura com atividade antiinflamatória. Em contrapartida, o estudo fitoquímico desses extratos e frações apresentou uma grande dificuldade no isolamento de constituintes ativos, provavelmente devido à presença de grupos ácidos que promovem cauda no processo cromatográfico e consequente baixa resolução. O constituinte da sub-fração 63-66 teve estrutura química elucidada por métodos espectrométricos usuais como sendo ácido palmítico. Portanto, os resultados indicam a espécie de chapéu de couro como uma fonte de substâncias lipofílicas bioativas com potencial atividade para o tratamento de doenças inflamatórias mediadas pelo IL1- β e TNF- α , como a artrite gotosa.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, et al., Inflammation and cancer: how hot is the link?. **Biochemical Pharmacology**, Houston, v.72, n.11, p. 1605-1621, nov. 2006.
- AGGARWAL, et al., Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer Research**, v. 24, n. 5, p. 2783-2840, out. 2004.
- AHERN, et al. Does colchicine work? the results of the first controlled study in acute gout. **Internal Medicine Journal**, Australian, v.17, n3, p.301-304, jun. 1987.
- ALMEIDA et al. Inhibition of arachidonic acid metabolism by the Andean crude drug *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera, **Journal of Ethnopharmacology**, San Miguel de Tucumán, v.150, n.3, p.1080-1086, dez. 2013.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D., MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. **Interface- Comunicação, Saúde, Educação**, Botucatu, vol.17, n.46, pp.615-633, aug. 2013.
- APARNA, V. et al. Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. **Chemical Biology & Drug Design**, Palayad, v. 80, n.3, p.434-439, maio, 2012.
- ASSIS, M. A., et al. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 45-55, Jan-Mar 2015.
- ATANOSOV, A. G.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**. v.33, n.8, p.1582-1614, dez. 2015.
- AVOUAC, J.; GOSSEC, L.; DOUGADOS, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.65, n.7, p. 845–851, jul. 2006.
- AZEVEDO et al. Revisão crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Rio de Janeiro, v.54, n.4, p. 346-355, jul. 2017.
- BAHIA, M. S.; SILAKAR, O. Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme: An Encouraging Target for Various Inflammatory Disorders. **Chemical Biology & Drug Design**, Punjab, v.75, n.5, p. 415-443, 2010.
- BOUMERFEG, et al., Antioxidant Properties and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of *Tamus communis* L. Root Extracts. **Phytoterapia Research**, Algeria, v.23, n2, p. 283-288, fev. 2009.
- CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI R. Avaliação da atividade do chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) (Cham. & Schl.) Mitch. (Alismataceae) sobre os níveis plasmáticos de colesterol em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p.95-96, out. 2005.
- CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus*

grandiflorus, [Cham. e Schl] Mitch, Alismataceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro v.84, n.1, p.5-7, 2003.

CARVALHO, Giovani Brandão Maфра de. “**UTILIZAÇÃO DE CARVÃO ATIVO, RESINAS E TERRA DIATOMÁCEA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO DE EUCALIPTO NA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**”. 2005. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

CHEN, et al. Inhibitory effects of a traditional Chinese herbal formula TBL-II on type II collagen-induced arthritis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Guangzhou v.134, n.2, p. 399–405, 2011.

CIMANGA, et al. Complement-Inhibiting Constituents of *Bridelia ferruginea* Stem Bark. **Planta Medica**, Antwerp, v. 65, n.3, 1999.

CORP, N.; PENDRY, B. The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. **Journal of Herbal Medicine**. v.3, n.4, p.157-170, set. 2013.

COSTA, M.; TANAKA, C.; INAMURA, P.; MARSALOLI, A. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, Campinas, v.50, n1, p. 117-122, jan. 1999.

COSTA, R.C.; NUNEZ, C. V; Mercado de bioprodutos de fitoterápicos e fitocosméticos: gestão, tecnologia e inovação. **Revista Fitos**, Manaus, v.10, n.3, p 295-306, set. 2016.

