UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo químico do extrato etanólico das folhas de *Murraya paniculata* (L.) Jack e avaliação da ação anti-inflamatória

CELIA MAGALY CASADO MARTÍN

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara - SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Estudo químico do extrato etanólico das folhas de *Murraya paniculata* (L.) Jack e avaliação da ação anti-inflamatória

Celia Magaly Casado Martín

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara - SP

2018

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

M379e

Martín, Celia Magaly Casado
Estudo químico do extrato etanólico das folhas de *Murraya paniculata* (L.) Jack e avaliação da ação anti-inflamatória / Celia Magaly Casado Martín. – Araraquara, 2018.
131 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. *Murraya paniculata*. 2. Fracionamento biomonitorado. 3. Atividade anti-inflamatória. 4. Atividade antioxidante. 5. Cumarina. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

CELIA MAGALY CASADO MARTIN

ESTUDO QUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE MURRAYA PANICULATA L. JACK E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 28 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS
Orientador

Prof. Dr. FABIO FERREIRA PERAZZO

Prof. Dr. ARISTEU GOMES TININIS

Prof. Dr. IGUATEMY LOURENCO BRUNETTI

Profa Dra. MAGALI CONCEIÇÃO MONTEIRO DA SILVA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão pelo amor, apoio e incentivo e a minha família toda,
que mesmo de longe sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dr. André Gonzaga dos Santos que desde o primeiro momento aceitou encarar este desafio. Agradeço seus ensinamentos, paciência, compreensão e apoio toda vez que precisei, sempre será um exemplo pessoal e profissional para mim.

À minha amiga e professora, Dra. Yamilet Irene Gutierrez Gaitén da Universidade de Havana, com quem comecei esse projeto, e aos estudantes de TCC e mestrado que nos acompanharam, obrigada também por fonercer o material vegetal.

A todo o pessoal do Laboratório de Farmacognosia, o técnico Caio, a Professora Raquel e todos os alunos que durante estes quase quatro anos me apoiaram sempre que precisei, Rogério, Elaise, Fernando, Isa, Juham, Ana Carolina, Flavio e especialmente a Gabi, que desde o primeiro dia e até hoje tem sido uma amiga maravilhosa, me ajudando em experimentos, corrigindo cada erro do meu português e fundamentalmente se convertendo quase em parte da minha família.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, a Dr. Renata Pires de Assis e a aluna de doutorado Tayra Ferreira que me ensinaram cada protocolo e acompanharam cada experimento realizado no Laboratório de Bioquímica e Enzimología Clínicas. Á professora Amanda e o resto das alunas e alunos do laboratório que também me acolheram com muito carinho e me apoiaram nos experimentos.

Á Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e ao mestrando Alan Bortinhon Orlando do Laboratório de Imunologia por disponibilizar tempo e recursos para contribuir ao meu trabalho.

Á Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira e as alunas do Laboratório de Mutagênese da UNIARA pela contribuição.

Às antigas técnicas do Laboratório Multiusuário do PADC, Cláudia, Jussara e Mari, por tantas horas de analise, além disso, pela amizade, por me ouvir em dias difíceis e por estar sempre ao pendente de mim ainda de longe.

Ao pessoal do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia pelo apoio, professores, técnicos e alunos de todos os laboratórios prestes sempre a brindar qualquer ajuda. Também professores, técnicos e alunos dos laboratórios de parasitologia, microbiologia, farmacotécnica, análise de alimentos, química farmacêutica, enfim qualquer canto da faculdade onde precisei de ajuda e sempre recebi.

Ao estudante de doutorado do IQ, Antonio Fernández, pelas analises de LC-MS e pela contribuição, também a todos meus colegas e amigos cubanos em Araraquara, tanto da FCFAR (Vivian, Alexander, Damiana) quanto do IQ (Michael, Daylin, Alexander, Yani, Maité, Chanfrau) e aos que mesmo fora da UNESP-Araraquara também formam parte da família mais próxima aqui no Brasil (Lesvi, Leonar, Patricia) e a tantos outros cubanos desde Botucatu, São Paulo até Rio de Janeiro, pelo apoio toda vez que precisei, pelas discussões e contribuições.

Às meninas da república, as que passaram e as que estão hoje, especialmente a Bruninha por tantas risadas e também pela ajuda a qualquer momento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade e a AUIP pela bolsa concedida para a realização do meu doutorado.

A todos os que de alguma forma contribuíram com meu trabalho.

RESUMO

Murraya paniculata L. Jack (Rutaceae) é uma árvore amplamente utilizada nas Américas como ornamental. Porém, esta espécie vegetal nativa da Índia é considerada medicinal na Ásia e reconhecida pelas propriedades adstringentes, estimulantes, analgésicas e anti-inflamatórias. Diversos estudos revelam a presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas e componentes do óleo essencial, fundamentalmente, e as propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e analgésicas foram observadas para extratos de *M. paniculata*. Fitoterápicos derivados da planta estão disponíveis no Sistema Nacional de Saúde cubano, como anti-inflamatórios, porém é limitado o conhecimento dos metabólitos secundários majoritários da espécie coletada em Cuba e sua relação com a atividade farmacológica. Neste contexto, foi desenvolvido este trabalho que teve como objetivo realizar o estudo químico do extrato etanólico de folhas de *M. paniculata*, a fim de contribuir com sua padronização e com o estabelecimento de especificações de qualidade com base na composição química e atividade anti-inflamatória. O fracionamento do extrato etanólico foi iniciado por extração em fase sólida fornecendo 4 frações. A fração EFSMp4 foi fracionada utilizando-se cromatografia em coluna. A purificação final das substâncias majoritárias obtidas a partir de EFSMp4 foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa de fase reversa. As frações, subfrações e substâncias purificadas foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e CLAE-ESI-MS. As substâncias purificadas foram identificadas através dos dados obtidos nas análises espectrométricas (RMN de ^{1}H e ^{13}C, IV, UV e EM). O extrato e as frações obtidas por extração em fase sólida foram submetidos aos ensaios de edema de pata e de pleurisia induzidos por carragenina, em ratos de linhagem Wistar e a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi realizada por vários métodos: ensaio de capacidade de captura do cátion radicalar $ABTS^{+\bullet}$ (derivado do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); ensaio de captura do ânion radical superóxido (O_2) e ensaio de captura do ácido hipocloroso (HClO) ou da Taurina-Cloramina. No caso do extrato e da fração EFSMp4 foram realizados ensaios de mutagenicidade. Adicionalmente a citotoxicidade da fração EFSMp4 e das substâncias purificadas foi avaliada através do ensaio com MTT em macrófagos (células RAW 264.7) nos quais também foi feita a quantificação de nitrito. A partir de neutrófilos (recrutados do peritônio de ratos Wistar sadios), foi avaliada *ex vivo* a função da enzima mieloperoxidase e a produção total de EROs. O extrato etanólico (300mg/Kg) e a fração EFSMp4 (150mg/Kg) apresentaram o melhor efeito anti-inflamatório pelo modelo de edema de pata, mostrando também o menor efeito ulcerogênico na mucosa gástrica dos animais tratados. Os resultados do experimento de pleurisia não foram conclusivos pois o modelo não permitiu obter resultados associados à atividade anti-inflamatória, porém mostrou evidências de um provável efeito hemorrágico de EFSMp4. Quanto à atividade antioxidante, nos experimentos nos quais conseguiu-se observar a resposta das amostras em estudo, o extrato etanólico e as frações EFSMp3 e EFSMp4 alcançaram os menores valores CE_{50}. Em relação à mutagenicidade foi observado que o extrato, bem como EFSMp4, atuaram induzindo potencial mutagênico nos experimentos sem e com ativação metabólica. Dois metabólitos majoritários de EFSMp4 foram isolados e

identificados como as cumarinas hidrato de meranzina e murpanidina, já relatadas em folhas da espécie. O hidrato de meranzina foi quantificado, representando um 8,4% (m/m) do EEMp. Os metabolitos não apresentaram citotoxicidade em macrófagos nas concentrações de 2,5-40,0 g/mL e as porcentagens de inibição de NO na concentração de 40,0 g/mL foram EFSMp4 (54%), murpanidina (30,1%) e hidrato de meranzina (8,0%). A identificação de outra cumarina da mesma classe das já purificadas foi proposta a partir análise por CLAE-ESI-MS (murralongina). Os resultados sugerem que as cumarinas constituem um grupo de metabólitos secundários majoritários no extrato etanólico, bem como sua relação com a ação anti-inflamatória do extrato.

Palavras-chave: *Murraya paniculata*. Fracionamento biomonitorado. Atividade anti-inflamatória. Atividade antioxidante. Cumarina.

ABSTRACT

Murraya paniculata L. Jack (Rutaceae) is a widely used tree in America as ornamental. However, this Indian native plant is considered medicinal in Asia and recognized by its astringent, stimulating, analgesic and anti-inflammatory properties. Several studies have revealed the presence of alkaloids, flavonoids, coumarins and essential oil components, fundamentally, and the antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and analgesic properties were observed for *M. paniculata* extracts. Phytotherapics derived from the plant are available in Cuban National Health System, as anti-inflammatory drugs, but knowledge of the major secondary metabolites of *M. paniculata* collected in Cuba and its relation to pharmacological activity is limited. In this context, the aim of this research was to study the ethanolic extract of *M. paniculata* leaves, in order to contribute to its standardization and to the establishment of quality specifications based on chemical composition and anti-inflammatory activity. Fractionation of the ethanolic extract was initiated by solid phase extraction yielding 4 fractions, the fraction EFSMp4 being fractionated using column chromatography. The final purification of the major components obtained from EFSMp4 was performed by preparative reverse phase high performance liquid chromatography. The fractions, subfractions and purified substances, were analyzed by CCD, CLAE-DAD and HPLC-ESI-MS. The purified substances were identified by the data obtained in the spectrometric analyzes (^{1}H and ^{13}C NMR, IR, UV and MS). The extract and fractions obtained by solid phase extraction were submitted to carrageenan-induced paw edema and pleurisy tests in Wistar rats and *in vitro* antioxidant activity evaluation was performed by several methods: radical cation $ABTS^{+\bullet}$ (2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) capture capacity test; superoxide radical anion capture test ($O2^{-\bullet}$) and hypochlorous acid (HClO) or Taurine-chloramine capture test. In the case of the extract and the EFSMp4 fraction, mutagenicity tests were performed. Additionally, the cytotoxicity of the EFSMp4 fraction and the purified substances was evaluated by the MTT assay on macrophages (RAW 264.7 cells) in which nitrite quantification was also performed. From neutrophils (recruited from the peritoneum of healthy Wistar rats), myeloperoxidase enzyme function and total ROS production were evaluated *ex vivo*. Ethanolic extract (300mg/kg) and EFSMp4 fraction (150mg/kg) presented the best anti-inflammatory effect by the paw edema model, also showing the lowest ulcerogenic effect on the gastric mucosa of treated animals. The results of the pleurisy experiment were not conclusive because the model did not showed results associated with the anti-inflammatory activity but showed evidence of a probable EFSMp4 hemorrhagic effect. As for the antioxidant activity, in the experiments in which it was possible to observe the response of the samples under study, the ethanol extract, EFSMp3 and EFSMp4 reached the lowest IC_{50} values. Regarding the mutagenicity, it was observed that the extract, as well as EFSMp4, acted to induce mutagenic potential in the experiments without and with metabolic activation. Two major metabolites of EFSMp4 were isolated and identified as the coumarins meranzine hydrate and murpanidine, already reported in leaves of the species. Meranzine hydrate was quantified representing a 8.4% (m/m) of EEMp. Macrophage cytotoxicity in the concentration range evaluated (2.5-40.0 g/mL) was not observed and NO inhibition percent at 40.0 µg/ml were EFSMp4

(54.0%), murpanidine (30.1%) and meranzine hydrate (8.0%). The identification of another coumarin of the same class of the two already purified was proposed from analysis by HPLC-ESI-MS (murralongin). The results suggest that coumarins are a group of major secondary metabolites in the ethanolic extract, as well as their relationship with the anti-inflammatory action of the extract.

Key-words: *Murraya paniculata*. Biomonitored fractionation. Anti-inflammatory activity. Antioxidant activity. Coumarin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt: acetato de etila
AINE: anti-inflamatório não-esteroidal
ATCC: *American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Cultura de Células)
C-18: sílica octadecilsilano
CC: cromatografia em coluna
CCD: cromatografia em camada delgada
CCMp: fração obtida em coluna cromatográfica de fase normal
CI_{50}: concentração capaz de provocar uma determinada inibição em 50 % do alvo
CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta/visível
CLAEprep: cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CMC: Carboximetilcelulose
COX: ciclo-oxigenase
COX-1: ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2: ciclo-oxigenase tipo 2
d: dupleto
dd: duplo dupleto
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)
EFS: extração em fase sólida
EM: espectrômetro de massas
ESI: ionização por eletrospray
EtOH: etanol
EEMp: Extrato etanólico de *M. paniculata*
EFSMp1: fração 1 da EFS
EFSMp2: fração 2 da EFS
EFSMp3: fração 3 da EFS
EFSMp4: fração 4 da EFS
ERON: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FE: fase estacionária
FM: fase móvel
FN: fase normal
FR: fase reversa
Hex: Hexano
IL: Interleucina
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
IV-FT: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
J: constante de acoplamento
λmáx: comprimento de onda máximo
LPS: lipopolissacarídeo
Me: metila
MeOH: metanol

MPO: mieloperxidase
NF-κB: fator nuclear-kappa B
NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)
NOX2: isoforma da enzima NADPH oxidasa (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase)
Metanol-d4: metanol deuterado
OMS: Organização Mundial de Saúde
PEG: Polietilenoglicol
PGE2: prostaglandina E2
PLA2: fosfolipase A2
PVDF: fluoreto de polivinildieno
RAW 264.7: macrófagos peritoneais aderentes derivados de camundongos Balb/c
Rf: fator de retenção
RMN: ressonância magnética nuclear
s: singleto
SPMp1: substância purificada 1
SPMp2: substância purificada 2
TNF: Fator de necrose tumoral
tR: tempo de retenção
UV/VIS: ultravioleta/ visível
Vm: volume morto
Veluente: Volume de eluente
Vinj: Volume de injeção
X: fator de correção de modo cromatográfico
λmáx: Comprimento de onda máximo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mediadores inflamatórios e seus efeitos. 10

Tabela 2. Parâmetros de qualidade da droga vegetal pulverizada (*M. paniculata*). 37

Tabela 3. Resíduo seco dos extratos obtidos segundo as condições de extração. 41

Tabela 4. Rendimento das frações obtidas mediante EFS. 52

Tabela 5. Massas e rendimento das sub-frações obtidas a partir de EFSMp4 63

Tabela 6. Dados espectrométricos de RMN obtidos para as substâncias purificadas SPMp1 e SPMp2 a 600 MHz para ^{1}H e a 150 MHz para ^{13}C, em metanol-d4. 72

Tabela 7. Dados das análises em CLAE-DAD do hidrato de meranzina para a construção da curva analítica. 75

Tabela 8. Dados obtidos na quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp. 75

Tabela 9. Efeito ulcerogênico do EEMp e das frações EFSMp. Os resultados representam o número médio de ulceras identificadas em cada grupo ± desvio padrão e o grau em que foram classificadas. 79

Tabela 10. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações do extrato de *M. paniculata*, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica 87

Tabela 11. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações da fração EFSMp4, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica 87

Tabela 12. Atividade citotóxica das amostras em estudo a concentrações de 40-1,25g/mL para macrófagos da linhagem RAW 264.7 determinadas pelo método MTT. 88

Tabela 13. Atividade citotóxica das amostras em estudo a concentrações de 10-0,3g/mL para macrófagos da linhagem RAW 264.7 determinadas pelo método MTT. 89

Tabela 14. Atividade citotóxica das amostras em estudo a concentrações de 40-2,5g/mL em neutrófilos peritoneais determinada pelo método MTT. 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *M. paniculata*: individuo adulto (**a**), detalhe de folhas (**b**), flores (**c**) e frutos (**d**). 4

Figura 2. Principais esqueletos básicos de classes de cumarinas isoladas de plantas. 7

Figura 3. Geração dos metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação. 9

Figura 4. Distribuição granulométrica da droga vegetal (pó originado na primeira moagem) de *M. paniculata*. 38

Figura 5 Distribuição granulométrica da droga vegetal (pó originado da segunda moagem após a primeira extração) de *M. paniculata*. 39

Figura 6. Diagrama do processo de extração. 40

Figura 7. Cromatograma de EEMp1 (3 mg/mL) registrado em 324 nm. 43

Figura 8. Cromatograma de EEMp2 (3 mg/mL) registrado em 324 nm. 44

Figura 9 Cromatograma de EEMp3 (3 mg/mL) registrado em 324 nm. 45

Figura 10. Cromatograma do EEMp (3 mg/mL) registrado em 324 nm (10a) e apresentando os valores de comprimento de onda máximo de absorção no UV para cada pico (10b). 46

Figura 11. Espectros no UV dos picos majoritários de EEMp (a: t_R= 19,57 min e b: t_R= 22,09 min). 47

Figura 12. Cromatograma do EEMp (3 mg/mL) registrado em 324 nm. 48

Figura 13. Cromatograma (BPC) do EEMp (3 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. 49

Figura 14: Espectros de massas ESI-MS^n no modo positivo para a substância com Tr= 17,6 min no EEMp. 50

Figura 15. Análise por CCD (sílica gel) das frações obtidas por EFS (EFSMp) utilizando tolueno:acetato de etila (93:7) como fase móvel. (a) – cromatoplaca observada sob luz UV 365 nm. (b) – cromatoplaca após revelação com anisaldeído sulfúrico. 51

Figura 16. Cromatogramas das frações EFSMp1 (1 mg/mL) registrado em 254 nm. 54

Figura 17. Cromatogramas das frações EFSMp2 (1 mg/mL) registrado em 324 nm. 55

Figura 18. Cromatogramas das frações EFSMp3 (1 mg/mL) registrado em 324 nm. 56

Figura 19. Cromatogramas das frações EFSMp4 (1 mg/mL) registrado em 324 nm. 57

Figura 20. Cromatograma (BPC) do EFSMp1 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. 58

Figura 21. Cromatograma (BPC) do EFSMp2 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. 59

Figura 22. Cromatograma (BPC) do EFSMp3 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. 60

Figura 23. Cromatograma (BPC) do EFSMp4 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. 61

Figura 24. Análise por CCD (sílica gel) de frações obtidas mediante CC de fase normal (CCMp) utilizando tolueno:acetato de etila:metanol (60:35:5) como fase móvel – cromatoplacas após revelação com anisaldeído sulfúrico. 64

Figura 18a) frações 1 a 16, 18b) frações 17 a 35, 18c) frações 36 a 54 e 18d) frações 55 a 70.
Figura 25. Cromatograma da fração CCMp16 registrado em 324 nm. 65
Figura 26. Cromatograma da fração CCMp24 registrado em 324 nm. 66
Figura 27. Cromatograma da fração CCMp44 registrado em 324 nm. 66
Figura 28. Cromatograma da fração CCMp51 registrado em 324 nm. 67
Figura 29. Espectro de absorção no UV para o pico majoritário 2 (t_R= 22,12 min) da fração CCMp44. 67
Figura 30. Cromatograma preparativo do procedimento de purificação de substâncias majoritárias. 68
Figura 31. Cromatogramas das substâncias purificadas SPMp1 (a) e SPMp2 (b). 69
Figura 32. Espectro de massas (ESI+, MS1) para substâncias purificadas: murpanidina (SPMp1) e hidrato de meranzina (SPMp2). 71
Figura 33. Estrutura da 7-metoxicumarina. 72
Figura 34. Estruturas propostas para as substâncias purificadas: a) murpanidina e b) hidrato de meranzina 72
Figura 35. Espectro de absorção no IV para substâncias purificadas: murpanidina (SPMp1) e hidrato de meranzina (SPMp2). 73
Figura 36. Curva analítica para solução padrão de hidrato de meranzina. 75
Figura 37. Efeito da administração oral do EEMp (300mg/Kg) e das frações EFSMp1 (20mg/Kg), EFSMp2 (30mg/Kg), EFSMp3 (25mg/Kg) e EFSMp4 (150mg/Kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina (200 µg/pata) em ratos. 76
Figura 38. Mucosa gástrica de animais submetidos aos ensaios de edema de pata. Grupo 1- Controle carragenina; Grupo 2- Controle indometacina; Grupo 3- EEMp (100mg/Kg); Grupo 4- EEMp (150mg/Kg) e Grupo 5- EEMp (300 mg/Kg) 78
Figura 39. Mucosa gástrica de animais submetidos aos ensaios de edema de pata. Grupo 1- Controle carragenina; Grupo 2- Controle indometacina; Grupo 3- EFSMp1 (20mg/Kg); Grupo 4- EFSMp2 (30 mg/Kg); Grupo 5- EFSMp3 (25 mg/Kg) e Grupo 6- EFSMp4 (150 mg/Kg). 78
Figura 40. Efeito da administração intrapleural de EEMp (300mg/Kg), EFSMp1 (20mg/Kg) e EFSMp2 (30mg/Kg), sobre a pleurisia induzida por carragenina em ratos. 80
Figura 41. Tubos contendo lavados pleurais coletados de animais pertences ao grupo tratado com EFSMp4 (150mg/Kg). 80
Figura 42. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EEMp (µg/mL). 82
Figura 43. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EFSMp2 (µg/mL). 82
Figura 44. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EFSMp3 (µg/mL). 83
Figura 45. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EFSMp4 (µg/mL). 83
Figura 46. Efeito das amostras em estudo sobre a inibição de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) *in vitro*. 89
Figura 47. Atividade de NOX2/MPO de neutrófilos peritoneais mediante quimiluminescência luminol-dependente. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). 91