CRAGG,G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Frederick, v. 1830, n.6, jun. 2013.

CRUZ, B. F. Gota. **Revista Brasileira Reumatologia**, Nova Lima, v. 46, n.6, p. 419-422, nov/dez, 2006.

DABROWSKI, A. et al. Adsorption of phenolic compounds by activated carbon a critical review. **Chemosphere**. Poland, v.58, n.8, p.1049-1070, fev.2005.

DALBETH N.; MERRIMA T. R.; STAMP L. K.; Gout. **The Lancet**, Nova Zelandia, v. 388, n.10055, out. 2016.

DEWICK, P.M., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.3.ed. University of Nottingham, UK, 2009. p.209.

DIAS, E.G.E. et al. Qualidade e autenticidade de folhas de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) oriundas de fornecedores de São Paulo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.15, n.2, p.250-256, jan. 2013.

DIPIRO, J. T. et al. Pharmacotherapy Handbook. 7 ed. Nova Yorque: Medical,2009,1066p.

DUTRA, et al. Investigação das atividade analgésicas e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Juiz de Fora, v.16, n.4, p.496-474, out-nov. 2006.

FARMACOPÉIA brasileira. 1. ed. Brasília: Anvisa,1926.

FARMACOPÉIA brasileira. 2. ed. Brasília: Anvisa,1959.

FARMACOPÉIA brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa,2010.

FRICHETTE, P.; BARDIN, Gout. **Lancet**, Paris v.375, n.9711, p.318-328, 2010.

GARCIA et al., Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Journal Phytomedicine**, Belo Horizonte, v.18, n.1, p.80-86,dez. 2010.

GARCIA, Eliana de Faria et al. 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**, Belo Horizonte, v.82, n.5,p. 407-413, mar. 2016a.

GARCIA, Eliana de Faria et al. In Vitro TNF- α Inhibition Elicited by Extracts from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and Correlation with Their Phytochemical Composition. **Planta Medica**, Belo Horizonte, v.82, n.4, p337-343, mar. 2016b.

GARCIA, Eliana de Faria. **Quantificação de marcadores químicos e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Echinodorus grandiflorus* (cham & schldl) micheli (chapéu-de-couro)**.2011. 316f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas com foco na área de Fármacos e Medicamentos-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

GIANG, P. M. et al., Kaurane diterpenoids from *croton tonkinensis* inhibit LPS induced NF kappaB activation and NO production. **Journal Natural Products**, v. 66, n. 9, p. 1217-1220, set. 2003.

GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro;Mc Graw Hill, 2005, 1614p.

GRANDI, Telma Sueli Mesquita. Tratado de Plantas Medicinais [recurso eletrônico]: mineiras, nativas e cultivadas, 1 ed., Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014. 1204 p.:il. Color.

GUARRASI, et al., Quantification of underivatized fatty acid from vegetable oils by HPLC with UV detector. **Journal of Chromatographic Science**, v.48, p.1-4, set 2010.

HAINER, B. L. et al. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Gout. **American Family Physician**, Charleston, v.90, n.12, p 831-836,dez. 2014.

HALDER, S.; SHARMA, A. A review on *Urtica dioica* L. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Sultanpur v. 6, n.10, p.404-421,set. 2017.

HAMDI, A. et al. Pharmacological activities of the organic extracts and chemical fatty acids composition of the petroleum ether extract from *Haplophyllum tuberculatum* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Tunisia, v.216, p.97-103, abril. 2018.

HAVLIK, et al., Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Czech Republic, v.132, n.2, p.461-465,nov. 2010.

HERAS B., HORTELANO S. Molecular Basis of the Anti-Inflammatory Effects of Terpenoids. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, Madrid, v.8, n.1, 2009.