Figura 48. Atividade de NOX2/MPO de neutrófilos peritoneais mediante quimiluminescência luminol-dependente. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). 92
Figura 49: Concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA 93
Figura 50: Concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA 94

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**1**
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	**4**
2.1	**Murraya paniculata (L.) Jack.**	**4**
2.1.1	Classificação taxonômica e descrição botânica	4
2.1.2	Habitat e distribuição	4
2.1.3	Fitoquímica e farmacologia	5
2.2	**Cumarinas**	**7**
2.3	**Processo Inflamatório**	**8**
2.3.1	Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais	11
2.3.2	Plantas com Atividade Anti-inflamatória	13
2.3.3	Estresse oxidativo e sua correlação com o processo inflamatório	14
3	**OBJETIVOS**	**16**
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	**17**
4.1	**Materiais, equipamentos e acessórios.**	**17**
4.2	**Material vegetal**	**19**
4.2.1	Obtenção e preparo da matéria-prima vegetal	19
4.2.2	Análise da matéria-prima vegetal	19
4.3	**Obtenção e análise do extrato, frações e substâncias prurificadas.**	**20**
4.3.1	Obtenção e análise do extrato etanólico	20
4.3.2	Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *M. paniculata* por extração em fase sólida EFS	21
4.3.3	Análises cromatográficas do extrato EEMp e frações EFSMp	22
4.3.4	Fracionamento de EFSMp4 por cromatografia em coluna de fase normal (CC) e análises das sub-frações CCMp	23
4.3.5	Purificação de metabolitos maioritários por CLAE-UV semipreparativa	24
4.3.6	Determinação estrutural das substâncias isoladas	25
4.3.7	Quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp	25
4.4	**Ensaios biológicos**	**26**
4.4.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de edema de pata em rato	26
4.4.2	Avaliação “in vivo” da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp por pleurisia	27
4.4.3	Avaliação “in vitro” da atividade antioxidante	28
4.4.4	Ensaios de mutagenicidade	30
4.4.5	Ensaios com macrófagos “in vitro”	31
4.4.6	Ensaios com neutrófilos “ex vivo”	34
4.4.7	Análise estatística	36
5	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**37**
5.1	**Análise do material vegetal**	**37**
5.2	**Obtenção e análise do extrato, frações e substâncias prurificadas.**	**39**
5.2.1	Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	41
5.2.2	Análises cromatográficas do extrato EEMp	46
5.2.3	Fracionamento do extrato etanólico de folhas de M. paniculata por extração em fase sólida (EFS) e análise das frações EFSMp	51

5.2.4 Fracionamento de EFSMp4 por cromatografia em coluna de fase normal (CC) e análises das sub-frações CCMp 62
5.2.5 Purificação de metabolitos maioritários por CLAE-UV semipreparativa 68
5.2.6 Determinação estrutural das substâncias isoladas 70
5.2.7 Quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp 75
5.3 Ensaios biológicos 76
5.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de edema de pata em rato 76
5.3.2 Avaliação “in vivo” da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp por pleurisia 79
5.3.3 Avaliação “in vitro” da atividade antioxidante 81
5.3.4 Ensaios de mutagenicidade 85
5.3.5 Ensaios com macrófagos “in vitro” 88
5.3.6 Ensaios com neutrófilos “ex vivo” 90
6 CONCLUSÕES 95
7 PERSPECTIVAS FUTURAS 97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 98
APÊNDICES 109
ANEXOS 113

1. INTRODUÇÃO

A utilização da medicina tradicional e complementar segue sendo ampliada na maioria dos países. Os dados disponíveis sugerem que esse mercado é substancial. De acordo com estimativas, em 2012, os produtos chineses de matéria médica representaram US$ 83,100 milhões, um aumento de mais de 20% em relação ao ano anterior. Na República da Coréia, as despesas anuais em medicina tradicional foram de US$ 4,400 milhões em 2004 e aumentaram para US$ 7,400 milhões em 2009. Em 2008, nos Estados Unidos, os usuários gastaram US$ 14,800 milhões na compra de produtos naturais. Apesar disso, em muitas partes do mundo, as instâncias normativas, os profissionais da saúde e o público estão levantando questões sobre a segurança, eficácia, qualidade, disponibilidade, preservação e regulamentação da medicina tradicional e complementar (OMS, 2013).

No caso do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, como parte da medicina tradicional e complementar, são especialmente importantes padrões de qualidade que garantam a segurança e eficácia adequadas para os consumidores.

Nesse sentido, os estudos de padronização de fitoterápicos nos últimos anos têm como objetivo correlacionar concentração e estabilidade dos marcadores químicos conhecidos com a atividade biológica, proporcionando um protocolo viável para a análise de qualquer produto à base de plantas (MOSIHUZZAMAN e CHOUDHARY, 2008; VENIL, 2010).

M. paniculata é uma arvore nativa da Índia que foi introduzida em vários países americanos, Cuba e Brasil entre eles, sendo largamente utilizada como arbusto ou árvore ornamental. Além disso, é considerada como planta medicinal nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia. As folhas, cascas e raízes desta planta têm sido usadas para tratar a diarreia, disenteria, reumatismo, erupções na pele e coceira. As flores são usadas na produção de produtos cosméticos (ROIG, 1988; GHANI, 2003; ROUT et al., 2007; MESQUITA et al., 2008; VARONA, 2013). É também reconhecida tradicionalmente por suas propriedades adstringentes, estimulantes, analgésicas e anti-inflamatórias, entre outras (ROIG, 1988; GHANI, 2003;

RAHMAN et al., 2010; NARKHEDE, 2012). A espécie é também conhecida pelas sinonímias botânicas de *Chalcas paniculata* L., *M. exotica* e pelos nomes comuns de árvore de jasmim-laranja, jasmim-da-pérsia, murta-de-cheiro, murallera e café-índio. O “Formulario Nacional de Fitofármacos y Apifármacos” de Cuba (MINSAP, 2014) refere-se ao uso do extrato hidroalcoólico na elaboração de um fitoterápico para uso tópico (fricção), com propriedades anti-inflamátorias e analgésicas.

Do ponto de vista das atividades biológicas, dados da literatura demonstram que *M. paniculata* apresentou atividade antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antidiarreica e analgésica (RAHMAN et al., 2010; KUMAR et al., 2011; SUNDARAM et al., 2011; NARKHEDE et al., 2012; RODANANT et al., 2012).

Estudos fitoquímicos revelam a presença nesta espécie de cumarinas, alcaloides e flavonoides, entre outros metabólitos secundários (KONG et al., 1985; ITO; FURIKAWA, 1990; FERRACIN et al., 1998; SHIMADA, 2002; KINOSHITA; NEGI et al., 2005; SAIED et al., 2008,). A espécie também contém óleo essencial em diferentes órgãos (ROUT et al., 2007; OLAWORE et al., 2005; CHOWDHURY et al., 2008; MESQUITA et al., 2008; JORGE et al., 2012). Em geral, os estudos preliminares do extrato etanólico das folhas da espécie, em plantas que crescem na região ocidental de Cuba, têm mostrado a partir do ponto de vista fitoquímico a presença, entre outros compostos, de copaeno, *β*-cubebeno, cariofileno, germacreno B, ostol, 6-fenil izoquinolina, sitosterol, L-prolina, ácido ferúlico e mio-inositol, para os quais são descritas na literatura propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Além disso, a avaliação pré-clínica inicial dos extratos, não mostrou nenhuma evidência de toxicidade cutânea aguda nos animais e corroborou o efeito anti-inflamatório (modelo de edema auricular), tradicionalmente reconhecido, com resultados próximos aos encontrados com benzidamina nas condições testadas (VARONA, 2013).

O uso tradicional de *M. paniculata* e os resultados dos trabalhos científicos já relatados constituem a fundamentação desta pesquisa, que visa o estudo químico-farmacológico do extrato etanólico das folhas de *M. paniculata* coletada em Cuba, que irá contribuir no estabelecimento de especificações de qualidade, com base na sua composição química e atividade farmacológica. Contribuindo com informação relevante à ação anti-inflamatória *in vivo* e os

prováveis mecanismos de ação, a partir da avaliação de mediadores do processo inflamatório, assim como de possíveis efeitos tóxicos, junto à determinação dos marcadores químicos ativos e o desenvolvimento de um método de análise para esses marcadores, a presente pesquisa estará contribuindo para uso racional, padronização e controle de qualidade adequado dos produtos derivados de *M. paniculata* já incluídos na Lista Básica de Medicamentos de Cuba (MINSAP, 2016),

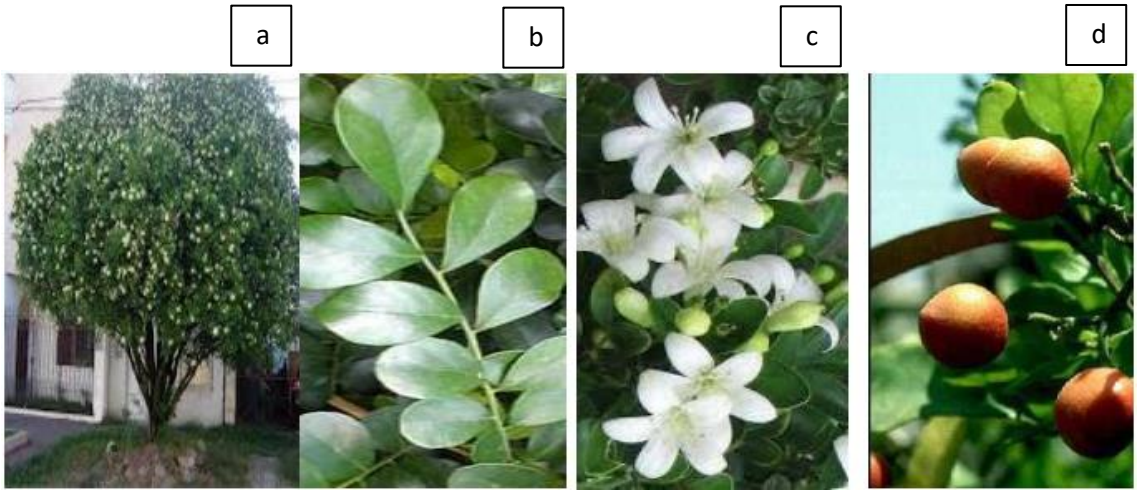
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Murraya paniculata (L.) Jack.

2.1.1 Classificação taxonômica e descrição botânica

Murraya paniculata (L.) Jack. (Figura 1) pertence à ordem das Sapindales e família Rutaceae (GBIF, 2016). É uma árvore perenifólia, de copa muito ramificada, densa e globosa, de tronco canelado, de 5-7 m de altura. As folhas são compostas pinadas, alternas, pecioladas, com 7-10 folíolos largo-elípticos e igualmente alternos, subcoriáceos, verde-escuros e brilhantes, de 2-4 cm de comprimento. As flores são brancas e muito perfumadas, reunidas em panículas curtas terminais. Os frutos são oblongos, do tipo drupa, vermelhos e lisos externamente, de pouco menos de 1 cm de comprimento, contendo polpa doce e aromática (pungente), com semente grande (KINUPP, 2014).

Figura 1: *M. paniculata*: individuo adulto (**a**), detalhe de folhas (**b**), flores (**c**) e frutos (**d**).



Fonte: SÁNCHEZ, 2015.

2.1.2 Habitat e distribuição

M. paniculata é nativa da China, Índia, Sri Lanka, Vietnã, Laos, Nordeste da Austrália e Taiwan, além disso, pode-se adaptar a países tropicais (PARROTTA, 2001). Em Cuba é uma das plantas mais comuns em quintais e jardins, muito utilizada para formar cercas vivas. Devido à fácil propagação por sementes, tornou-se espontânea em muitos lugares, cultivada nas Antilhas e na América tropical

continental (ROIG, 1988). Esta espécie se adapta a uma ampla gama de condições. Cresce em lugares ao nível do mar e até elevações de 1.300m. Próspera em solos bem drenados e sedimentares. Resiste a temperaturas de -4 °C e pode-se desenvolver tanto na sombra quanto em lugares iluminados (DESERT-TROPICALS, 2002; PACIFIC ISLAND ECOSYSTEMS AT RISK, 2002; CASADO et al., 2011).

2.1.3 Fitoquímica e farmacologia

Os dados da literatura sobre estudos fitoquímicos revelam a presença de alcaloides de núcleo indólico como o yuehchukeno e o paniculol nas raízes (KONG et al, 1985; ITO e FURIKAWA, 1990). Nas folhas foram identificados isoflavonoides tais como: daidzina, glicitina, genistina, daidzeina, formononetina, biochanin A (LAPCIK et al., 2004). Também em folhas foram identificados flavonoides polimetoxilados: dihidroxi-trihidroxiflavona, monohidroxi-trihidroxiflavona, trihidroxi-dimetoxiflavona, trihidroxi-trimetoxiflavona, dihidroxi-trimetoxiflavona, trihidroxi-tetrametoxiflavona, dihidroxi-tetrahidroxiflavona (ZHANG et al., 2011). Na casca e na polpa dos frutos frescos foram encontrados os flavonoides seguintes: 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavanonol, 5,6,7,3',4',5'-hexametoxiflavona, 3,5,6,7,3',4',5'-heptametoxiflavona, 5,7,8,3'4',5'-hexametoxiflavona, 3,5,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona, 3,5,7,8,3',4'-hexametoxiflavona, 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona, 5-hidroxi-3,7,8,3',4',5'-hexametoxiflavona e 8-hidroxi-3,5,7,3',4',5'-hexametoxiflavona (FERRACIN et al., 1998). Das partes aéreas da planta foram isoladas as cumarinas 1',2'-*O*-isopropilideno murrangatina (SAIED et al., 2008), onfamurrayina (KINOSHITA e SHIMADA, 2002), murramarina A e bismurragantina (NEGI et al., 2005).

A espécie também contém óleo essencial, cuja composição varia dependendo do órgão da planta e a origem geográfica. O óleo essencial de folhas e frutos de espécimens de *M. paniculata* que crescem na Nigéria são ricos em sesquiterpenos e os principais compostos das folhas são *β*-ciclocitral, salicilato de metila, *trans*-nerolidiol, *α*- e *β*-cubebeno, cubenol e isogermacreno; os frutos contêm *β*-cariofileno, zingibereno, germacreno D, *α*-copaeno e *α*-humuleno (OLAWORE et al., 2005). As folhas de espécimens de Bangladesh contêm óleos essenciais ricos em óxido de cariofileno, *β*-cariofileno, espatulenol, *β*-elemeno, germacreno D e 4-metileno-6-(1-propenilideno)-ciclooctano (CHOWDHURY et al., 2008; MESQUITA et al., 2008). Um estudo do óleo essencial obtido das folhas das espécies cultivadas em áreas

montanhosas da parte central de Cuba mostrou a presença de *β*-cariofileno (29,8%), *β*-cubebeno (5,3%), *δ*-cadineno (5,6%) e germacreno D (4,2%), entre outros (JORGE et al., 2012). As flores têm como componentes principais o *δ*-elemeno, *β*-cariofileno, germacreno D, nerolidol, benzoato de benzila, benzoato de feniletila e manol (ROUT et al., 2007).

Do ponto de vista das atividades biológicas, vários estudos mostraram atividade para os extratos de *M. paniculata*: atividade antioxidante (SUNDARAM et al., 2011), antinociceptiva, anti-inflamatória (NARKHEDE et al., 2012; RODANANT et al., 2012). Kumar et al. (2011) demonstraram a ação analgésica do extrato de éter de petróleo: acetato de etila: metanol (1:1:1), a partir da casca do caule da espécie. Outro estudo fitoquímico levou ao isolamento do alcaloide carbazólico, isomurrayafolina B, que mostrou atividade analgésica profunda em modelos de dor periférico e central (FAZAL et al., 2014). O óleo essencial também mostrou atividade anti-inflamatória e analgésica (DASH et al., 2004).

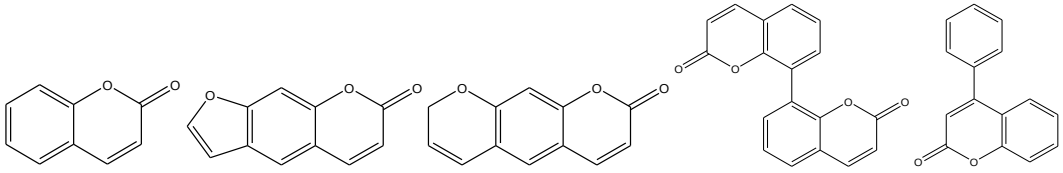
Vários estudos mostraram outras atividades e potenciais efeitos farmacológicos para as folhas de *M. paniculata:* atividade antidiarreica (RAHMAN et al., 2010), o extrato de clorofórmio apresentou ação contra *Entamoeba histolytica* (SAWANGJAROEN et al., 2006), resultados publicados em 2014 sugerem que os flavonoides extraídos das folhas de *M. paniculata* tem um efeito protetor contra danos renais na nefropatia diabética (JINGTAO et al., 2014). Também muito importante destacar a presença de trigonelina nesta espécie vegetal. Além das sementes de leguminosas e o café (*Coffea arabica* L.), apenas algumas espécies acumulam elevadas concentrações de trigonelina e resultados recentes mostram a *M. paniculata* entre estes. A trigonelina foi encontrada em todas as partes da planta, fundamentalmente nas folhas (70%) (ASHIHARA e WATANABE, 2014). Este composto bioativo tem atividade hipoglicêmica, hipolipidêmica, neuroprotetora, sedativa, ajuda a melhorar a memória e tem atividade antibacteriana, antiviral e antitumoral e demonstrou reduzir a neuropatia diabética auditiva e a agregação de plaquetária (ZHOU et al., 2012). Além disso, foi observado o efeito vasorrelaxante da fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas da planta e duas cumarinas foram isoladas a partir desta fração - kimcuongina e murracarpina – sendo que ambas mostraram atividade vasorrelaxante com valores de IC_{50} de 37,7 µM e 139,3 µM, respectivamente (NGUYEN et al., 2014).

O óleo essencial mostrou atividade inseticida (QING et al., 2010), antibacteriana contra *Escherichia coli, Proteus mirabilis, Salmonella typha, Enterobacter aerogenes* e *Shigella flexineri* bem como antifúngica (SUNDARAM et al., 2011).

2.2 Cumarinas

As cumarinas (também conhecidas como 1,2-benzopironas ou, menos comumente, como ácido-8-lactona *o*-hidroxicinâmico), constituem uma classe importante e grande de heterociclos de oxigênio, frequentemente encontrados como metabólitos secundários de plantas. Muitas cumarinas são oxigenadas na posição C-7, a 7-hidroxicumarina, comumente conhecida como umbeliferona, muitas vezes é considerada como o precursor biogenético de cumarinas mais complexas. As principais classes de cumarinas isoladas de plantas (Figura 2) podem ser categorizadas da seguinte forma: (1) cumarinas simples, (2) furanocumarinas, (3) piranocumarinas, (4) dicumarinas e (5) outras como fenilcumarinas (WU et al., 2009; MATOS et al., 2015).

Figura 2: Principais esqueletos básicos de classes de cumarinas isoladas de plantas.



1 2 3 4 5

É a grande diversidade estrutural dos compostos cumarínicos que permite suas diversas aplicações e também permite o alto interesse desses derivados como fitoquímicos. As propriedades farmacológicas e bioquímicas e as aplicações terapêuticas de cumarinas simples dependem do padrão de substituição. Uma vez que as substituições podem ocorrer em qualquer um dos seis sitios disponíveis do núcleo básico da cumarina, sua diversidade estrutural leva a múltiplas propriedades biológicas. As diversas funções biológicas das cumarinas incluem anti-leucemia, anti-inflamatória, anti-agregação plaquetária, anti-câncer, anticonvulsivante, imunomoduladoras e analgésicas. Vários esforços foram feitos principalmente no desenvolvimento de agentes anticoagulantes, antioxidantes, antimicrobianos (anti-virais, antifúngicos e antiparasitários), anticancerígenos, antidiabéticos, analgésicos,

anti-neurodegenerativos e antiinflamatórios (WU et al., 2009; MATOS et al., 2015; 2017).

2.3 Processo Inflamatório

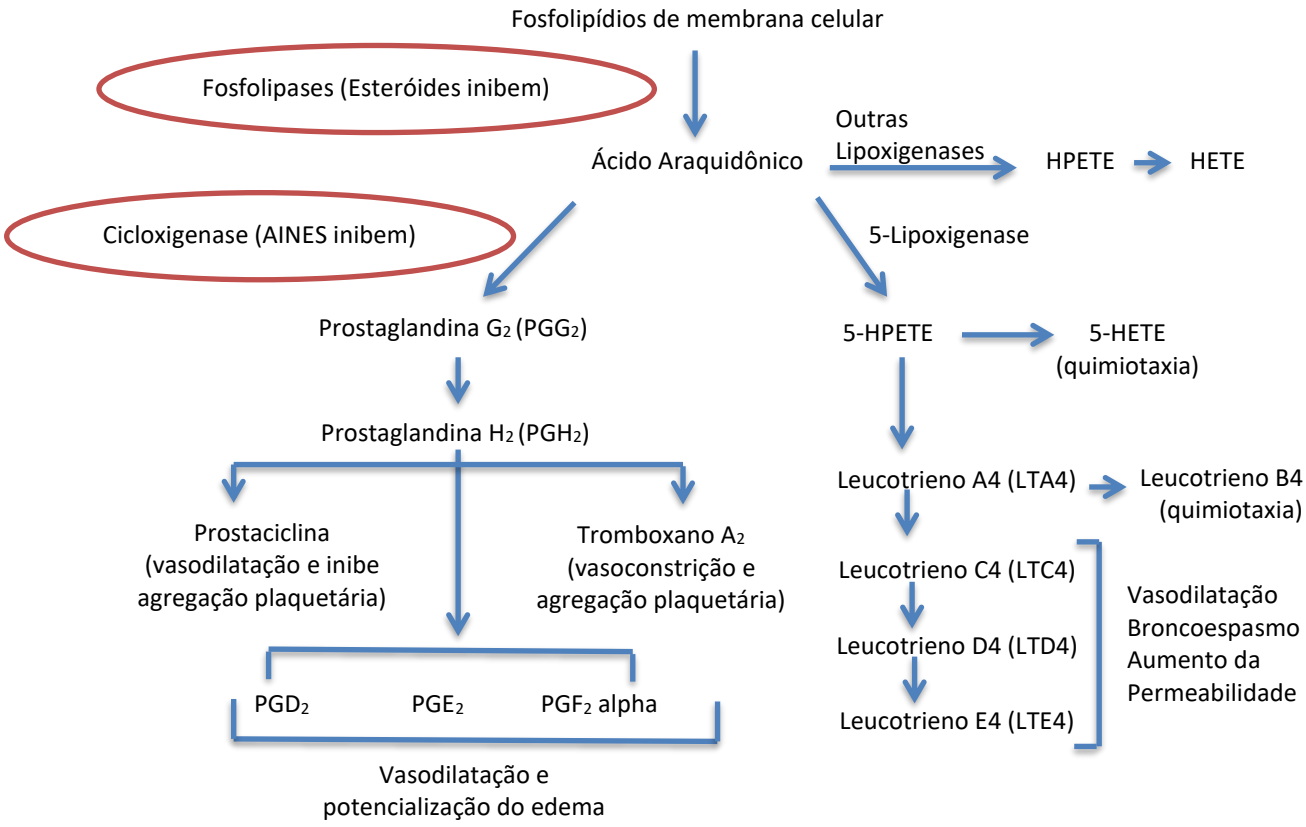
O processo inflamatório é uma resposta fisiopatológica à infecção ou danos nos tecidos. A fim de neutralizar o agente causante, o sistema imune inato lança um programa que se desdobra em várias fases (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010). Inicialmente, as células do tecido residente do sistema imune inato detectam a injúria e dão alarme aos neutrófilos circulantes. Estes migram para o tecido inflamado, promovendo o recrutamento de monócitos inflamatórios e potencializando o ambiente pro-inflamatório, permitindo lidar adequadamente com a inflamação (MANTOVANI et al., 2011). Sob condições normais, os neutrófilos sofrem apoptose depois de realizar sua ação no local inflamado (FOX et al., 2010) e os macrófagos ingerem os neutrófilos apoptóticos. A remoção de neutrófilos apoptóticos induz à mudança do fenótipo de macrófagos de pro- a anti-inflamatórios (FADOK et al., 1998; MICHLEWSKA et al., 2009), que é um pré-requisito para a saída de macrófagos através dos vasos linfáticos, favorecendo o retorno para a homeostase do tecido.

A inflamação pode ser aguda ou crônica, dependendo da natureza do estímulo e da efetividade da reação inicial em eliminar o estímulo ou os tecidos danificados. A inflamação aguda é rápida no início (tipicamente minutos) e de curta duração, persistindo por horas ou poucos dias. Suas principais características são a exsudação de fluido e proteínas do plasma (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos (também chamados de leucócitos polimorfonucleares). Quando a inflamação aguda é bem-sucedida na eliminação dos agentes agressores, a reação reduz-se, mas se a resposta falha em limpar os agentes invasores, ela pode progredir para a fase crônica. A inflamação crônica pode seguir à inflamação aguda ou ser insidiosa no início. Ela é de longa duração e está associada à presença dos linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual (KUMAR et al, 2010).

Os dois tipos celulares mais importantes na resposta inflamatória aguda são os mastócitos e os macrófagos teciduais. Essas células “sentinelas” estão estacionadas em tecidos para reconhecer rapidamente estímulos potencialmente injuriantes e iniciar a reação de defesa do hospedeiro. Os mastócitos reagem ao

trauma físico, produtos da quebra do complemento, produtos microbianos e neuropeptídios. Essas células liberam histamina, leucotrienos, enzimas e muitas citocinas (incluindo Fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1) e quimosinas), todos estes contribuindo para a inflamação. Os macrófagos reconhecem os produtos microbianos e secretam a maioria das citocinas importantes na inflamação aguda. Quando as células são ativadas por diversos estímulos, tais como produtos microbianos e vários mediadores da inflamação, o ácido araquidônico (AA) da membrana é rapidamente convertido pelas ações de enzimas para produzir as prostaglandinas e os leucotrienos (Figura 3). Esses mediadores lipídicos biologicamente ativos servem como sinais intracelulares ou extracelulares para afetar uma variedade de processos biológicos, incluindo inflamação e hemostasia (KUMAR et al, 2010).

Figura 3. Geração dos metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação. Principais alvos moleculares das ações de alguns fármacos anti-inflamatórios são indicados em vermelho. AINES, anti-inflamatorios não esteroidais; HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenoico.



Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2010).

Existe um sistema de controle e balanço que regula as ações dos mediadores da inflamação. A Tabela 1 (KUMAR et al, 2010) apresenta as ações dos principaís mediadores da inflamação.

Tabela 1. Mediadores inflamatórios e seus efeitos.

Mediador	Principais Fontes	Ações
DERIVADOS DE CÉLULA		
Histamina	Mastócitos, basófilos, plaquetas	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, ativação endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada
Prostaglandinas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, dor, febre
Leucotrienos	Mastócitos, leucócitos	Permeabilidade vascular aumentada, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócito
Fator ativador de plaquetas	Leucócitos, mastócitos	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, adesão de leucócito, quimiotaxia, desgranulação, explosão oxidativa
Espécies reativas de oxigênio	Leucócitos	Morte dos micróbios, dano tecidual
Óxido nítrico	Endotélio, macrófagos	Relaxamento do músculo liso vascular, morte dos micróbios
Citocinas (TNF, IL-1)	Macrófagos, células endoteliais, mastócitos	Ativação endotelial local (expressão de moléculas de adesão), febre/dor/anorexia/hipotensão, resistência vascular diminuída (choque)
Quimiocinas	Leucócitos, macrófagos ativados	Quimiotaxia, ativação de leucócito
DERIVADOS DE PROTEÍNA DO PLASMA		
Produtos do complemento (C5a, C3a, C4a)	Plasma (produzido no fígado)	Quimiotaxia e ativação de leucócito, vasodilatação (estimulação de mastócito)
Cininas	Plasma (produzido no fígado)	Permeabilidade vascular aumentada, contração de músculo liso, vasodilatação, dor
Proteases ativadas durante a coagulação	Plasma (produzido no fígado)	Ativação endotelial, recrutamento de leucócito

IL-1, interleucina-1; MAC, complexo de ataque à membrana; TNF, fator de necrose tumoral.

As drogas anti-inflamatórias tentam reduzir ou prevenir a reação inflamatória, efeito que pode ser exercido atuando diretamente sobre as células inflamatórias ou antagonizando a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela resposta inflamatória.

2.3.1 Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) estão entre os produtos farmacêuticos mais prevalentes do mundo, com cerca de 30 bilhões de doses tomadas anualmente somente nos Estados Unidos (SMITH et al., 2017). Têm uma variedade de usos clínicos como antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios. Eles reduzem a temperatura do corpo em estados febris e, portanto, são antipiréticos efetivos. Eles também são úteis como analgésicos, aliviando a dor leve a moderada, como mialgia, dor dental, dismenorréia e dor de cabeça. Como agentes anti-inflamatórios, os AINE são usados para tratar condições como a tensão muscular, tendinite e bursites. Também são usados para tratar a dor crônica e inflamação da artrite reumatóide (adulto e juvenil), osteoartrite e variantes artríticas, como artrite gotosa e espondilite anquilosante.

As ações anti-inflamatórias dos AINE são explicadas pela inibição da síntese de prostaglandinas pela COX-2. A isoforma COX-2 é a COX predominante na produção de prostaglandinas durante processos inflamatórios. As prostaglandinas da série E e F evocam algumas das manifestações locais e sistêmicas da inflamação, como vasodilatação, hiperemia, aumento da permeabilidade vascular, inchaço, dor e aumento da migração de leucócitos. Além disso, eles intensificam os efeitos de mediadores inflamatórios, como histamina, bradicinina e 5-hidroxitriptamina. Todos os AINE, exceto os agentes seletivos da COX-2, inibem ambas as isoformas COX, sendo que o grau de inibição da COX-1 varia de fármaco para fármaco (CRAIG e STITZEL et al., 1997).

Mesmo que em comparação com placebos os fármacos antiinflamatórios não esteroidais reduzam significativamente a dor em pacientes com artrite, dor lombar e dor nos tecidos moles, esse grupo de fármacos também têm efeitos adversos importantes, incluindo hemorragias gastrointestinais, úlcera péptica, hipertensão, edema e doença renal. Mais recentemente, alguns AINEs também foram associados a um risco aumentado de infarto do miocárdio (McDONAGH, 2010).

A toxicidade comumente causada pelos AINE resulta da inibição da síntese de prostaglandinas. A capacidade dos AINE para aumentar a secreção de ácido gástrico e inibir a coagulação do sangue pode levar à toxicidade gastrointestinal. Reações leves, como azia e indigestão, podem ser diminuídas ajustando a dosagem, usando antiácidos ou administrando os medicamentos após as refeições. A perda oculta de sangue do trato gastrointestinal e anemia ferropriva também é

possível. Uma toxicidade mais grave pode resultar da terapia prolongada com AINEs, incluindo ulceração peptica e hemorragia. Os AINE podem também prejudicar a função renal, causar retenção de líquidos e provocar reações de hipersensibilidade, incluindo broncoespasmo, agravamento de asma, urticária, pólipos nasais e, raramente, reações anafilactóides.

O espectro de toxicidade produzido por cada um está relacionado à sua inibição de isoformas COX específicas. Os primeiros AINE desenvolvidos inibem ambas as isoformas da COX, alguns são mais específicos para COX-1, enquanto outros inibem COX-1 e COX-2 com potência aproximadamente igual. Mais recentemente, os fármacos desenvolvidos inibem seletivamente a COX-2 e, portanto, não provocam efeitos colaterais gastrointestinais e antiplaquetários comuns a drogas que inibem a COX-1. Os efeitos adversos que não estão inequivocamente relacionados com a inibição da síntese de prostaglandinas incluem efeitos hepáticos (hepatite, necrose hepática, icterícia colestática, aumento das aminotransferases no soro), efeitos dérmicos (fotosensibilidades, síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica, onicólise), efeitos do sistema nervoso central (dores de cabeça, tonturas, zumbido, surdez, sonolência, confusão, nervosismo, aumento da sudação, meningite asséptica), efeitos oculares (ambliopia tóxica, distúrbios da retina) e certos efeitos renais (nefrite intersticial aguda, necrose papilar aguda) (CRAIG e STITZEL et al., 1997).

Embora o papel dos AINE como inibidores da COX esteja bem estabelecido, outros alvos também podem contribuir para a inflamação. Ainda não está clara a existência e as contribuições de alvos adicionais que possam contribuir nos mecanismos anti-inflamatórios, aplicações e a ocorrência de reações adversas a medicamentos. Os alvos mais relatados incluem a inibição do fator nuclear kB (NF-kB), a inibição da função do proteassoma, a ativação de vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose, a parada do ciclo celular e a ativação de quinases por estresse. Um estudo recente identificou proteases cisteína-aspárticas (caspases) como novos alvos para alguns AINE, como ibuprofeno e naproxeno, em concentrações fisiológicas. Durante a inflamação, estes AINEs inibem a atividade catalítica da caspase, reduzindo a morte celular e a indução de citocinas inflamatórias. Além disso, a inibição de caspases foi COX independente, representando um novo mecanismo anti-inflamatório. Esta descoberta se expande sobre os comportamentos anti-inflamatórios dos AINE existentes, com implicações

para a segurança do paciente e o planejamento de fármacos da próxima geração (SMITH et al., 2017).

2.3.2 Plantas com Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória de produtos naturais foi relatada em vários estudos e observada em numerosas avaliações pré-clínicas (RAVIPATI et al., 2012). Dados da literatura referentes a pesquisas anti-inflamatórias demonstraram que os extratos bioativos e os produtos naturais exercem suas propriedades biológicas ao bloquear fundamentalmente duas vias de sinalização: NF-κB e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) que têm o papel principal na produção de vários mediadores pro-inflamatórios (ARULSELVAN et al., 2016).

São muitas as plantas medicinais usadas tradicionalmente como anti-inflamatórias e muitas as que têm sido estudadas quimicamente e farmacologicamente para conseguir identificar seus constituintes ativos e estabelecer o mecanismo pelo qual conseguem exercer o efeito terapêutico. Alguns exemplos foram referidos por Arulselvan et al (2016):

- *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) é uma espécie medicinal chinesa usada para tratar várias doenças associadas à inflamação. De acordo com Sogo et al. (2015), para o composto ativo, delfinidina-3-sambubiosídeo (Dp3-Sam), uma antocianina isolada a partir de cálices secos, foi comprovado o efeito anticancerígeno contra células de leucemia humana. Além disso, descobriram que as agliconas de antocianina, especialmente a delfinidina (Dp) e a cianidina (Cy), inibem efetivamente a expressão de mediadores inflamatórios, incluindo COX-2 e PGE2. No mecanismo descrito o composto ativo, Dp3-Sam, interferiu significantemente na via NF-κB e na sinalização ERK1 / 2 através da supressão de numerosos mediadores inflamatórios.
- *Matricaria recutita* L. pertence à família Asteraceae e tem sido utilizada há séculos para tratar numerosas doenças inflamatórias. As vantagens do uso de preparações de camomila estão ligadas à presença de metabólitos de várias classes, incluindo flavonoides, cumarinas, proazulenos e o óleo essencial. O componente mais ativo é o guaianólido matricina (presente nas flores), com atividade anti-inflamatória significativa, inibe o gene ICAM-1, as moléculas de sinalização NF-κB, e a expressão da proteína induzida por TNF-α e LPS em células endoteliais (FLEMMING et al., 2015; GERRITSEN, 1995).
- *Moringa oleifera* Lam. da família Moringaceae é bem conhecida como "a árvore do milagre" e agora amplamente distribuída em muitas áreas tropicais e subtropicais.

Vários pesquisadores relataram que extratos metanólicos, hidrometanólicos e hidroetanólicos de folhas, raízes, vagens, sementes, frutos e flores, possuem atividade anti-inflamatória. Os efeitos anti-inflamatórios foram avaliados através de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS e os resultados indicam que *M. oleifera* reprimiu efetivamente a produção de mediadores inflamatórios como NO, citocinas pro-inflamatórias (IL-6, IL-1β e TNF-α) e PGE2. Também reduziu a expressão de marcadores inflamatórios que incluem NF-κB, iNOS e COX-2 (ARULSELVAN et al., 2015; MUANGNOI et al., 2012; LEE et al., 2013; ADEDAPO et al., 2015; FARD et al., 2015).

2.3.3 Estresse oxidativo e sua correlação com o processo inflamatório

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares é resultante do metabolismo de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase, entre outras) e não enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de compostos antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA et al., 2010).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é fundamental para a progressão de muitas doenças inflamatórias. As ERO são produzidas por células que estão envolvidas na resposta de defesa do hospedeiro, como os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e promovem a disfunção endotelial por oxidação de proteínas de sinalização celulares cruciais, como as tirosina-fosfatases. Há consenso de que as ERO estão fundamentalmente envolvidas nos processos inflamatórios atuando tanto como espécimes quimicos de sinalização quanto mediadores da inflamação, mas como elas contribuem para a resposta e se a terapia antioxidante é um meio válido para o tratamento da inflamação em pacientes, são questões que permanecem em grande parte sem serem resolvidas (BECKMAN, 1996; MITTAL et al, 2014).

As células inflamatórias, incluindo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos geralmente são consideradas a principal fonte de ERO na inflamação. Estes leucócitos expressam NADPH oxidase e óxido nítrico sintase, que podem gerar ERON em quantidades substanciais. NADPH oxidase catalisa a transferência de um

elétron de NADPH para reduzir o oxigênio molecular para o ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$). O ânion radical superóxido pode dismutar espontaneamente a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas a superóxido dismutase (SOD), um “tampão” natural contra o $O_2^{-\bullet}$ citoplasmático, catalisa a reação acelerando a dismutação. Tanto $O_2^{-\bullet}$ como H_2O_2 podem reagir e produzir ERO ainda mais reativas, tais como o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$). As moléculas presentes em quantidades aumentadas incluindo citocinas, quimiocinas, mediadores de lipídios, fragmentos de complemento, fragmentos de fatores de coagulação e lipopolisacarídeos (LPS), na inflamação, são capazes de desativar/ativar leucócitos para gerar ERO. Esta produção de ERO denominada "explosão respiratória" devido a um consumo maior e transitório de oxigênio, é crucial para a ação bactericida dos leucócitos (NAGATA, 2005).

A pesquisa intensiva sobre os mecanismos da inflamação nos últimos anos descreveu os contornos da intrincada relação entre estresse oxidativo e inflamação. A depuração de agentes patogênicos do corpo é o principal objetivo da inflamação para a qual as ERO geradas nas células fagocíticas desempenha um papel fundamental. Porém as ERO produzidas por células inflamatórias, incluindo neutrófilos e eosinófilos, também podem oxidar uma variedade de substratos biológicos, com uma ampla gama de efeitos tóxicos e prejudiciais. Além de danificar diretamente os tecidos, tem sido encontradas ERO participando em várias vias de transdução de sinal em células inflamatórias. Por exemplo, o estresse oxidativo parece ser crítico na ativação do fator nuclear kB (NF-kB), com base em muitas observações que a ativação NF-κB induzida por citocinas pode ser prevenida por tratamento com antioxidantes ou quelantes de metais. De qualquer forma os níveis de ERO no ambiente celular são importantes para a homeostase das células; enquanto que níveis excessivos de ERO são importantes na morte de agentes patogênicos. Se as ERO não são controladas por uma série de mecanismos antioxidantes sofisticados, isso leva a lesões teciduais inflamatórias. A maquinaria antioxidante da célula, portanto, desempenha um papel essencial na criação desse equilíbrio intrincado (MITTAL et al., 2014, NAGATA, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo químico e da ação anti-inflamátoria do extrato etanólico das folhas de *M. paniculata*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver o fracionamento biomonitorado pela atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico das folhas de *M. paniculata*, para selecionar metabólitos secundários como marcadores ativos do extrato;

2. Investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório das frações de interesse e dos metabólitos secundários purificados;

3. Avaliar por métodos *in vitro* e *ex vivo* a atividade antioxidante do extrato, frações e/ou metabólitos secundários;

4. Avaliar a mutagenicidade do extrato e frações de interesse.

5. Avaliar a citotoxicidade das frações de interesse e dos metabólitos secundários majoritários ou marcadores químicos ativos identificados;

6. Desenvolver método analítico para identificação e quantificação dos marcadores químicos do extrato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Balança analítica 1: Marte®, modelo AY220 (Max 220 g. min 0,01 g; d = 0,0001 g).

Balança analítica 2: Sartorius (Max 210 g. min 0,01 g; d = 0,0001 g).

Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ®C18 (15 x 10 mm; 55 µm).

Coluna cromatográfica de bancada: colunas de vidro com d.i. de 2,0; 5,0 e 10 cm; equipadas com torneira teflon.

Coluna cromatográfica para CLAE-UV semipreparativa: Agilent® Eclipse XDB C18 (250 x 21 ,20 mm x 7 µm).

Coluna cromatográfica para CLAE-UV analítica: Agilent® Hypersil ODS C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm).

Coluna cromatográfica para CLAE-DAD-IES-EM: Phenomenex®, Luna C18 (250 x 4,6 mm, x 5 µm).

Cromatografia em camada delgada: placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 20 x 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1: Cromatógrafo líquido Perkin Elmer Flexar®, modo analítico e semipreparativo, com injetor manual e detectores UV/Vis e DAD.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2: Cromatógrafo líquido Shimadzu® Prominence (Kyoto, Japão), modo analítico, com injetor automático, acopladado a espectrômetro de massas 2: Bruker®, Amazon SL dotado de interface electrospray (ESI).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 3: Cromatógrafo líquido Acquity Arc® (Waters®, USA), modo analítico, com injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD).

Espectrômetro de massas: Waters Micromass Quatro Micro™, a aquisição de dados foi realizada pelo software Masslynx (Waters®, EUA). Instrumento triplo quadripolo (MS/MS) e sistema ionização de eletro-spray.

Espectrofotômetro no IV: Bruker®, modelo IV-FT – Tensor 27.

Espectrômetro de RMN: Bruker®, Fourier 300 7,0 T, operando a 600 MHz para ^{1}H e 150 MHz para ^{13}C.

Fases estacionárias utilizadas em EFS e CC:

a) Sílica gel: Sigma-Aldrich®, 63-200 µm; 60 Å; Sigma-Aldrich®, 40-63µm.

b) Sílica C-18: Discovery®, 40-63 µm.

Moinho de facas 1: IKA® A 11 basic.

Moinho de facas 2: Tecnal®, modelo TE 148.

Rotaevaporador 1: Heidolph®, Hei-VAP.

Rotaevaporador 2: IKA-DEST modelo KV 05S3, com banho de aquecimento Quimis®, banho ultratermostatizado (refrigeração) Quimis® modelo Q214M3.

Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, frequência 40 KHz.

Mufla: MLW VEB Elektro Bad Frankenhausen®

Microscópio-estereoscópio: Leica® MZ APO.

Leitor de microplacas (espectrofotômetro): BioTek® Epoch e Power Wave XS2.

Leitor de microplacas (luminômetro): Centro Microplate Luminometer LB960, Berthold Technologies®, Oak Ridge, TN, USA.

Tamisador vibratório: Produtest®

Tamises**:** Telatest®

Estufa 1: Marca Soc-Fabbe®, Modelo 119, Brasil.

Estufa 2: Marca AISET®, modelo YLD-6000.

Liofilizador: CHRIST® Alpha 2,4 Ldplus.

Placa Aquecedora: Marca IKA®, modelo C-MAG-HP7.

Microplaca de 96 poços: CORNING®

Placa de Petri (6 cm d.i): Cralplast®

Micrômetro externo digital: Mitutoyo®

Reagentes, solventes e substâncias utilizados: persulfato de potássio, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6 sulfônico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH), metassulfato de fenazina (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (trolox), quercetina, bromato de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL), dimetilsulfóxido (DMSO), tampão fosfato-salino (PBS) da Sigma-Aldrich®; ácido acético glacial, peróxido de hidrogênio e álcool isopropílico da Merck®; meio de cultura DMEM da Gibco®, soro fetal bovino da GE Healthcare® - Hyclone; solventes grau analítico (PA): etanol, metanol, acetato de etila, hexano e tolueno da Synth®; solvente grau cromatográfico: metanol, acido acético glacial e acetonitrila J.T. Baker®; solvente para análise por RMN: metanol

tetradeuterado MERCK®. Água ultrapura (resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm): obtida em ultrapurificador modelo Direct Q3 UV Merck Millipore®. Água deionizada (0,23 µS/cm): obtida do deionizador Gehaka®.

4.2 MATERIAL VEGETAL

4.2.1 Obtenção e preparo da matéria-prima vegetal

A obtenção e o preparo do material vegetal foram realizados em Cuba. A coleta da planta foi feita na fazenda “La Quirubina” em “Ceiba del Agua” (22°52′38″Norte, 82°38′29″Oeste), município “Caimito del Guayabal”, província Artemisa e a exsicata está depositada no herbário do Jardim Botânico Nacional de Cuba, com código de identificação HFC 85.589 (HAJB). Do material coletado foi selecionado aquele que estava em boas condições, não afetado por insetos ou pragas ou outros materiais estranhos, utilizando apenas as folhas e caules finos. A secagem foi feita em estufa à 38ºC, por 7 dias. A fragmentação do material foi realizada em moinho de facas obtendo-se, assim, a droga vegetal, armazenada sob refrigeração até a extração.

4.2.2 Análise da matéria-prima vegetal

Foram utilizadas metodologias de controle de qualidade para drogas vegetais conforme técnicas Farmacopéicas (BRASIL, 2010) e não Farmacopéicas (Miranda e Cuéllar, 2000). Os parâmetros a seguir foram determinados.

4.2.2.1 Determinação da perda por dessecação

O material vegetal foi submetido ao ensaio de determinação da perda por dessecação para avaliação do teor residual de água, utilizando inicialmente o método azeotrópico, a análise foi feita em triplicata, a partir de 10 g da amostra, utilizou-se tolueno como dissolvente e aparelho Dean Star (Miranda e Cuéllar, 2000). Esta determinação foi realizada também pelo método gravimétrico da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (5.2.9), em estufa e partindo de 5 g de amostra (BRASIL, 2010).

4.2.2.2 Determinação do teor de cinzas totais e insolúveis em ácido

Foram pesados 2g da droga vegetal pulverizada e adicionados a cadinhos de porcelana previamente tarados. O procedimento foi feito em mufla a uma temperatura de 700 a 750º C por 2h. As cinzas resultantes do ensaio foram usadas

para a determinação de cinzas insolúveis em ácido, a partir do tratamento com ácido clorídrico 10 % (Miranda e Cuéllar, 2000). O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga vegetal (% m/m) e representa a média de três determinações.

4.2.2.3 Análise granulométrica do pó

Foram exatamente pesados 25 g do pó de folhas moídas e secas de *M. paniculata* e submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas correspondentes a 2; 1,18; 0,71; 0,3; 0,18 e 0,12 mm e coletor, utilizando tamisador vibratório, na escala dez do aparelho, durante 30 min. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e pesadas. Este procedimento foi realizado em triplicata. O percentual retido em cada tamis e o tamanho médio das partículas foram determinados (ALLEN et al., 2007); para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de pó de folhas recolhida de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Excel®, onde foram calculadas as frequências percentuais cumulativas. A partir desta análise foi realizada a classificação do pó baseada na Farmacopeia Brasileira 5a edição (2010).

4.3 OBTENÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS

4.3.1 Obtenção e análise do extrato etanólico

A droga vegetal foi submetida à extração com etanol (EtOH), por maceração com agitação ocasional, com relação droga vegetal/EtOH 1:15 (m/v), em 3 etapas de 24, 48 e 48 h (1:5 cada), à 40º C. Em seguida, foi empregado o método de extração por ultrassom com a mesma relação droga vegetal/EtOH 1:15 (m/v), em 3 etapas de 30 min (1:5 cada) para garantir a extração exaustiva, a partir do resíduo vegetal seco da primeira extração (maceração). Foram obtidos três extratos, segundo o método de extração empregado e o tamanho de partícula de pó da droga vegetal: EEMp1 (Maceração inicial; tamanho de partícula maior), EEMp2 (ultrassom; metade do resíduo vegetal seco/tamanho de partícula maior) e EEMp3 (ultrassom; metade do resíduo vegetal seco/tamanho de partícula menor). As soluções extrativas etanólicas foram filtradas em algodão e concentradas em evaporador rotativo.

Uma amostra de cada extrato foi seca em capela e levada a dessecador com sílica gel, para garantir uma secagem total e a seguir foram submetidos a um pré-tratamento, incluindo uma extração em fase sólida (EFS) em cartucho (C18; metanol: água 95:5) e filtração em membrana (0,22 µm, PVDF). As amostras foram solubilizadas em metanol: água (95:5) e 1,0 mL das mesmas mais 4,0 mL da fase móvel foram aplicadas no respectivo cartucho. Os eluatos foram recolhidos, secos em capela, solubilizados em 1 mL de metanol e filtrados em membrana (0,22 µm, PVDF). As análises por CLAE-DAD foram desenvolvidas no cromatógrafo líquido 1 utilizando coluna de fase reversa C18 Agilent® (250 x 4,6 mm; 5 µm), em condições de gradiente exploratório: 5-100% de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL; detector DAD com cromatogramas registrados em 324 nm.

Os perfis cromatográficos dos extratos obtidos sob as diferentes condições foram semelhantes e, portanto, os três extratos foram reunidos e o EEMp resultante foi concentrado em rotaevaporador, liofilizado e armazenado sob congelamento (-20 º C) em frasco bem fechado.

4.3.2 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de M. paniculata por extração em fase sólida (EFS)

As condições de separação do EEMp foram otimizadas inicialmente em pequena escala mediante a realização de dois fracionamentos teste. As condições são descritas a seguir:

1. 180 mg de extrato seco foram misturados com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicados em coluna de vidro (10 x 1,2 cm) contendo sílica gel (63-200 µm). A eluição ($V_{eluente}$: 25,0 mL) foi realizada sob vácuo como segue: 1. Hex/AcOEt 95:5 (frações: 1 e 2); 2. Hex/AcOEt 7:3 (frações: 3 e 4); 3. Acetato de etila (frações: 5 e 6); 4. AcOEt/MeOH 9:1 (frações: 7 e 8); e 5. Metanol (frações: 9 e 10).
2. Foram mantidas as mesmas condições, com exceção dos eluentes usados: 1. Hex/AcOEt 95:5 (frações: 1 e 2); 2. Hex/AcOEt 85:15 (frações: 3 e 4); 3. Acetato de etila (frações: 5 e 6); 4. AcOEt/MeOH 9:1 (frações: 7 e 8); e 5. Metanol (frações: 9 e 10).

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de vidro (20 x 20 cm, 0,25 mm) e distância de eluição de 18

cm, as amostras solubilizadas em MeOH (3,0 mg/mL), com volume de aplicação de 20 µL. Condições para todas as frações: fase móvel Hex: AcOEt: MeOH 50:40:10 (v/v), revelador luz UV a 365 nm e ácido sulfúrico 10% (110º C, 10 min). Condições para frações 1-5: tolueno: AcOEt 93:7 (v/v), revelador anisaldeído sulfúrico (110º C, 10 min) e luz UV a 365 nm.

Uma vez otimizadas as condições em menor escala, para o fracionamento em maior escala uma massa de 10,42 g do extrato foi misturada com a fase estacionária (1:2, m/m) e AcOEt (6:1, m/v) até homogeneizar e secar para aplicação na coluna. As condições cromatográficas foram: coluna de vidro contendo sílica gel (10 x 10,5 cm; 63-200 µm); eluição realizada sob vácuo como segue: 1. Hex/AcOEt 95:5 (EFSMp1); 2. Hex/AcOEt 8:2 (EFSMp2); 3. Hex/AcOEt 7:3 (EFSMp3); 4. Metanol (EFSMp4).

4.3.3 Análises cromatográficas do extrato EEMp e frações EFSMp

4.3.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As condições para as análises por CCD foram as seguintes: placas de alumínio (20 x 20 cm, 0,25 mm); distância de eluição de 18 cm; amostras solubilizadas em MeOH (3,0 mg/mL); volume de aplicação de 20 µL. Fases móveis e reveladores: 1) Hex: AcOEt: MeOH 50:40:10 (v/v), luz UV a 365 nm e ácido sulfúrico 10 % (110º C, 10 min); 2) Tolueno: AcOEt 93:7 (v/v), luz UV a 365 nm e anisaldeído sulfúrico (110º C, 10 min).

4.3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD) sendo submetidas inicialmente a um pré-tratamento, incluindo uma extração em fase sólida (EFS) em cartucho (C18; metanol: água 95:5) e filtração em membrana (0,22 µm, PVDF). As amostras, EEMp (10 mg) e EFSMp1-4 (5mg) foram solubilizadas em 1,0 mL do eluente metanol: água 95:5 (v/v), aplicadas no cartucho e eluídas com mais 4,0 mL do eluente. Após recolhidos, os eluatos foram secos em capela e, posteriormente, solubilizados em 1,0 mL de metanol e filtrados em membrana (0,22 µm, PVDF). As análises foram desenvolvidas no cromatógrafo líquido 1 utilizando coluna de fase reversa Agilent®

Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), em condições de gradiente exploratório: 5-100% de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção de 190 – 400 nm, com monitoramento em 254 e 324 nm.

4.3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-DAD-IES-EM)

Para a análise por CLAE-EM foram otimizadas inicialmente as condições cromatográficas por CLAE-DAD, fazendo modificações com base no método exploratório descrito em 4.3.3.2. Para EEMp, EFSMp3 e EFSMp4 as novas condições foram: gradiente 40-95% de metanol em 30 min, mais 5 min com metanol 100%, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção de 190 – 400 nm, com monitoramento em 254 e 324 nm. Para as amostras EFSMp1 e EFSMp2 o gradiente foi de 70-95% de metanol em 30 min, mais 5 min com metanol 100%, mantendo constante o resto das condições do item 4.3.3.2.

Para as análises CLAE-DAD-IES-EM as separações cromatográficas foram feitas numa coluna Phenomenexl®, Luna C18, (250 x 4,6 mm; 5 µm) em cromatógrafo de alta eficiência Shimadzu® Prominence (Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas Bruker®, Amazon SL (Massachusetts, Estados Unidos) dotado de interface electrospray (ESI). Foram utilizadas as condições de análise previamente otimizadas e descritas acima. As condições da interface electrospray (ESI) foram definidas da seguinte forma: modo positivo, voltagem de saída do capilar 140 V, voltagem do capilar -4500 V, temperatura de dessolvatação 300 ºC. Foi utilizado nitrogênio como gás de dessolvatação a uma pressão de 50 psi e vazão de 10 L/min. A vazão de entrada da amostra foi de 250 µL/min e o volume de 3 µL**.** Os dados foram processados com o auxílio do software Data Analysis versão 4.1.

4.3.4 Fracionamento de EFSMp4 por cromatografia em coluna de fase normal (CC) e análises das sub-frações CCMp

As condições de separação da fração EFSMp4 foram estabelecidas a partir de análises por CCD, determinando-se desta forma uma sequência de eluentes para o sistema cromatográfico. Foi utilizada uma condição inicial de CCD onde todas manchas da cromatoplaca mostravam valores de R_f<0,5 e partindo dela foi

estabelecido um gradiente de fases móveis que permitiu alcançar uma distribuição de manchas entre 0,2<R_f<0,8. Uma massa de 359,6 mg da fração EFSMp4 foi misturada com a fase estacionária (1:2, m/m) e AcOEt (6:1, m/v) até homogeneizar e secar para aplicar. Seguem as condições cromatográficas: coluna de vidro contendo sílica gel (15 x 3 cm; 40-63 µm); eluição realizada sob pressão: 1. Tolueno/AcOEt (93:7); 2. Tolueno/AcOEt/MeOH (65:33:2); 3. Tolueno/AcOEt/MeOH (63:34:3); 4. Tolueno/AcOEt/MeOH (60:35:5); 5. AcOEt/MeOH (80:20); 6. Metanol. Foram coletadas 70 frações de 20 mL cada. As condições para as análises por CCD das frações CCMp foram as seguintes: placas de alumínio (20 x 20 cm, 0,25 mm), distância de eluição de 18 cm, fase móvel: Tolueno/AcOEt/MeOH 60:35:5 (v/v) e revelador: anisaldeído sulfúrico (110º C, 10 min). As condições para as análises por CLAE-DAD foram as mesmas referidas em 3.2.5.2 para o EEMp e EFSMp1-4.

4.3.5 Purificação de metabólitos majoritários por CLAE-UV semipreparativa

Para a purificação dos metabólitos majoritários as subfrações escolhidas foram submetidas a um pré-tratamento realizado também por EFS. Utilizou-se coluna de vidro e como fase estacionária sílica C18 Discovery® DSC-18 (2,0 x 2,0 cm, 40-63 µm) com eluição sob pressão. A fase móvel utilizada foi MeOH 60% (v/v), na qual as amostras foram solubilizadas no menor volume possível e eluídas com um volume de 25 mL. Posteriormente à secagem em capela sob fluxo de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, as subfrações foram solubilizadas em MeOH 50% (30 mg/mL; 7,4mL) e filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). Baseadas nas condições utilizadas no modo analítico para as amostras e mantendo o mesmo comprimento e tipo de fase estacionária, foi determinado a nova vazão, utilizando fator de correção (X) de acordo com os diâmetros internos das colunas utilizadas, como segue na Equação 1 (SNYDER et al., 2010). A vazão empregada em modo analítico foi multiplicada pelo fator de conversão (X) para o cálculo da vazão em modo semipreparativo.

Equação (1)

$$X = \frac{dp^2}{da^2}$$

X: fator de conversão

da: diâmeto interno coluna analítica

dp: diâmeto interno coluna semipreparativa

As condições cromatográficas utilizadas foram: a) coluna de fase reversa Agilent® Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm x 7 µm, Zorbax), modo isocrático com MeOH 45% por 45 min, vazão 8 mL/min, volume de injeção 0,7 mL e detecção em 324 nm.

4.3.6 Determinação estrutural das substâncias isoladas

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi feita a partir dos resultados das análises espectrométricas e da consulta aos dados da literatura.

Espectrometria de absorção no Infravermelho: os espectros de IV-FT foram obtidos no modo de reflexão atenuada (ATR) na faixa de número de onda de 4000-500 cm^{-1}, 64 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} para cada espectro em equipamento IVFT-Tensor 27 Bruker®. Foi utilizado programa OriginPro® 9 SR2 para tratamento dos dados.

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H e ^{13}C: as análises foram realizadas em espectrômetro Bruker® 7,0 Tesla, operando em gradiente de pulso a 600 MHz para ^{1}H e 150 MHz para ^{13}C. Metanol tetradeuterado foi utilizado como solvente.

Espectrometria de massas: a detecção espectrométrica de massa foi realizada em espectrômetro Waters Micromass® Quatro Micro™, instrumento triplo quadripolo (MS/MS), utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM). Íons foram gerados em modo de ionização positiva utilizando uma interface de eletro-spray. Os parâmetros utilizados foram: Capilaridade 3,0kV, voltagem do cone 20V, extrator 3V, temperatura da interface 120ºC e temperatura de dessolvatação 450ºC. O fluxo de gás de dessolvatação (nitrogênio) foi de 400L/h. As amostras foram dissolvidas em Acetonitrila: Água (1:1).

4.3.7 Quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp

A amostra (EEMp) foi submetida a um pré-tratamento que incluiu uma extração em fase sólida EFS em cartucho (C18; metanol: água 95:5) e filtração em membrana (0,22 µm, PVDF). As amostras foram solubilizadas em metanol: água (95:5) e 1,0 mL das mesmas mais 4,0 mL da fase móvel foram passadas no respectivo cartucho e filtradas em membrana. Após recolhido o eluato, foi seco em capela e, posteriormente, solubilizados em acetonitrila.

As análises foram desenvolvidas em cromatografo CLAE-DAD analítico Perkin-

Elmer® Flexar, utilizando coluna de fase reversa Agilent® Hypersil ODS C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm), gradiente linear com acetonitrila:água(HAc-1%) variando da proporção de 20:80 para 35:65 (v/v) em 50 min e, em seguida, isocraticamente com 35:65 (v/v) por 15 min; vazão de 1,0 mL/min; detecção em 324 nm.; volume de injeção 20 µL. Para a construção da curva analítica utilizamos como padrão soluções de hidrato de meranzina em concentrações crescentes. A identificação do hidrato de meranzina no extrato etanólico baseou-se na comparação dos t_R e na sobreposição dos espectros de absorção no UV com o padrão.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de edema de pata em rato

Foi avaliada a atividade anti-inflamatória do EEMp e das frações EFSMp utilizando o ensaio de edema de pata em rato. O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara. Este ensaio foi realizado conforme descrito por Winter, Risley e Nuss (1962) com pequenas modificações. Dois experimentos foram realizados separadamente, em ratos de linhagem Wistar; no primeiro ensaio foram avaliados cinco grupos (n=6): Grupo controle negativo (veículo: solução aquosa de tween 80 a 8% e carboximetilcelulose a 0,1%), Grupo controle positivo (indometacina: 10 mg/kg), Grupo tratado I (EEMp: 100mg/ kg), Grupo tratado II (EEMp: 150mg/kg) e Grupo tratado III (EEMp: 300mg/kg). No segundo experimento, seis grupos (n=6) foram avaliados: Grupo controle negativo (veículo: solução aquosa de tween 80 a 8% e carboximetilcelulose a 0,1%), Grupo controle positivo (indometacina: 10 mg/ kg), Grupo tratado I - EFSMp1 (20mg/ kg); Grupo tratado II - EFSMp2 (30 mg/kg); Grupo tratado III - EFSMp3 (25 mg/Kg) e Grupo tratado IV - EFSMp4 (150 mg/Kg). As doses das frações foram estabelecidas em função do rendimento de cada fração em relação ao extrato (m/m) e a dose mais efetiva do extrato no primeiro ensaio. Após o tratamento dos animais dos diferentes grupos (veículo, indometacina, EEMp e frações), por via oral, a espessura da pata posterior direita dos animais foi determinada mediante micrômetro externo digital Mitutoyo®. Uma hora depois do início do tratamento dos animais a carragenina (2 mg/mL em solução salina) foi injetada nesta mesma pata com uma agulha de insulina em um volume de 0,1 mL (200 µg/pata). Após as injeções subplantares, a espessura das patas foi medida nos

seguintes intervalos de tempo: 1, 2, 3 e 4 h. O edema foi expresso como a diferença, em milímetros, entre a espessura final e a espessura inicial.

4.4.1.1 Teste de gastrotoxicidade

A ulcerogênese gástrica foi verificada nos mesmos animais dos grupos utilizados para o modelo de edema de pata. Após morte com CO_2, os animais tiveram seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura e lavados com salina. A mucosa exposta foi observada através de um microscópio-estereoscópio Leica® MZ APO, quanto à coloração e integridade. No caso da existência de lesões, estas foram contadas e medidas através do programa Motic Images Plus® 2.0, obtendo-se o número de ulcerações com diferentes graus de lesão, seguindo o índice de ulcerogênese gástrica (I.U.G.), que obedece a critérios numéricos para a classificação das lesões da mucosa gástrica em: Grau 1 (lesões < 1,5 mm), Grau 2 (lesões de 1,5 à 2,5 mm), Grau 3 (lesões de 2,5 à 3,5 mm), Grau 4 (lesões de 3,5 à 4,5 mm) e Grau 5 (lesões > 4,5 mm) (CIOLI et al., 1979; DARLING et al., 2004).

4.4.2 Avaliação "in vivo" da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp por pleurisia.

A pleurisia foi realizada conforme descrito por Vinegar, Truax e Selph (1973) com modificações. Os ratos foram submetidos à anestesia/analgesia pela administração intraperitoneal da associação da quetamina (80 mg/Kg) com xilazina (7 mg/Kg). Em seguida, a carragenina (4 mg/mL em solução salina) foi injetada na cavidade pleural com uma agulha de 3 mm em um volume de 0,1 mL (400 g/pleura). Quatro horas após a injeção intrapleural, os animais foram anestesiados com halotano e, em seguida, exsanguinados através do corte dos vasos cervicais. O tórax foi cuidadosamente exposto e a cavidade pleural lavada com 2mL de solução salina tampão fosfato (PBS). Em seguida, a cavidade pleural foi aberta e o lavado pleural coletado com uma pipeta de Pasteur (lavados contaminados com sangue foram desprezados). De início, os lavados pleurais foram utilizados para contagem de leucócitos totais (LT) e de leucócitos polimorfonucleares (PMN).