HOU, et al. Longan Seed Extract Reduces Hyperuricemia via Modulating Urate Transporters and Suppressing Xanthine Oxidase Activity. *The American Journal of Chinese Medicine*, Taiwan, v. 40, N. 5, p.979-991, 2012.

HU, et al. Allopurinol, rutin, and quercetin attenuate hyperuricemia and renal dysfunction in rats induced by fructose intake: renal organic ion transporter involvement. ***American Journal of physiology***. Nanjing v.297, v.4, jul.2009.

HUANG, et al. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. ***Food Chemistry Toxicology***, Shaanki, v. 49, n.9, maio. 2011.

ICHIHARA, Y et al. H. Cajucarinolide and isocajucarinolide: anti-inflammatory diterpenes from *Croton cajucara*. ***Planta Medica***, Tokyo, v. 58, n.6, p. 549-551, jan. 1992.

INABA K, Murata K, Naruto S, Matsuda H. Inhibitory effects of devil's claw (secondary root of *Harpagophytum procumbens*) extract and harpagoside on cytokine production in mouse macrophages. ***Journal of Natural Medicines***. Osaka, v.64, n.2, p.219-22, fev. 2010.

INTAHPHUAK, S.; KHONSUNG, P.; PANTHONG, A. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. ***Pharmaceutical Biology***. Thailand, v. 48, n.2, p.151-157, dez. 2009.

JIANG, X. et al. Oxidized Low Density Lipoprotein and Inflammation in Gout Patients. ***Cell Biochemistry and Biophysics***, Nanchong, v.69, n.1, p. 65-69, set. 2013.

JIANG, Y; DAVID, B, TU P.; BARBIN, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—A review. ***Analytica Chimica Acta***, Beijing, v.657, n1, p. 9-18, jan. 2010.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. ***Revista USP***, São Paulo, n.89, p. 114-133, mar/maio. 2011.

KHANNA, D. et al. American College of Rheumatology – Guidelines for management of gout: Systematic non pharmacologic and pharmacologic approaches to hyperuricemia. ***Arthritis Care Research***, Los Angeles, v. 64, n.10, p. 1431-1446, out. 2012.

KIM, T-H. et al. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*, ***Journal of Ethnopharmacology***, Korea, v.146, n.3, p.760-767, abr. 2013.

KIM, Y. et al. Diagnosis and Treatment of Inflammatory Joint Disease, ***Hip & Pelvis***, v. 29, n. 4, p. 211-222, Korea, dez. 2017.

KONG, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. ***Nature Medicine***, v.10, p.1344-1351, nov. 2004.

KOU, et al. Arctigenin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway. ***International Immunopharmacology***, Nanjing v. 11, n.8, p.1095-1102, agost. 2011.

KUO, et al. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. **Nature Reviews Rheumatology**, Taiwan, v.11, n.11, p. 649-662, jul. 2015.

LAEV, S.S.; SALAKHUTDINOV, N.F. Anti-arthritic agents: progress and potential. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Federação Russia, v. 23, n.13, p. 2929-3872, jul. 2015.

LEHTONEN, S. On the origin of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae) in Florida (*E. floridanus*) and its estimated potential as an invasive species. **Hydrobiologia**, Turku, v. 635, n. 1, p. 107,112, nov. 2009.

LESSA, M. A. et al. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. Rio de Janeiro, v.22, n. 2, p.161-168, mar. 2008.

LI, H. et al. Diterpenoids from aerial parts of *Flickingeria fimbriata* and their nuclear factor-kappa B inhibitory activities, **Phytochemistry**, Guangzhou v.117, p. 400-409, , jul. 2015.

LIMA-SARAIVA, et al. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura, **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, Pernambuco, v.1, n.1, p.1-11, set. 2015.

LIU, et al. Short-Chain Fatty Acids Suppress Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines Through Inhibition of NF- κ B Pathway in RAW264.7 **Cells**. **Inflammation**, Baoding, v.35, n.5, p. 1676-1684. out. 2012.