4.4.2.1 Contagem de leucócitos totais e leucócitos polimorfonucleares

Para contagem do número de LT, uma alíquota de 20 µL do lavado foi adicionada a 180 L de solução de Turk para lisar as hemácias. Uma pequena alíquota desta mistura foi adicionada à câmara de Neubauer e a leitura realizada nos quatro quadrantes externos. O número obtido foi multiplicado por um fator de correção que o converteu em número de LT por pleura em milhões. Já para contagem de PMN, outra alíquota do lavado foi utilizada para obtenção de um de esfregaço corado com May-Grunwald no qual se determinou o percentual de PMN. Este percentual, por sua vez, foi aplicado ao número de LT e, com isso, expresso em número de PMN por pleura em milhões.

4.4.3 Avaliação "in vitro" da atividade antioxidante do EEMp e frações EFSMp

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara em colaboração com o Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti e a Dra. Renata Pires de Assis.

O EEMp e as frações EFSMp foram submetidas a avaliação "in vitro" da atividade antioxidante com a finalidade de ter outras ferramentas que permitissem estabelecer uma correlação entre as atividades anti-inflamatória e antioxidante descritas para *M. paniculata.* Nos experimentos foram usados com padrões: ácido gálico, trolox, quercetina e Ioimbina.

4.4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do $ABTS^{+\bullet}$

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do $ABTS^{+\bullet}$**,** derivado do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), foi utilizado o método descrito por Re et al. (1999), com algumas modificações. O cátion radicalar $ABTS^{+\bullet}$ foi gerado pela oxidação do ABTS (7 mmol/L) com persulfato de potássio (140 mmol/L) na ausência de luz, à temperatura ambiente, por, aproximadamente, 16 h. Após ser formado, o radical foi diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) até se obter a absorbância de 0,750 ± 0,020, em 734 nm. Foi utilizado o espectrofotômetro de microplacas para realização das leituras das absorbâncias após incubação de 15 min na ausência de luz e na presença e ausência das amostras e padrões em diversas concentrações. O volume total da reação foi de 300 µL, sendo 100 µL para a solução de $ABTS^{+\bullet}$ e 200 µL para as diferentes

concentrações de amostra e padrões. Como branco foi utilizado 300 µL de tampão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata e a partir da média de cada concentração, foi calculada a porcentagem de captura do radical $ABTS^{+\bullet}$. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição.

4.4.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do ânion radicalar superóxido ($O_2^{-\bullet}$)

Para o ensaio da atividade antioxidante pelo método do $O_2^{-\bullet}$, a reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), forma o ânion radicalar superóxido que reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o, para gerar uma formazana, na qual a intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical. O experimento foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3; 25 mmol/L), contendo PMS (372 µmol/L), azul de nitrotetrazólio [NBT] (600 µmol/L), NADH (1.560 µmol/L), diferentes concentrações das amostras e padrões, completando com água para alcançar o volume final de reação de 300 µL. Como branco da reação foram utilizados o tampão, PMS, NBT e água, completando o volume de 300 µL. Após incubação de 7 min à temperatura ambiente, a absorbância foi monitorada em 560 nm, a fim de determinar a quantidade de formazana gerada (HAZRA, BISWAS e MANDAL, 2008). O monitoramento da formazana é feito por fotometria (560 nm) com a mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição.

4.4.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de captura do ácido hipocloroso ou da taurina cloramina

Nesse ensaio a atividade antioxidante da amostra depende de sua capacidade em capturar o HOCl/OCl ou a taurina cloramina, prevenindo a oxidação do 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina [TMB]. A oxidação do TMB pelo $HOCl/OCl^-$ ou pela taurina cloramina gera um cromóforo azul com absorbância máxima em 652 nm (KETTLE e WINTERBOURN, 1994; DYPBUKT et al., 2005). A solução padrão de OCl^- foi obtida diluindo-se a massa adequada de NaOCl em NaOH 10mmol/L, pH 12,0. A concentração de OCl^- foi determinada pelo seu coeficiente de extinção molar

(ε = 350 $M^{-1}cm^{-1}$ em 292 nm) (ZGLICZYNSKI et al., 1971). Para o HOCl/OCl- utilizou-se a metodologia descrita por Dypbukt et al., 2005, em temperatura ambiente, com modificações. A reação de captura foi realizada em 240µL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4 e $HOCl/OCl^-$ 30 µmol/L, na ausência e na presença de diferentes concentrações de amostra. Após 10 min de incubação, foram adicionados 60µL do reagente de revelação com: TMB 2,8 mmol/L, dissolvido em dimetilformamida (DMF) e diluído (v/v) em ácido acético 0,8 mol/L e subsequente adição de iodeto de potássio 0,01 mol/L, obtendo-se uma solução com 0,01 mol/L de iodeto de potássio, 50% de DMF, 0,4 mol/L de ácido ácetico e 14mmol/L de TMB. Depois de 5 min de incubação a temperatura ambiente e na ausência de luz, a absorbância foi monitorada em 652 nm.

Para a taurina cloramina, foram utilizadas as mesmas condições do ensaio supracitado, com a adição de taurina 5 mmol/L e incubação por 5 min com o $HOCl/OCl^-$ antes da adição das amostras. A presença do iodeto no reagente de revelação catalisa a oxidação do TMB pela taurina cloramina (DYPBBUKT et al., 2005). Os resultados foram expressos como média do IC_{50} ± EP (erro padrão).

4.4.4. Ensaios de mutagenicidade para EEMp e fração EFSMp4

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Mutagênese da Universidade de Araraquara (UNIARA), sob coordenação da Profa Dra. Flávia. Aparecida Resende Nogueira.

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), cinco diferentes concentrações do extrato de *M. paniculata* e da fração EFSMp4 dissolvidos em DMSO, foram avaliadas. As concentrações variaram de 1,25 a 20 mg/placa para o extrato e de 0,25 a 2 mg/placa para fração. Essas concentrações foram selecionadas com base em testes preliminares de toxicidade. A toxicidade foi evidenciada pela redução no número de revertentes His+ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar mínimo.

Para a avaliação da mutagenicidade, foram adicionados às concentrações das amostras, 0,5 mL de 0,2 M de tampão fosfato ou 0,5 mL de 4% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e então incubados a 37 ºC por 20 - 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de "*top agar*" (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados nos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de

uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do "*top ágar*", as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao final desse período foi realizada manualmente a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos sem a mistura S9 foram 4 -nitro-*o*-fenilenodiamina (10 µg / placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg / placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg / placa) para TA102. 2-aminoantraceno (1,25 µg / placa) foi utilizado para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/ placa), para TA102 nos experimentos com ativação metabólica. DMSO foi utilizado como controle (solvente) negativo (100 µL/ placa).

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

IM = número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas)
número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo

A amostra foi considerada mutagênica quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

4.4.5 Ensaios com macrófagos "in vitro" para a fração EFSMp4 e substâncias majoritárias

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara em colaboração com a Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e o mestrando Alan Bortinhon Orlando.

Os macrófagos em cultura foram previamente estimulados por LPS, que induz a síntese e liberação de vários mediadores químicos inflamatórios no meio (citocinas, eicosanoides, etc), incluindo o NO e a PGE_2, os quais foram

quantificados. Entretanto, primeiramente é necessário determinar a citotoxicidade das amostras utilizadas sobre os macrófagos a fim de evitar que as concentrações empregadas causem morte celular e garantir que a redução do nível de mediadores químicos ocorra apenas por consequência de mecanismos farmacológicos.

4.4.5.1 Preparo da microplaca aderida com macrófagos

A linhagem celular utilizada foi a RAW 264.7, obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC – American Type Culture Collection). Ela é uma linhagem de macrófagos peritoneais aderentes modificados pelo vírus da leucemia murina de Albelson derivados de camundongos Balb-C.

Para realização dos ensaios, as células foram descongeladas e expandidas, conforme orientações da ATCC, em frascos de cultura celular em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (1:1.000) e incubadas à temperatura de 37°C, em estufa umidificada contendo 5% de CO_2. Em seguida, foi realizada a contagem celular utilizando câmara de Neubauer, e a concentração celular foi ajustada para 5 x 10^5 células/mL e adicionou-se 200 µL nas devidas cavidades da microplaca (1 x 10^5 células por cavidade). Posteriormente a microplaca foi incubada nessa mesma estufa para aderência dos macrófagos nas cavidades.

4.4.5.2 Estimulação celular com LPS

A microplaca com os macrófagos aderidos nas cavidades foi devidamente preenchida com 180 µL do meio DMEN e 20 µL de solução de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (1 µg/mL) (20 ng/cavidade), exceto na cavidade do controle negativo. Em seguida, a microplaca foi incubada (37ºC em estufa umidificada, 5% de CO_2) por um período de 1:30 h. Após o período de incubação as células foram lavadas com 100 µL de PBS e as amostras e controles foram adicionados nas cavidades.

A fração bioativa EFSMp4 e duas substâncias isoladas a partir dela, SPMp1 e SPMp2 foram preparadas em DMEM nas concentrações (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25 µg/mL) para serem testadas em triplicata. Como controle negativo foi adicionado apenas DMEN (triplicata) e como controle do LPS foi adicionado DMEN + LPS

(triplicata). Uma cavidade foi preenchida com 100 µL de DMSO (50%) para verificar a morte total.

Em seguida, a microplaca foi incubada novamente (37ºC em estufa umidificada, 5% de CO_2) por um período de 18 h. Após incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e utilizados para a quantificação de NO (item 3.4.4.4). A placa com os macrófagos aderidos foi utilizada para o ensaio de citotoxicidade descrito no item 4.4.5.3.

4.4.5.3 Citotoxicidade

Após o tratamento com as amostras e LPS e coleta do sobrenadante, a microplaca contendo as células aderidas RAW 264.7 foi utilizada para a realização do ensaio de citotoxicidade dos respectivos compostos utilizando-se o método colorimétrico de viabilidade celular do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Neste método, o MTT é captado por células viáveis e reduzido à formazana (cristais azuis) por atividade de oxidorredutases. Assim, após sua dissolução, a concentração de formazana é medida por fotometria, a qual é diretamente proporcional ao número de células viáveis (5 x 10^2 a 10^5 células, dependente do tipo celular). Nesse ensaio foram adicionados 160 µL do DMEM sem vermelho de fenol (para não atrapalhar nas leituras fotométricas) e 10 µL do reagente MTT em todas as cavidades com macrófagos aderidos da microplaca, a qual foi incubada por um período de 3 h (37ºC em estufa umidificada, 5% de CO_2) até a formação do precipitado de formazana. Em seguida, foi adicionado 100 µL de uma solução de SDS (duodecil sulfato de sódio) para dissolução do formazana e armazenou-se a microplaca no escuro à temperatura ambiente por 20 h. Finalmente, foi realizada a leitura da microplaca por fotometria para detecção da absorbância a 595 nm.

4.4.5.4 Quantificação de nitrito (NO_2^-)

A quantificação de NO é realizada indiretamente através da quantificação de nitrito (NO_2^-). Assim, esse ensaio pode ser utilizado para investigar o efeito de substâncias anti-inflamatórias sobre a produção de óxido nítrico, já que esta substância química formada nas células e nos tecidos se converte rapidamente em NO^{-2}. Neste estudo, foi utilizado o método descrito por Lane, Wu-Hsieh e Howard (1993). 100 µL dos sobrenadantes das culturas foram adicionados a 100 µL do

reagente de Griess (solução estoque de NEED a 0,1% e sulfanilamida a 1% em H_3PO_4 5%). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica da solução foi medida em leitor de microplacas, em filtro de 540 nm. A quantidade de nitrito no sobrenadante das culturas foi correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão (feita com uma solução padrão de nitrito com concentrações variando entre 3 a 200 µM de nitrito de sódio).

4.4.6 Ensaios com neutrófilos "ex vivo" para a fração EFSMp4 e substâncias majoritárias.

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara em colaboração com o Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti e a doutoranda Tayra Ferreira Oliveira de Lima.

4.4.6.1 Recrutamento dos neutrófilos

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso de 250 ± 10 g, provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Os animais permaneceram no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara, UNESP. Foi feita a administração intraperitoneal prévia de 2 mL de caseinato de sódio 8% e, após um período de 4 horas, os animais foram sacrificados e realizada a lavagem peritoneal com PBS estéril. As células foram contadas em câmera de Newbauer utilizando líquido de Turk. A viabilidade celular foi avaliada com Azul de Tripan; para a avaliação da morfologia celular, as lâminas foram coradas pelo método MGG (May Grunwald e Giemsa) modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947).

4.4.6.2 Ensaio de citotoxicidade

Neutrófilos ($5x10^6$ células/mL) foram incubados com diferentes concentrações das amostras EFSMp4, SPMp1 e SPMp2 (40; 20; 10; 5; 2,5 µg/mL) por 1:30 horas a 37 ^{0}C. Os testes foram realizados em Eppendorf e com um volume final de 500 L.

Transcorrido o tempo de incubação, os Eppendorf foram centrifugados à 4000 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante e lavado uma vez com 500 L de PBS. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, 500 L de MTT (1mg/mL) foram adicionados, e as células ressuspendidas e incubadas por 3 horas a 37 ^{0}C.

Após incubação uma nova centrifugação foi feita por 5 min a 4000 rpm, descartado o sobrenadante e 150 L de isopropanol foram adicionados para solubilizar os sais de formazana formados. Depois de agitação em vórtex por alguns segundos foi feita a transferência para placa de 96 poços e a leitura de absorbância foi realizada a 570 nm e 630 nm. A leitura correspondente ao MTT é a de 570 nm, a leitura em 630 nm foi feita para eliminar a leitura correspondente a matérias particulados, como restos de células.

4.4.6.3 Avaliação de parâmetros da função neutrofílica

4.4.6.3.1 Avaliação da atividade de MPO (Produção de ácido hipocloroso-HOCl)

O estudo foi desenvolvido seguindo o descrito por Ximenes et. al (2005), com modificações. Neutrófilos (2×10^6 células/mL) foram incubados por 10 min em PBS suplementado contendo taurina (10 mM) a 37 ºC sob agitação suave. Logo após as amostras foram adicionadas [EFSMp4, SPMp1 e SPMp2 (2,5; 1,25 µg/mL)] e as células ativadas com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA - 100 nM) e incubados novamente a 37 ºC sob agitação suave por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de catalase (20 g/mL). Após centrifugação por 5min e 6000 rpm, 200 L foram transferidos a uma placa de 96 poços e 50 L de uma solução de 3,3′,5,5′-Tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados. A concentração de taurina-cloramina foi determinada fotometricamente a 655 nm. A quantidade de HOCl produzido foi calculado usando uma curva de calibração a qual foi gerada usando HOCl puro e foi submetido ao mesmo protocolo analítico.

4.4.6.3.2 Quimiluminescência luminol-dependente (NOX2/MPO)

No ensaio de quimiluminescência amplificada por luminol é avaliada a atividade de MPO de neutrófilos previamente tratados com PMA. Os metabólitos derivados da MPO são responsáveis pela oxidação e consequente excitação do luminol, o qual é um amplificador de luz (MENDONÇA et al., 2014). Neutrófilos (1×10^6 células/mL) em PBS suplementado e na presença das amostras [EFSMp4, SPMp1 e SPMp2 (2,5; 1,25 µg/mL)] foram ativados com PMA (100 nM). O luminol (100 M) foi utilizado como sonda quimiluminescente, sendo as reações monitoradas por 42 min a 37◦C. O volume final do ensaio foi de 300 L e a emissão de luz

integrada foi o parâmetro analítico utilizado para avaliar o *burst* oxidativo das células ativadas. (JONES e HANCOCK, 1994).

4.4.7. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão da média. As comparações estatísticas foram feitas de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas utilizando-se o software GraphPad Prism 6.01. Valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO MATERIAL VEGETAL

Os resultados da análise do pó de *M. paniculata* são apresentados na tabela 2. No caso da perda por dessecação da droga vegetal pulverizada, o resultado de 8,76 ± 0,02 % está dentro do limite estabelecido de 14% de teor máximo de umidade na droga vegetal (OMS, 1998; MIRANDA e CUÉLLAR, 2000).

Tabela 2. Parâmetros de qualidade da droga vegetal pulverizada (*M. paniculata*).

Parâmetro	Resultado
Perda por dessecação	8,76 ± 0,02 %
Teor de cinzas totais	7,33 ±0,16 %
Teor de cinzas insolúveis em ácido	0,99 ±0,03 %
Tamanho médio da partícula inicial	545 µm
Tamanho médio da partícula final	287 µm

Quantos ao teor de cinzas alguns índices têm sido estabelecidos, embora os valores possam variar significativamente dependendo do material vegetal e local de colheita. No caso de cinzas totais o limite estabelecido é de até 5% e para cinzas insolúveis em ácido clorídrico 10%, o limite estabelecido é de cerca de 2% para as drogas vegetais (LOU-ZHICEN, 1980; OMS, 1998). Estes são parâmetros que ajudam na identificação da droga vegetal e informam o grau de pureza. O resultado obtido para as cinzas totais foi de 7,33 ± 0,16 %, o que pode estar associado a constituintes minerais integrantes da planta, podendo também ser substâncias de origem terrosa aderida na mesma. No caso das insolúveis em ácido observou-se um valor inferior ao limite estabelecido de 2%.

No caso do tamanho médio da partícula é muito importante destacar que o estado de divisão da droga tem influência decisiva nos processos de dissolução extrativa, pois aumentando o grau de tenuidade de um pó tem-se aumentada sua superfície total de contato com o solvente, o que, por si só já eleva a velocidade de difusão dos princípios ativos carreados pelo solvente. Ocorre que, durante as operações preliminares (estabilização, secagem, trituração) dá-se também a ruptura da parede das células que encerram tais princípios, favorecendo ainda mais o contato destes com o líquido extrator (GONÇALVES, 2005).

O diâmetro médio de partícula foi calculado através da equação a seguir, onde, (d) diâmetro médio de partícula (ALLEN et al., 2007) e tamanho médio refere-se à abertura média das malhas.

Equação (2)

$$d = \frac{\sum(\%retida)(tamanho\ médio)}{100},$$

Na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) a classificação do pó se baseia na distribuição granulométrica em faixas de tamanho de partícula, sendo determinado o tamanho médio da partícula do pó inicial de *M. paniculata*, após da primeira análise granulométrica (545 µm) o material foi classificado como Pó Grosso o que pode diminuir o rendimento do processo de extração. Uma moagem suplementar do resíduo vegetal da primeira extração garantiu alcançar um valor médio de 287 µm (Pó Semifino), o que pode otimizar o processo de extração. As figuras 4 e 5 mostram a distribuição granulométrica dos pós.

Figura 4: Distribuição granulométrica da droga vegetal (pó originado na primeira moagem) de *M. paniculata*.

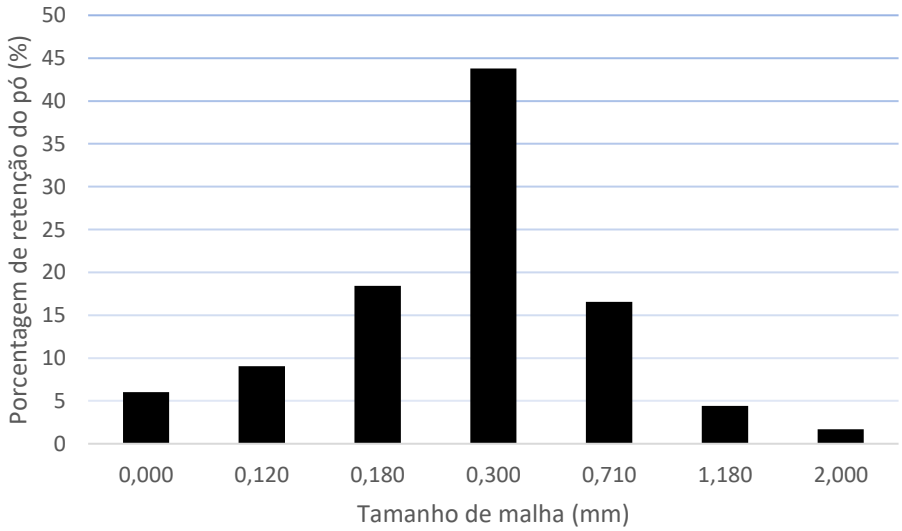
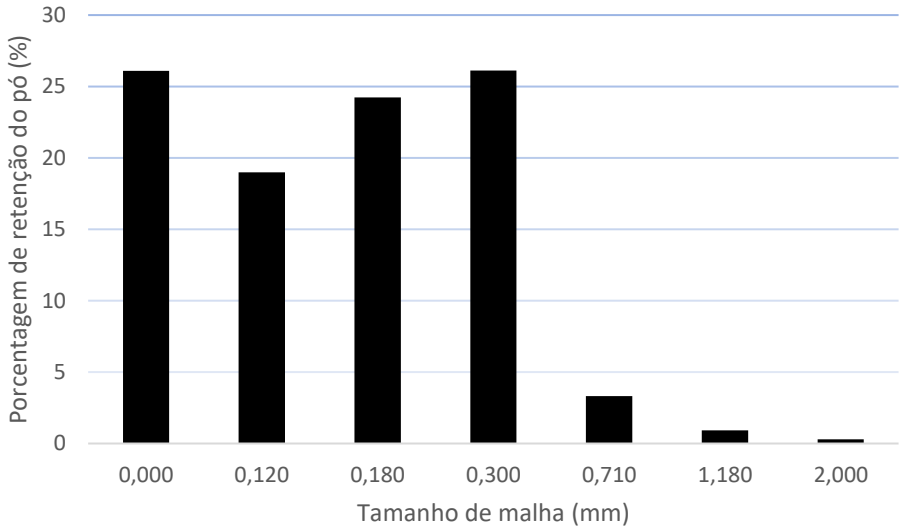


Figura 5: Distribuição granulométrica da droga vegetal (pó originado da segunda moagem após a primeira extração) de *M. paniculata*.