LIU, et al., Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. **Chemico Biological Interactions**, Shanghai, v.176, n.2, p.137-142, nov. 2008.

MARQUES et al., *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, Rio de Janeiro, v.109, n.2, p.1032-1047, nov. 2017.

MITROULIS, I. ; KAMBAS, K.; RITIS, K. Neutrophils, IL-1 β , and gout: is there a link?. **Seminars in Immunopathology**, v.35, n. 4, p.501-512, jan. 2013.

MOUNT, D. B. The kidney in hyperuricemia and gout. **Journal Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, Boston, v. 22, n.2, p.216–223, mar. 2013.

MURUGAIYAH, V.; CHAN, K-L. Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, Penang, v.124, n. 2, p. 233-239, jul. 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Products**, Pennsylvania, v.79, v.3, março. 2016.

NGUYEN, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Toyama v. 27, n.9, p.1414-1421, set. 2004.

NITBANI, et al. Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil (*Cocos nucifera* L). **Procedia Chemistry**, v. 48, p. 132-140, 2015.

NOVAES, G.S. Gota. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas**, Sorocaba, v. 10, n.2, p. 1 – 6, 2008.

OLIVEIRA, D. P. et al. Esterification of trans-aconitic acid improves its anti-inflammatory activity in LPS-induced acute arthritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Belo Horizonte, v.99. p 97-95, mar. 2018.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA A. C. D., MARQUES,L. C. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: Um paralelo entre a legislação e o mercado farmacêutico (1995–2015). **Revista Vigilância Sanitária em Debate**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p.139-148, dez. 2016.

Oliviero, F. , Scanu, A. , Zamudio-Cuevas, Y. , Punzi, L. and Spinella, P., Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. **Journal. Science. Food Agriculture**, n. 98, p. 1653-1659, set 2017.

OLSON, et al. Docosahexaenoic acid reduces inflammation and joint destruction in mice with collagen-induced arthritis. **Inflammation Research**, v.62, n.12, p. 1003-1013, set. 2013.

ORALLO, et al. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. **Journal of Leukocyte Biology**, Spain, v.75, fev. 2004.

OWEN, PL.; JOHNS, T. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. **Journal Ethnopharmacology**, Qué, v.64, n.2, p. 149-160, fev. 1999.

PAIVA-OLIVEIRA et al. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. Inflammasome and its clinical impact: literature review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.11, n.1, p.96-102, jan./abr. 2012.

PAVIA, et al., Introdução À Espectroscopia, 4ªed. São Paulo: Cengage Learning, 2010, p. 15-35,101-153,399.

PIERRI, E. G. et al. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Araraquara, v.27 n.4, p.495-501, maio. 2017.

PIERRI, Elaise Gonçalves. **Avaliação das atividades cicatrizante e anti-inflamatória de *Casearia sylvestris* Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos**. Araraquara, 2013. 125 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

PIMENTA, D.S. **Ecologia, cultivo e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Cham.&Schltdl.) Micheli (chapéu de couro)**. Rio de Janeiro: 2002. 176f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,2002.

POLUHA, Rodrigo Lorenzi; GROSSMANN, Eduardo. Mediadores inflamatórios relacionados às disfunções temporomandibulares artrogênicas. **BrJP**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 60-65, Mar. 2018 .

PRANDO, et al. Involvement of bradykinin B 2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli. **Phytomedicine**. Mato Grosso do Sul, v.23, n.11, p.1249–1258. Jan 2016.

RIBEIRO, M. H. L. et al. Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. **European Food Research and Technology**, Lisboa, v. 213, n.2, p.132-138, maio 2001.

RIDER, T.G.; JORDAN, K. M. The modern management of gout. **Rheumatology**. v. 49, n.4, p. 5-14. Jan. 2010.