Certamente, os resultados obtidos na análise do material vegetal não permitem estabelecer por si só especificações de qualidade para a droga vegetal, o que somente seria possível com a análise de uma quantidade de amostras significativa, provenientes de diversas regiões do pais e colhidas em diferentes épocas do ano. Porém, nossos dados são uma contribuição nesse sentido e irão complementar outros que já estão disponíveis.

5.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DO EXTRATO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS

Além do tamanho da partícula, são muitos os fatores que têm influência nos rendimentos da extração. A agitação também desempenha um papel importante na velocidade de dissolução, podendo abreviar consideravelmente, a duração de um processo extrativo. Isto ocorre porque a agitação torna possível o contato da droga com solvente menos concentrado do que seria quando a extração ocorre sem agitação, pois este último propicia a formação das zonas de concentração ao redor de cada partícula da droga. Se apenas deixarmos em contato o soluto e o solvente, a velocidade de dissolução iria ocorrer de maneira extremamente lenta, ao passo que se submetermos a mistura a uma pequena agitação, iremos acelerar bastante a obtenção da solução (GONÇALVES, 2005).

Outro fator é o método de extração utilizado em si. Apesar de ser a maceração um método tradicional e amplamente utilizado, atualmente destacam-se outros métodos que asseguram rendimentos mais elevados de extração e garantem

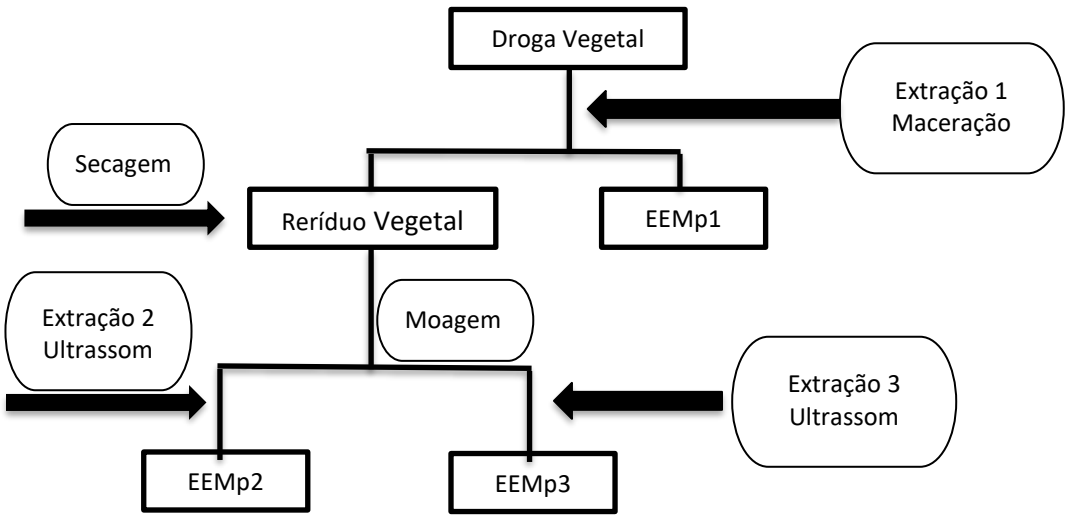
o esgotamento da droga. A extração assistida por ultrassom é um método que oferece essas vantagens e também foi usado em nossa pesquisa.

A extração com o uso de ultrassom é uma técnica que promove a extração exaustiva de princípios ativos de drogas vegetais com gasto de energia relativamente pequeno, economia de tempo e maior segurança no processo. As ondas de ultrassom propagam-se no meio líquido, originando variações de pressão, responsáveis pela cavitação, ou seja, a criação e implosão de microbolhas de gás no centro do líquido, além da formação de ondas de choque no momento da implosão das bolhas, o que também produz um efeito vibratório na célula vegetal, capaz de levá-la a ruptura e, com isso, a liberação do seu conteúdo (BARBOZA e SERRA, 1992; GAMBÁ et al., 2006; ROCHA et al., 2009).

Dantas e Soares (2009) mostraram as vantagens da utilização do método de extração por ultrassom, quanto ao rendimento extrativo, o tempo de extração e o custo, com resultados superiores aos conseguidos com o método de extração por maceração.

Segundo as diferentes condições utilizadas no processo de extração, foram obtidos consecutivamente três extratos, para os quais foi determinado o resíduo seco. Uma primeira extração foi feita por maceração com o pó originado na primeira moagem, a seguir a metade do resíduo vegetal da primeira extração foi submetido a um processo de extração por ultrassom e por ultimo uma terceira extração foi feita também por ultrassom, mas no caso a partir do pó originado da segunda moagem após a primeira extração. As condições de extração em cada caso e os resultados da determinação são descritos na tabela 3.

Figura 6: Diagrama do processo de extração.



A Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) estabelece um valor mínimo de resíduo seco de 95% para extrato seco. O valor médio de resíduo seco das três extrações foi de 87,4%, o que provavelmente está associado ao resíduo de água proveniente da própria droga vegetal (8,76%), além do resíduo de etanol. Esses resultados sugeriram então a necessidade de um processo de secagem adicional, que permitisse garantir a obtenção de um extrato seco a ser conservado adequadamente para o desenvolvimento das pesquisas. O processo de liofilização foi feito depois das análises dos extratos obtidos, conseguindo um extrato seco que foi conservado para as etapas seguintes do estudo.

Tabela 3. Resíduo seco dos extratos obtidos segundo as condições de extração.

Extrato	Método de extração	Tamanho médio da partícula do pó	Rendimento da extração	Resíduo seco do extrato
EEMp1	Maceração	545 µm	4,32 %	87,69 %
EEMp2	Ultrassom	545 µm	1,76 %	87,64 %
EEMp3	Ultrassom	287 µm	2,81 %	86,92 %

Finalmente, o rendimento total do extrato seco em relação à droga vegetal utilizada nos processos de extração foi de 8,89 % (m/m).

5.2.1 Análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As diferenças nas condições de extração utilizadas podem mudar a composição geral do extrato em estudo. A análise por CLAE-DAD permitiu comparar os perfis dos extratos obtidos e estabelecer estratégias para o desenvolvimento da pesquisa. As figuras 7-9 representam os perfis cromatográficos dos extratos descritos acima.

Os perfis cromatográficos dos três extratos avaliados resultaram semelhantes, apresentando picos de maiores intensidades e áreas com t_R dos 19 até os 29 min. Os cromatogramas de EEMp1 e EEMp2 mostraram seus picos majoritários com t_R entre 19 e 21 min. Apesar da sua semelhança qualitativa com os perfis das outras amostras, a amostra EEMp3 mostrou seus picos majoritários com t_R entre 21 e 25 min. Considerando que EEMp2 e EEMp3 foram obtidos por sonicação a partir do resíduo vegetal da primeira extração e que a única diferença entre eles é o tamanho de partícula do material, as diferenças cromatográficas do EEMp3 podem estar

relacionadas com o efeito da moagem que facilitou uma maior interação dessas substâncias majoritárias com o solvente extrator, pois esses metabólitos podem ter estado compartimentalizados em estruturas celulares afetadas no processo. Também o fato de já ter extraído os componentes com t_R menor do que 21 min com maior rendimento nas duas primeiras extrações explicaria parcialmente porque na terceira extração os picos com maior t_R foram extraídos em maior quantidade relativa.

Figura 7. Cromatograma de EEMp1 (3 mg/mL). Análises em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, monitoramento em 324 nm; volume de injeção 20µL.

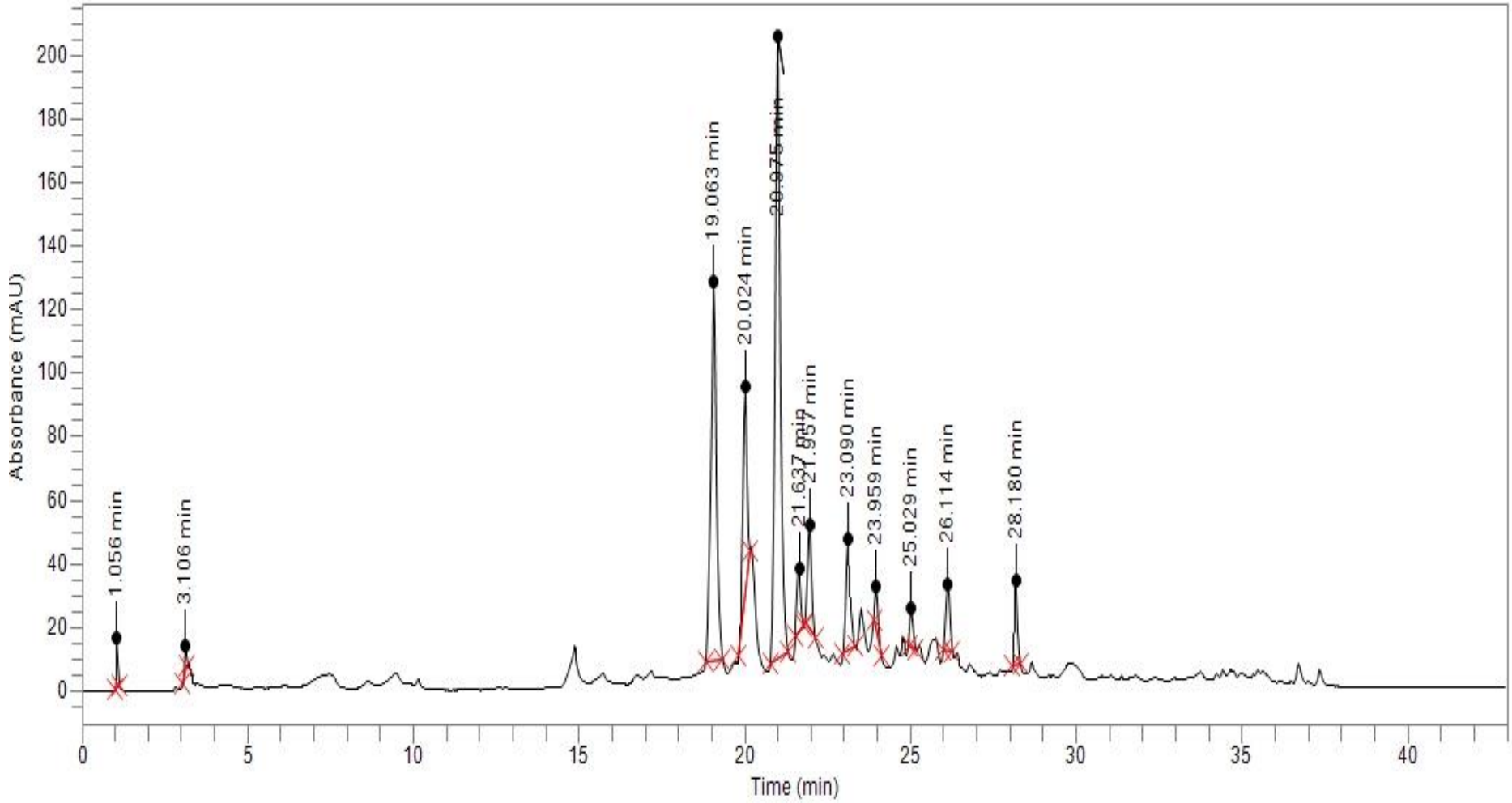


Figura 8. Cromatograma de EEMp2 (3 mg/mL). Análises em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, monitoramento em 324 nm; volume de injeção 20µL.

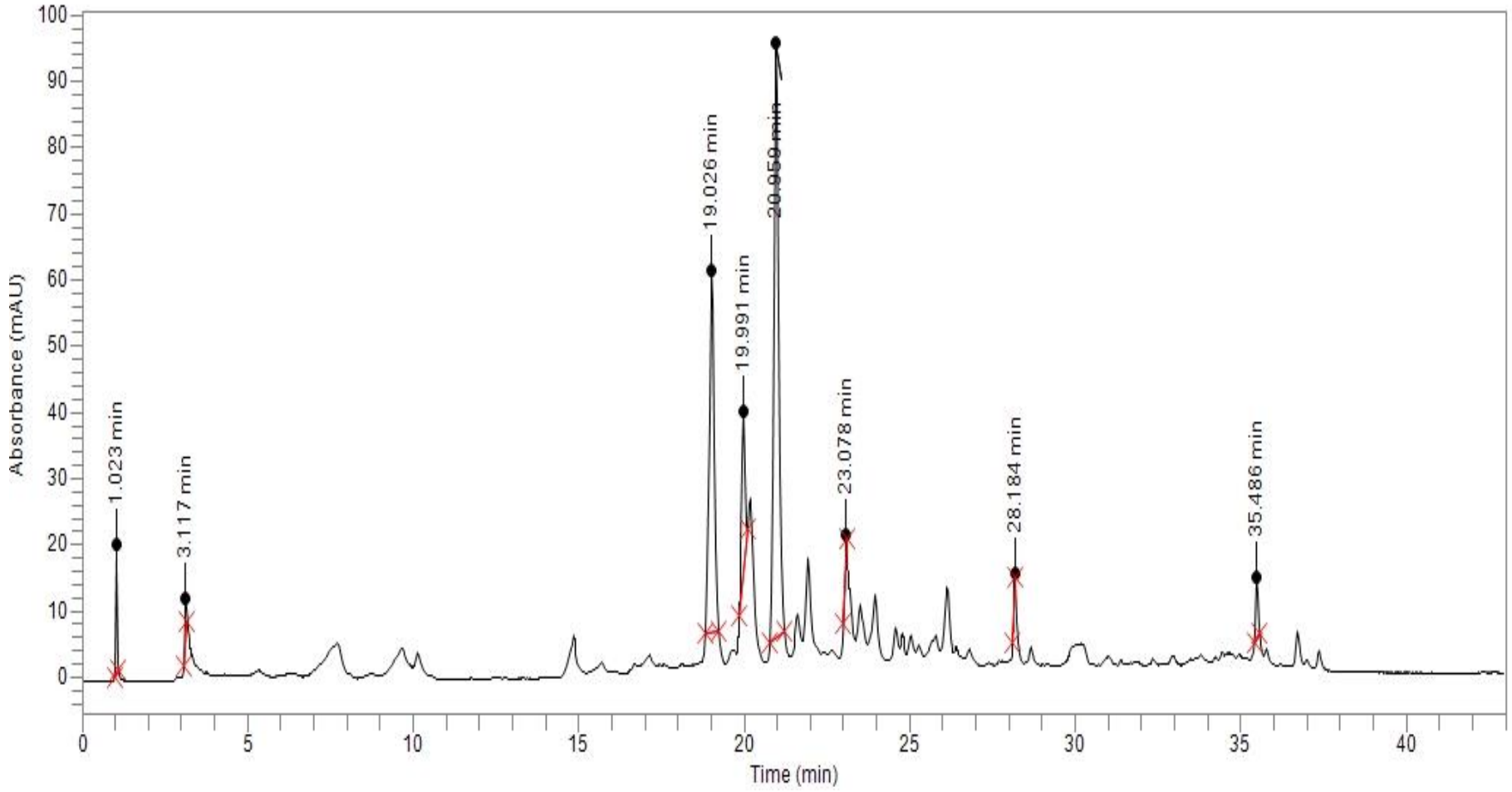
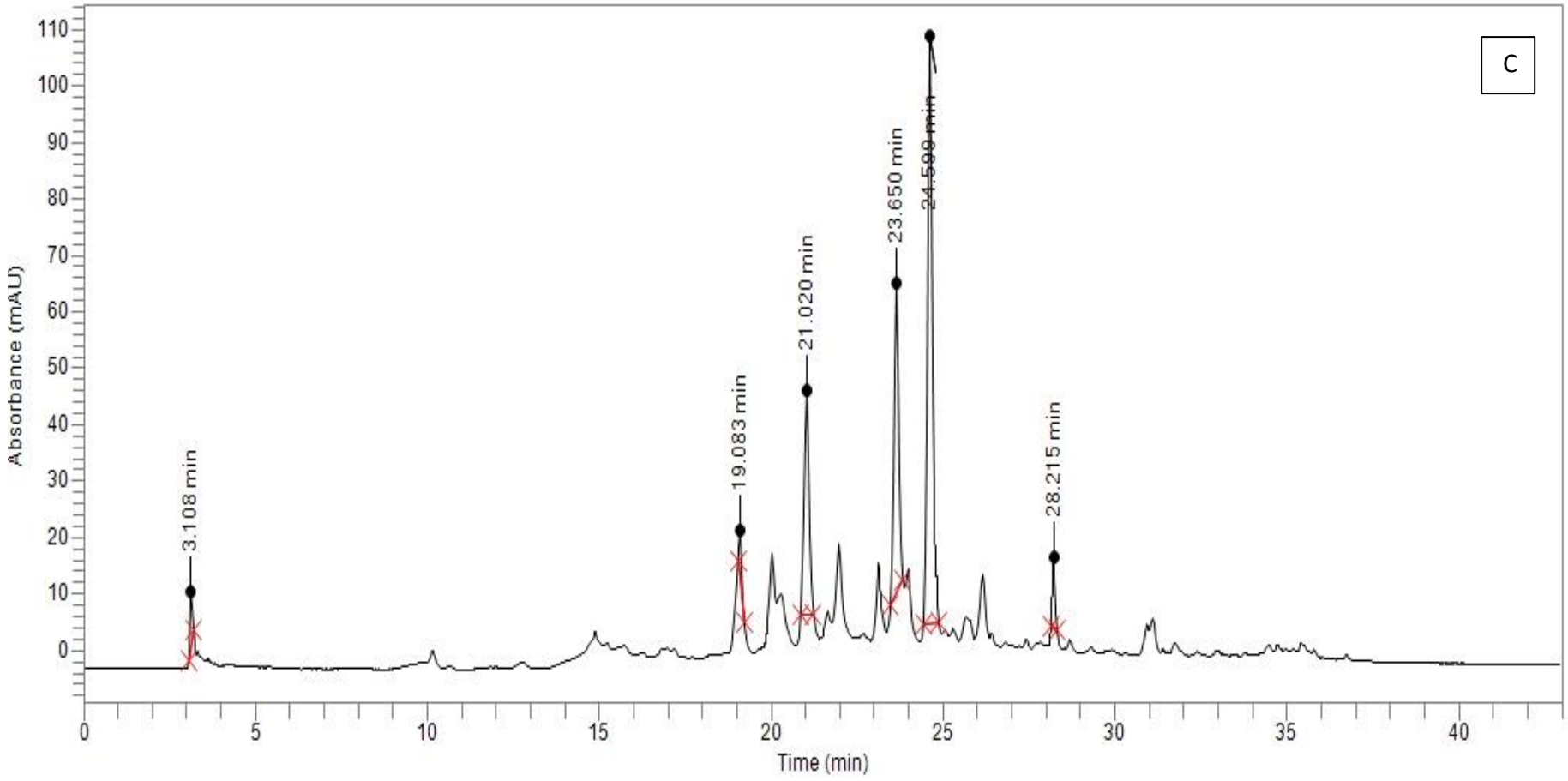


Figura 9. Cromatograma EEMp3 (3 mg/mL). Análises em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, monitoramento em 324 nm; volume de injeção 20µL.

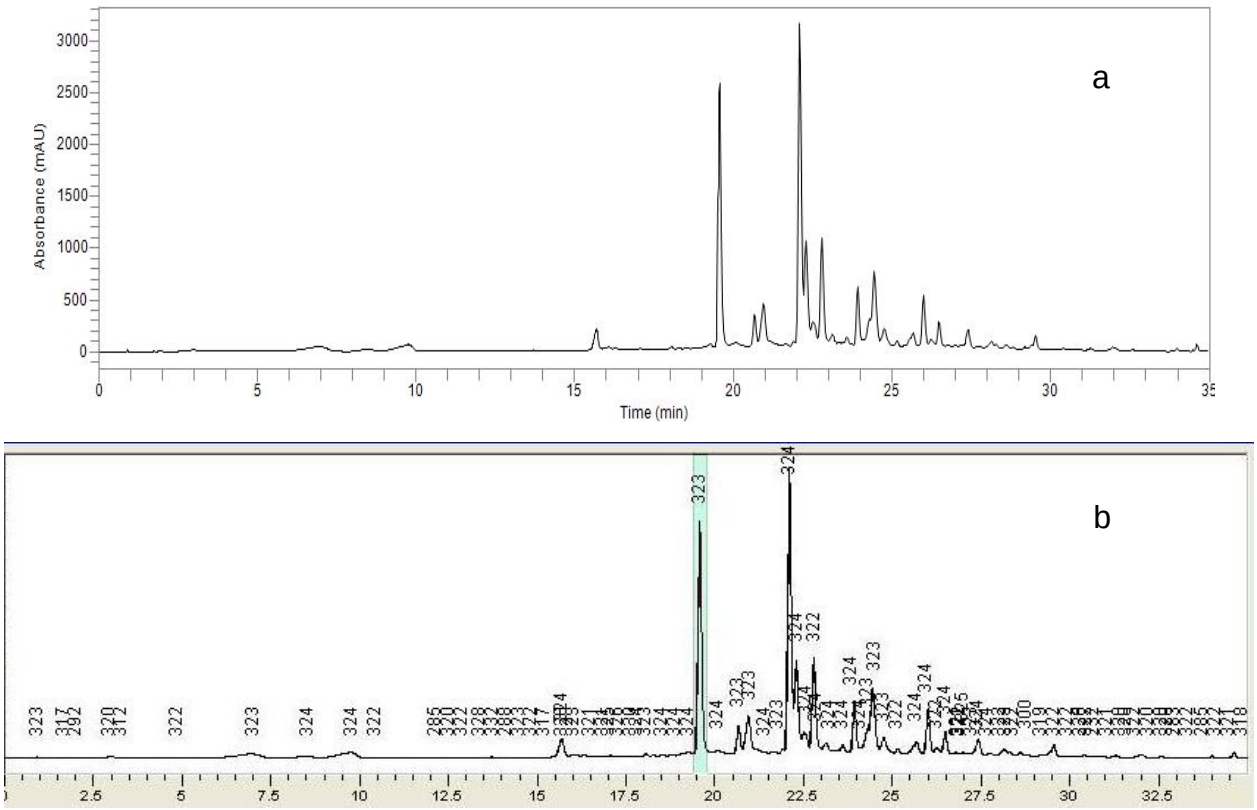


A partir desses resultados foi decidido reunir os extratos obtidos e a seguir só será feita referência ao EEMp (mistura dos extratos EEMp1-3).

5.2.2 Análises cromatográficas do extrato EEMp

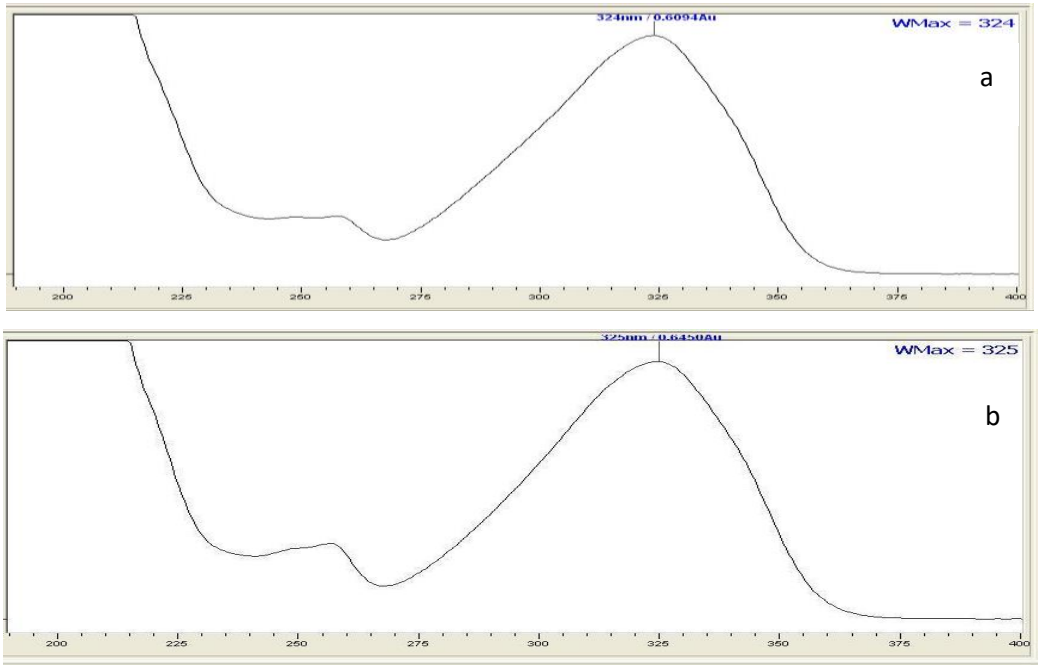
O EEMp foi analisado por CLAE-DAD e a figura 10 representa o perfil cromatográfico com o comprimento de onda máximo para cada pico. É importante destacar que muitos dos picos apresentaram espectro no UV com um valor de $\lambda_{máx}$ por volta dos 320 nm o que pode indicar a presença de metabólitos da mesma classe. Considerando os abundantes estudos fitoquímicos que relatam a presença de cumarinas, flavonoides e alcaloides em *M. paniculata* e o fato também relatado na literatura da forte absorção no UV das cumarinas, por volta dos 300 nm, devido aos grupos de cromóforos característicos (MATOS et al., 2015), essa poderia ser a classe dos metabólitos majoritários das folhas de *M. paniculata* cultivada em Cuba.

Figura 10. Cromatograma do EEMp (3 mg/mL) registrado em 324 nm (10a) e apresentando os valores de comprimento de onda máximo de absorção no UV para cada pico (10b). Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; volume de injeção de 20µL.



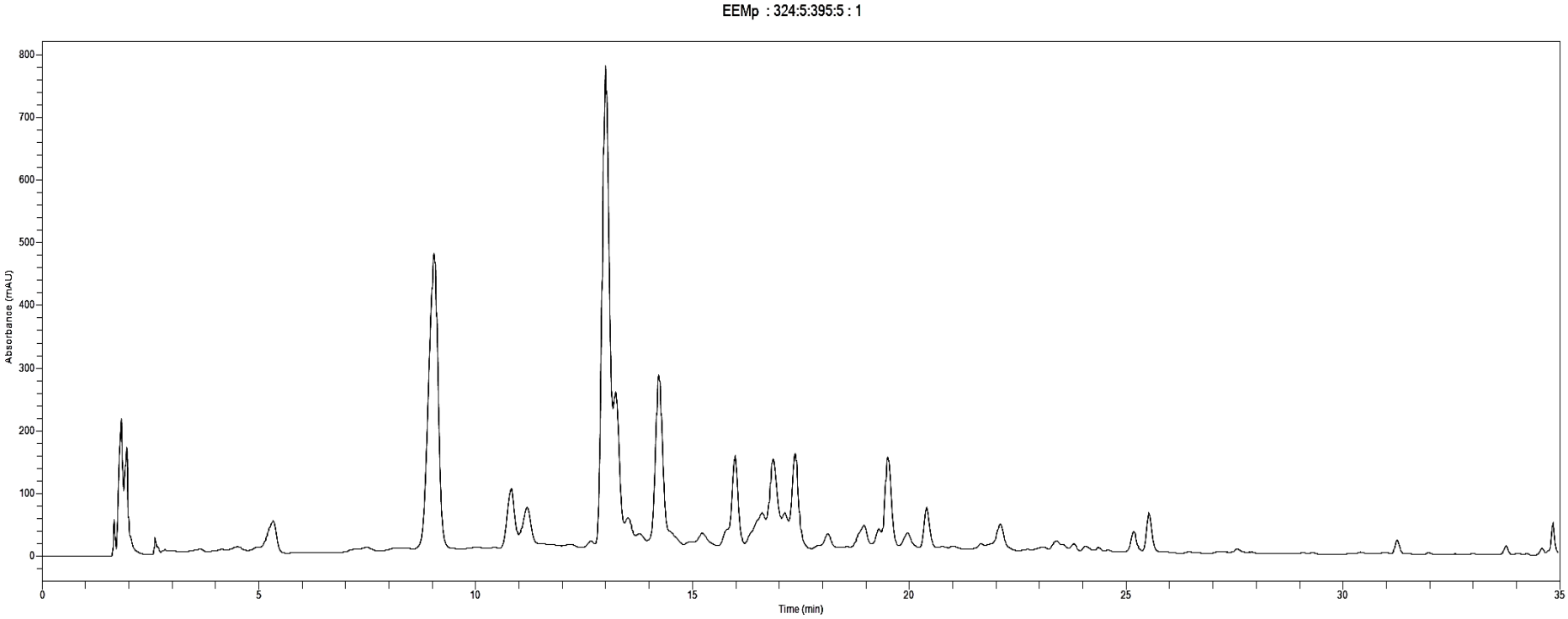
A figura 11 representa os espectros no UV dos picos majoritários dos cromatogramas da figura 10 e as semelhanças entre eles também indica a possibilidade de pertencerem à mesma classe de metabólitos secundários.

Figura 11. Espectros no UV dos picos majoritários de EEMp (a: t_R= 19,57 min e b: t_R= 22,09 min). Análise em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm.



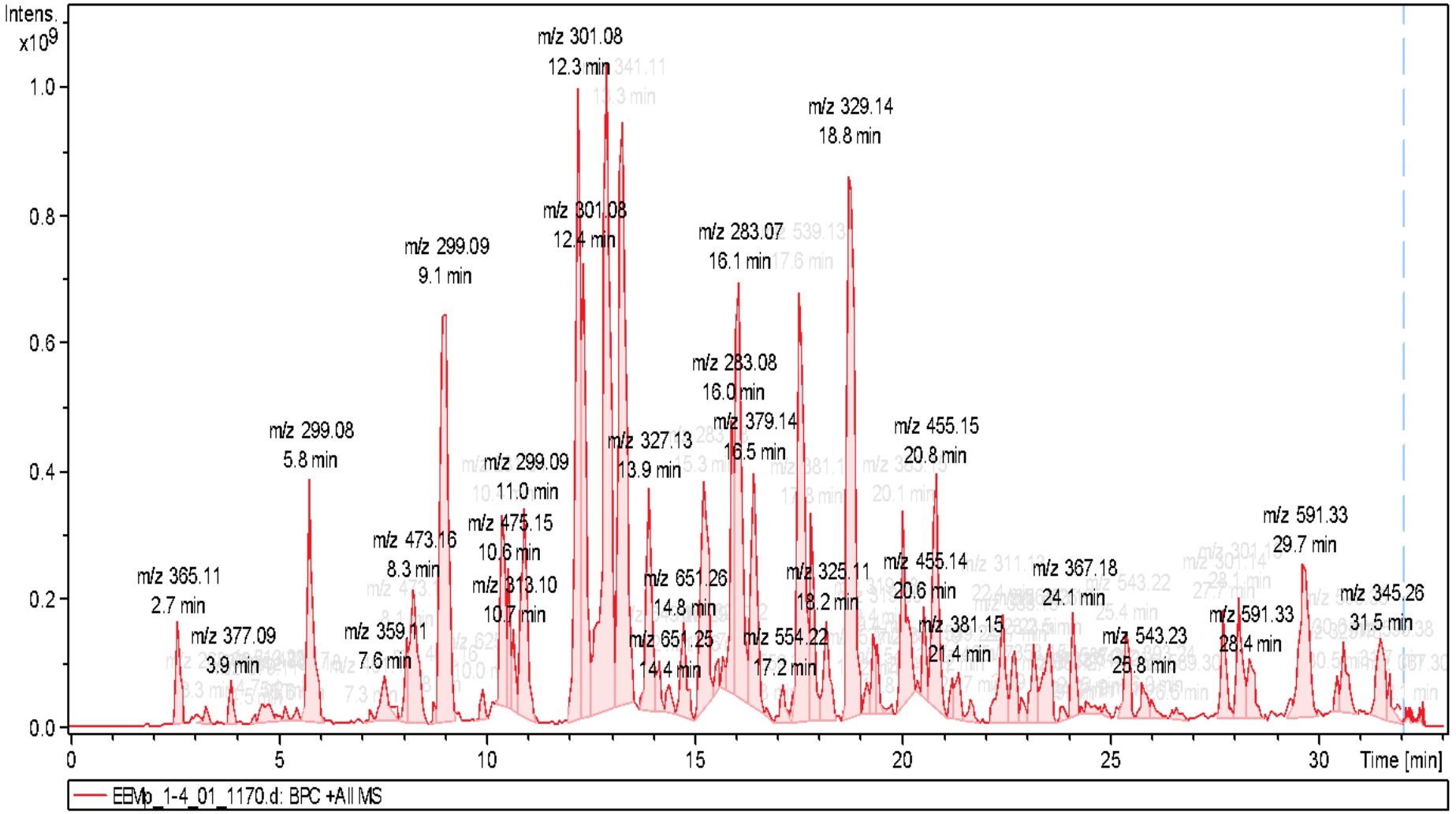
Depois de serem otimizadas as condições cromatográficas utilizadas para a análise inicial por CLAE-DAD, o extrato também foi analisado mediante CLAE-ESI-IT-MS. A figura 9 apresenta o cromatograma obtido mediante CLAE-DAD e a figura 10, o cromatograma obtido mediante CLAE-ESI-IT-MS em modo positivo e os valores de t_R e *m/z* para cada pico. Uma comparação geral entre os perfis obtidos por CLAE-DAD (figura 12) e CLAE-EM (figura 13) em termos de número de picos total e número de picos majoritários, permitiu observar um total de 39 e 79 picos, respectivamente, com 2 picos majoritários a destacar no caso de CLAE-DAD, sendo que pelo CLAE-EM foram observados 7 picos de maior intensidade.

Figura 12. Cromatograma do EEMp (3 mg/mL) registrado em 324 nm. Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 40% para 95% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; volume de injeção de 20µL.



A partir da análise do cromatograma obtido por CLAE-EM, que apresenta uma maior complexidade com um maior numero de picos de elevada intensidade quando comparado com o cromatograma obtido por CLAE-DAD, resulta evidente que metabolitos da mesma classe que estão presentes em baixa concentração no extrato, mas apresentam um maior poder de ionização, são os responsáveis pelos picos de maior intensidade observados no CLAE-EM.

Figura 13. Cromatograma (BPC) do EEMp (3 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. Análises em CLAE-ESI-IT-MS em coluna Phenomenexl®, Luna (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 40% para 95% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min.

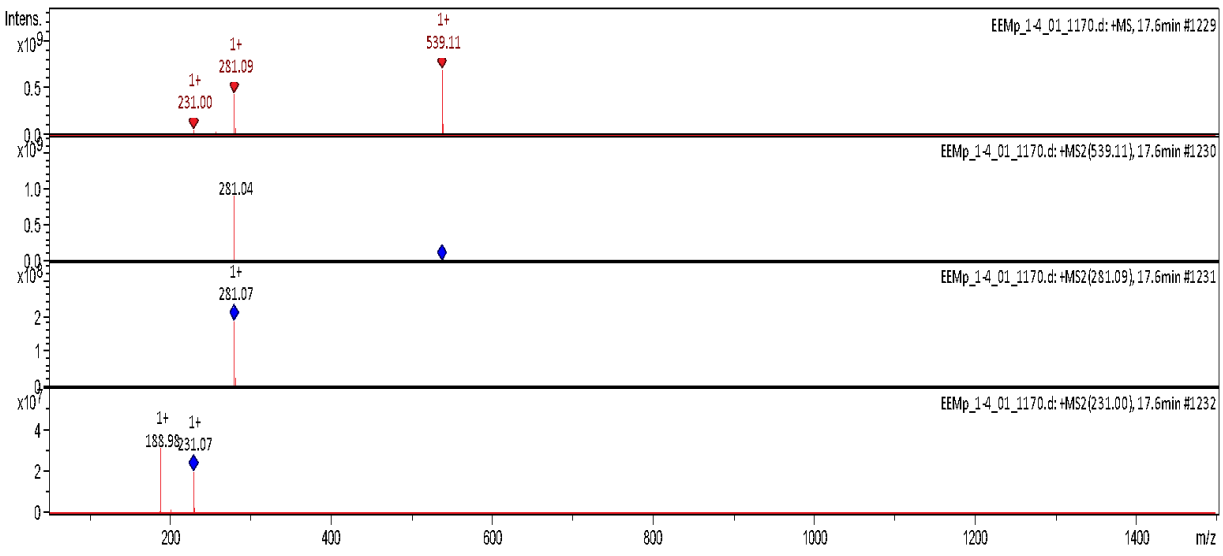


5.2.2.1 Proposta de identificação de metabolitos majoritários de EEMp

A identificação dos picos majoritários obtidos mediante CLAE-ESI-IT-MS pode ser realizada a partir da análise do perfil no UV e o padrão de fragmentação desses picos e consulta à literatura científica especializada. Três dos picos obtidos já foram identificados, dois deles foram purificados e a identificação e determinação estrutural estão descrita no acápite 5.2.6. Além das duas substâncias já purificadas (Tr= 9,1 min e Tr= 12,3 min) outros metabolitos que apresentam menor concentração no extrato mostraram uma elevada ionização mediante CLAE-EM o que permitiria também estabelecer propostas de identificação para alguns deles. Numa análise inicial foi observado que o comprimento de onda máximo para todas essas substâncias também estava na faixa de 320 a 325 nm o que junto ao perfil observado no UV em todos os casos, permitiu inferir a possibilidade de outras cumarinas da mesma classe das já purificadas.

Para o composto com Tr= 17,6 min no EEMp, foi observado um comprimento de onda máximo de 321nm, o espectro de MS^1 (Figura 14) apresentou um pico relativo ao íon aduto [M+M+Na]+ com valor de m/z de 539,11 concordante com a fórmula empírica $C_{15}H_{14}O_4$ do íon molecular. Nos espectros MS^2 dos íons foram observados o íon aduto [M+Na]+ com valor de m/z de 281,09 e os principais produtos da fragmentação MS^2 resultam da perda de CO ([M+H-CO] m/z 231,00) e da perda adicional de C_3H_6 ([M+H-CO- C_3H_6] m/z 188,98). O padrão de fragmentação pode ser atribuído à cumarina murralongina.

Figura 14: Espectros de massas ESI-MS^n no modo positivo para a substância com Tr= 17,6 min no EEMp.

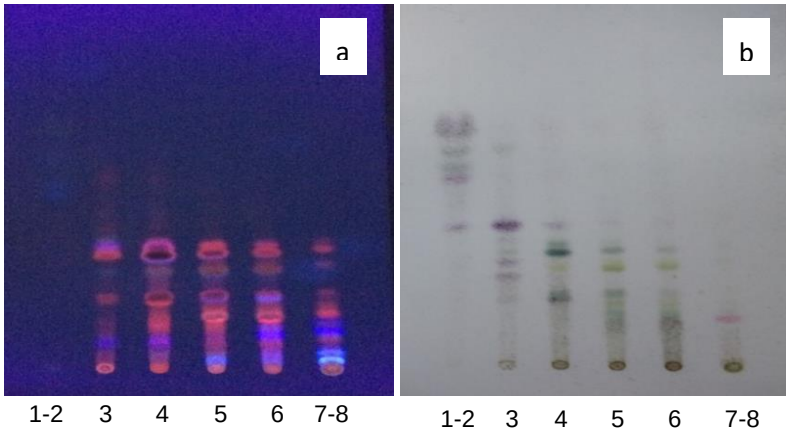


5.2.3 Fracionamento de EEMp por extração em fase sólida (EFS) e análise das frações EFSMp

O objetivo deste fracionamento foi obter frações com composições químicas diferentes, adequadas para o fracionamento biomonitorado. As condições de separação do EEMp foram otimizadas inicialmente em pequena escala mediante a realização de dois fracionamentos teste. As frações do EEMp obtidas por EFS (testes e condição final) foram analisadas por CCD para avaliar a separação obtida.

Uma análise prévia por CCD mostrou um perfil semelhante para as frações 1 e 2 as quais foram reunidas, assim como as frações 7 e 8. É possível observar na figura 15 a similaridade entre as frações 5 e 6 e todas as condições testadas mostraram similaridade entre as mesmas frações. Os perfis de bandas das frações no UV (figura 15a) tem maior semelhança do que os perfis após revelação com anisaldeído sulfúrico (figura 15b).

Figura 15. Análise por CCD (sílica gel; 0,25nm) das frações obtidas por EFS (EFSMp) utilizando tolueno:acetato de etila (93:7) como fase móvel. (a) – cromatoplaca observada sob luz UV 365 nm. (b) – cromatoplaca após revelação com anisaldeído sulfúrico.



Foi decidido então trabalhar com 4 frações, correspondentes às fases móveis utilizadas no fracionamento por EFS, sendo denominadas como segue: EFSMp1 [fração obtida com Hex:AcOEt (95:5)], EFSMp2 [fração obtida com Hex:AcOEt (80:20)], EFSMp3 [fração obtida com Hex:AcOEt (70:30)] e EFSMp4 [fração obtida com metanol]. A tabela 4 apresenta o rendimento das fracões em relação à massa total de EEMp utilizada no procedimento de EFS.

Tabela 4. Rendimento das frações obtidas por EFS.

Fração	Frações da Figura 15 (CCD)	Eluente	Rendimento (%)
EFSMp1	1-2	Hex:AcOEt (95:05)	9,0
EFSMp2	3-4	Hex:AcOEt (80:20)	12,8
EFSMp3	5-6	Hex:AcOEt (70:30)	10,4
EFSMp4	7-8	metanol	55,1

As frações EFSMp1-4 foram analisadas por CLAE-DAD inicialmente utilizando o gradiente exploratório descrito no item 4.3.3.2 e, em seguida, as condições foram otimizadas, sendo modificados os gradientes de fase móvel. Para as amostras EFSMp1 e EFSMp2 o gradiente utilizado foi de 70-95% de metanol em 30 min, mais 5 min com metanol 100% e para EFSMp3 e EFSMp4, gradiente de 40-95% de metanol; as demais condições cromatográficas foram mantidas conforme item 4.3.3.3. Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD nas condições otimizadas se mostram na figura 13. Para as frações EFSMp1 e EFSMp2 foram obtidos cromatogramas com poucos picos e valores baixos de absorbância. Quanto as frações EFSMp3 e EFSMp4 observaram-se cromatogramas mais complexos e picos com áreas maiores; os dois picos majoritários observados no cromatograma do extrato (figura 9) podem ser observados tanto no cromatograma da fração EFSMp3 quanto na fração EFSMp4 (tR=9,2min e tR= 13,1min) (figura 13).