ROTIMI, S. O.; ROTIMI, O. A.; OBEMBE, O. O. In silico analysis of compounds characterized from ethanolic extract of *Cucurbita pepo* with NF- κ B-inhibitory potential. Bangladesh **Journal of Pharmacology**, Nigeria, v.9, n.4, p. 551-556. out. 2014.

SABINA, E. P.; NAGAR, S.; RASOOL, M. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation--an experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**, v.34, n.3, p.184-192, jun.2011.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Anti-inflammatory activity of animal oils from the Peruvian Amazon, **Journal of Ethnopharmacology**, v.158, p.9-15, out. 2014.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **CELL**, Jupiter, v.163, n. 6, p.1297-1300, dez. 2015.

SHI et al, Uricosuric and nephroprotective properties of Ramulus Mori ethanol extract in hyperuricemic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Nanjing, v. 143, n.3, p.896-904, agost. 2012.

SILVA C.J., BASTOS J.K.; TAKAHASHI C.S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal Ethnopharmacology**, Ribeirão Preto, v.127, n.2, p. 445-450, out. 2009.

SINGH, M.; L. KAUSHIK, M. L. A Review on Treatments of Gout for Future Aspects. **Research & Reviews: A Journal of Pharmaceutical Science**, India v.8, n.3, 2017.

SNODGRASS R. G. et al. Docosahexaenoic acid and palmitic acid reciprocally modulate monocyte activation in part through endoplasmic reticulum stress, **Journal of Nutritional Biochemistry**. Frankfurt, v.32, p.39-45, jan. 2016.

Sociedade Brasileira de Reumatologia. Gota – Cartilha aos pacientes. Disponível em: <<http://www.reumatologia.com.br/PDFs/gota.pdf>> Acesso em 1 junho de 2016.

SOUZA et al., Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, Ouro Preto. v.142, n.3, jun. 2012.

STEHMANN, J. R. & SOBRAL, M. et al. Biodiversidade no Brasil. IN: In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 1 p.1-8.

TANAKA, **Constituintes químicos de Echinodorus e avaliação do β -pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados**. Campinas,2000. 331 f. Tese (Doutorado em química), Universidade Federal de Campinas, Instituto de Química, Campinas.

TERKELTAUB, et al., Gout Study Group: Update on hyperuricemia and gout, **Journal Joint Bone Spine**, California, v. 76, n.4, p. 444-446, jun 2009.

TRAN, Q. T. N.; WONG, W. S. F.; CHAI, C. L. L. Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents.**Pharmacological Research**, v.124, p. 43-63, out. 2017.

VICHAI, V.; KIRTIKARA. K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v.1, n. 3, p. 1112-1116, aug. 2006.

VIVOT, et al. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, Entre Ríos, v.72,n.1, p.65-71, jun. 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S; ZGAINSKI, E. M. Plant drug Analysis. Springer, 1993.

WEGENER, T. Utilidad dek jugo de sumidad de ortiga em el tratamiento de afecciones urológicas y reumatológicas, **Revista de Fitoterapia**, Alemanha, v11, n. 1, p 23-31, jul. 2011.

WU, D. et al. Palmitic acid exerts pro inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor α . **International Journal Of Molecular Medicine**. Shaanxi, v.34, n.6, p.1706-1712, set. 2014.

WU, et al. Antioxidant Activities and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of Extracts and Main Polyphenolic Compounds Obtained from *Geranium sibiricum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Harbin,v.58,n.8,p.4737-4743,2010.

ZHAO, G. et al. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Pensilvania, v.336, n.3,p 909-917, set. 2005.

ZHU, et al. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. **Journal of Ethnopharmacology**, Nanjiing, v.93,n.1, p. 133-140, jul.2004.

ZUANAZZI, J. A. S; MAYORGA, P. Fitoprodutos E Desenvolvimento Econômico. **Química Nova**, Porto Alegre, v. 33, n. 6, p.1421-1428, maio 2010.