As quatro frações em estudo, também foram analisadas mediante CLAE-ESI-IT-MS seguindo as mesmas condições cromatográficas utilizadas para a análise por CLAE-DAD. As figuras 12-15 apresentam os cromatogramas obtidos em modo positivo e os valores de t_R e *m/z* para cada pico.

Uma comparação geral entre os perfis obtidos por CLAE-DAD (figura 16-19) e CLAE-EM (figuras 20-23) foi feita em termos de número de picos total e da mesma forma que para o extrato observou-se uma menor quantidade de picos nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. Para EFSMp1 e EFSMp2 (figuras 16 e 17) foram obtidos cromatogramas com menor número de picos (43 e 33) quando comparados com EEMp e valores baixos de intensidade por CLAE-EM, mostrando para ambas as frações só um pico de maior intensidade, o qual, considerando a coincidência de t_R (34,1 min) e *m/z* (413,29) permite inferir a presença da mesma substância, de baixa polaridade, nas duas frações. As frações EFSMp3 e EFSMp4

(figuras 18 e 19) mostraram cromatogramas mais complexos (69 e 64 picos, respectivamente), quando comparados com EFSMp1 e EFSMp2, e picos de maior intensidade por CLAE-EM. Adicionalmente as frações EFSMp3 e EFSMp4 apresentam um perfil muito similar ao perfil de EEMp sendo também observados 7 picos de maior intensidade, coincidentes em t_R e *m/z* o que permite inferir a presença dos mesmos compostos majoritários do extrato nas duas frações.

Figura 16. Cromatograma da fração EFSMp 1 (1 mg/mL; metanol). Análise em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 70-95% v/v em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em λ 190-400 nm. Cromatograma registrado em 254 nm.

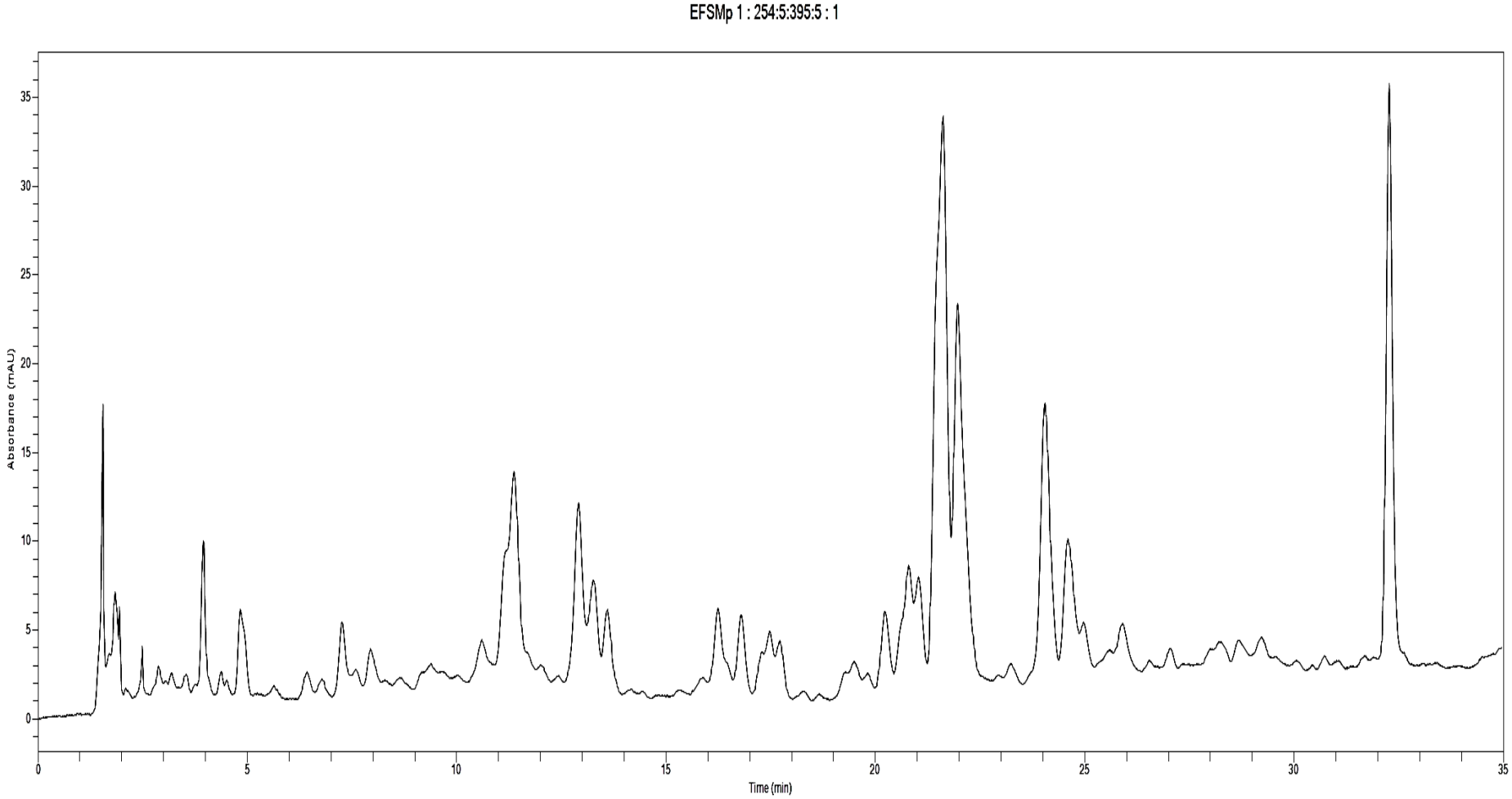


Figura 17. Cromatograma da fração EFSMp 2 (1 mg/mL; metanol). Análise em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 70-95% v/v em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em λ 190-400 nm. Cromatograma registrados em 324 nm.

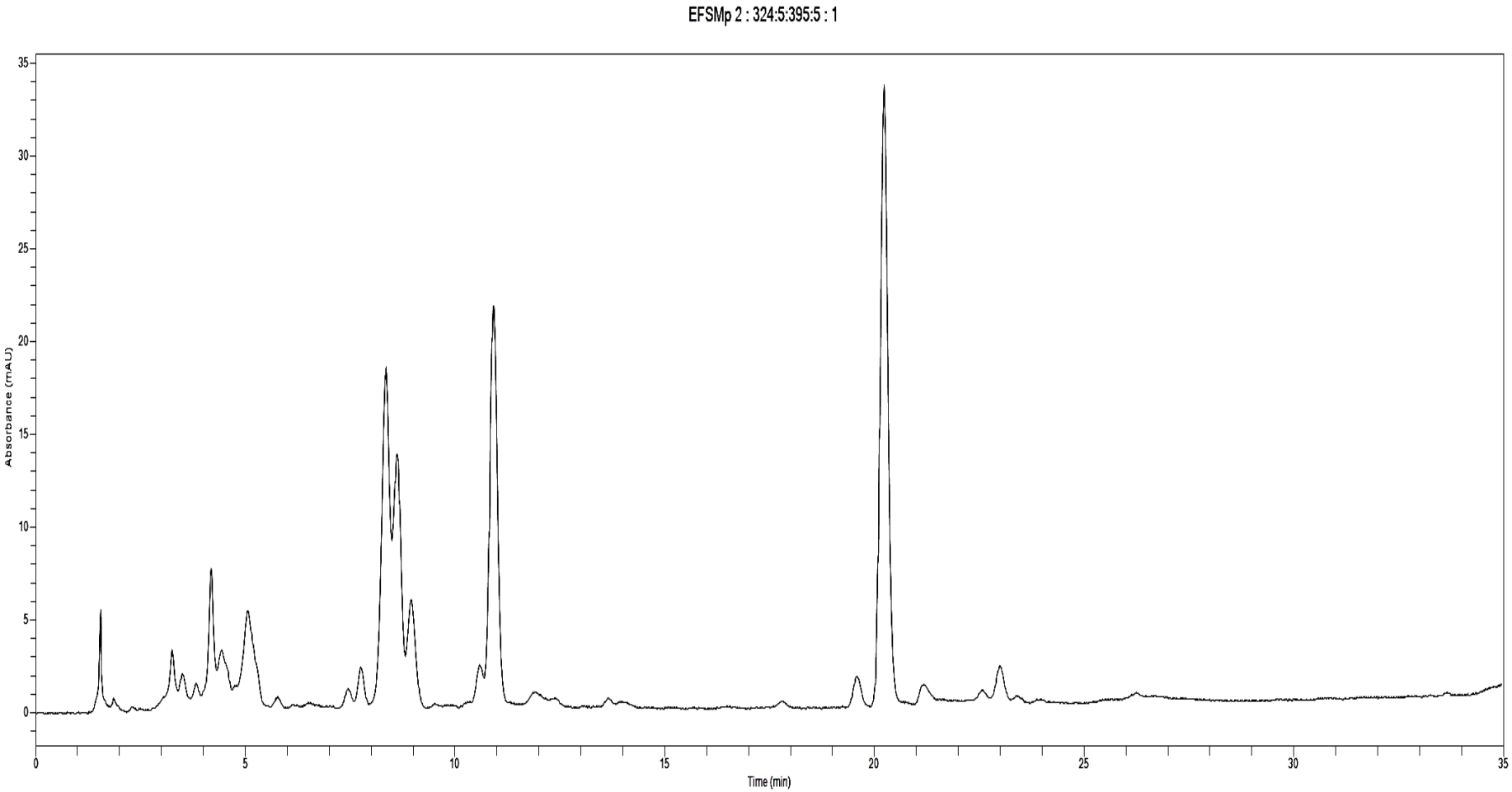


Figura 18. Cromatograma da fração EFSMp 3 (1 mg/mL; metanol). Análise em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 40-95% v/v em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em λ 190-400 nm. Cromatograma registrado em 324 nm.

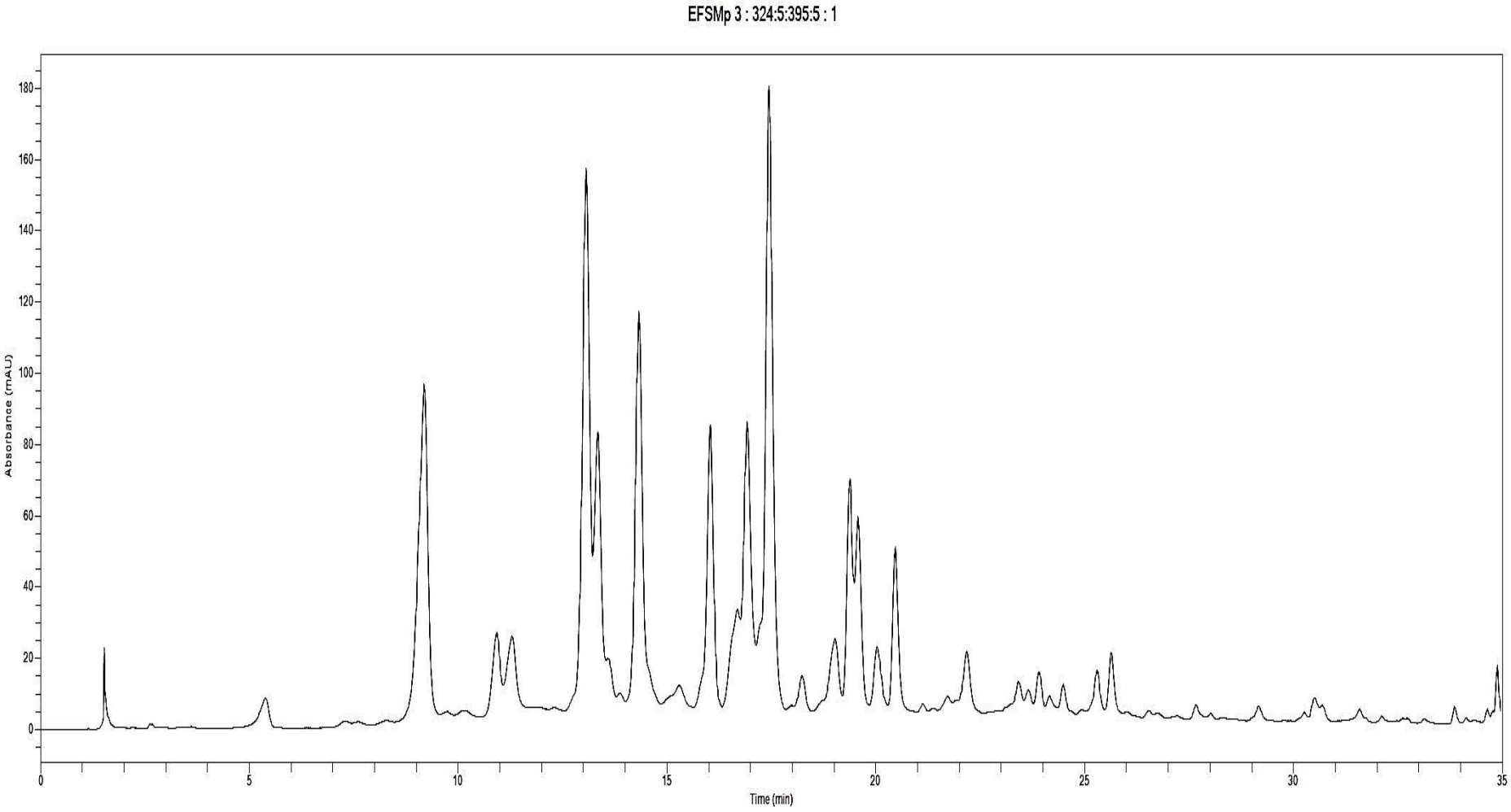


Figura 19. Cromatograma da fração EFSMp 4 (1 mg/mL; metanol). Análise em CLAE-DAD, coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 40-95% v/v em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em λ 190-400 nm. Cromatograma registrado em 324 nm.

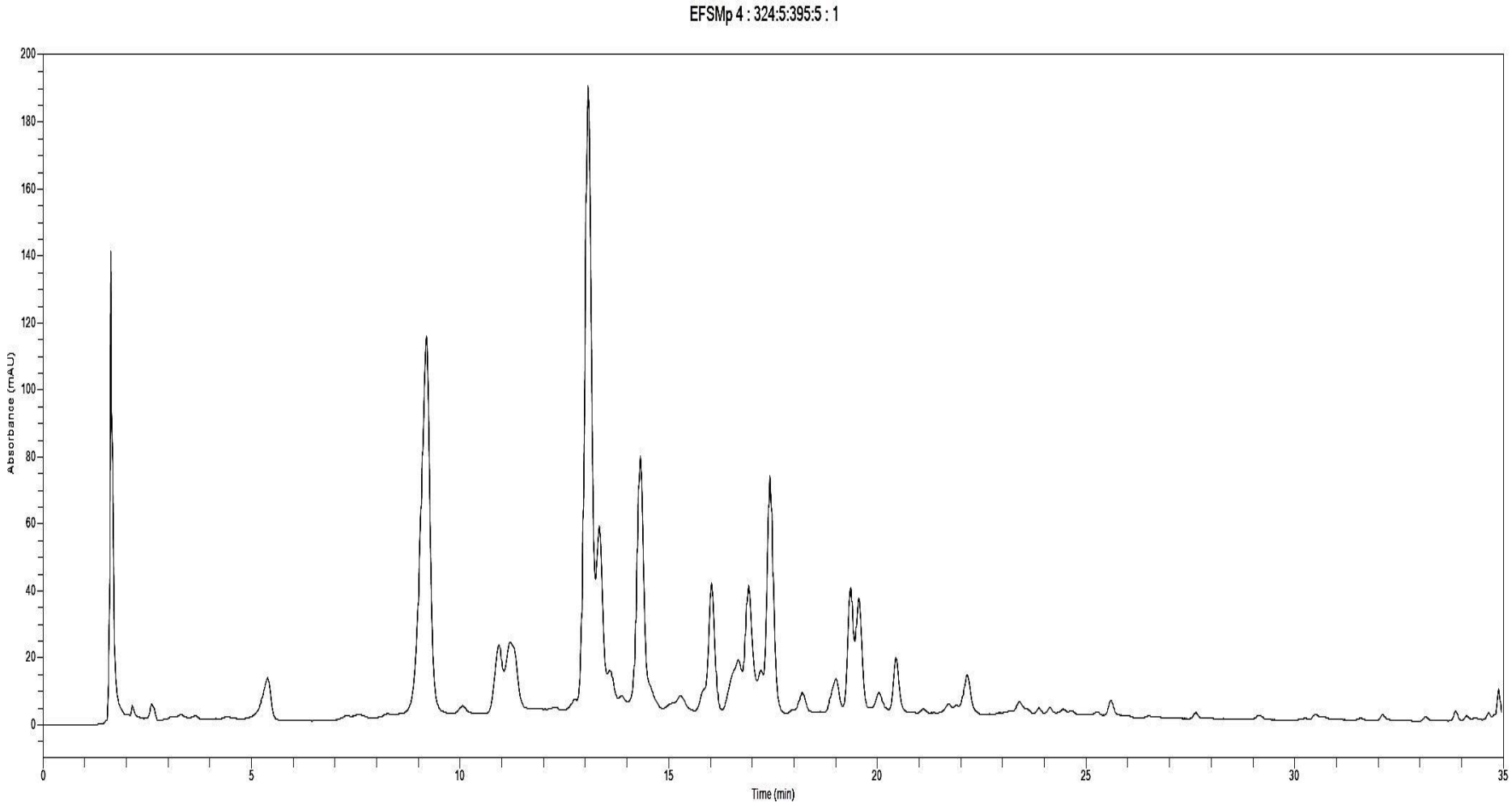


Figura 20. Cromatograma (BPC) do EFSMp1 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. Análises em CLAE-ESI-IT-MS em coluna Phenomenexl®, Luna (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 70% para 95% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min.

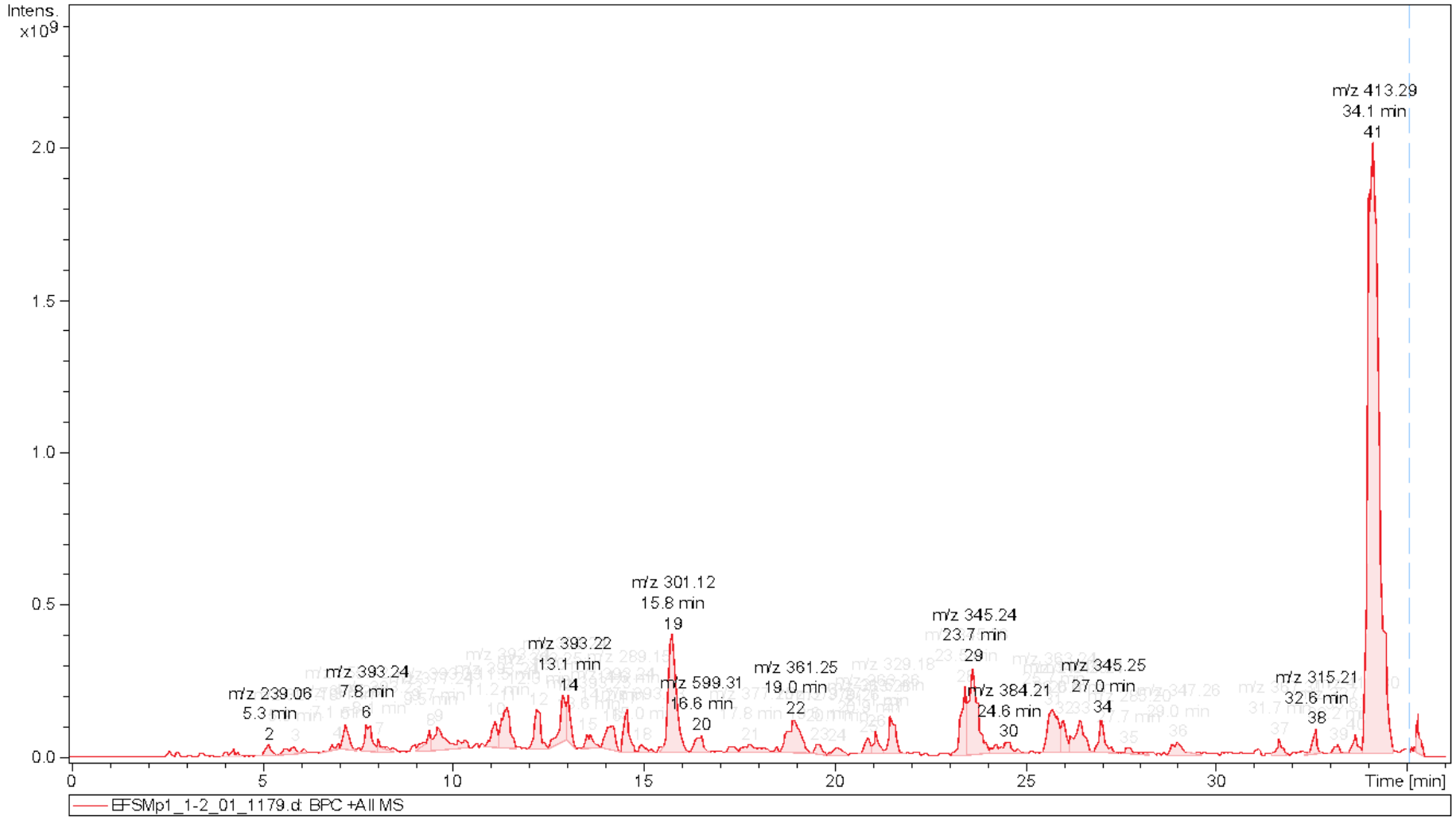


Figura 21. Cromatograma (BPC) do EFSMp2 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. Análises em CLAE-ESI-IT-MS em coluna Phenomenexl®, Luna (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 70% para 95% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min.

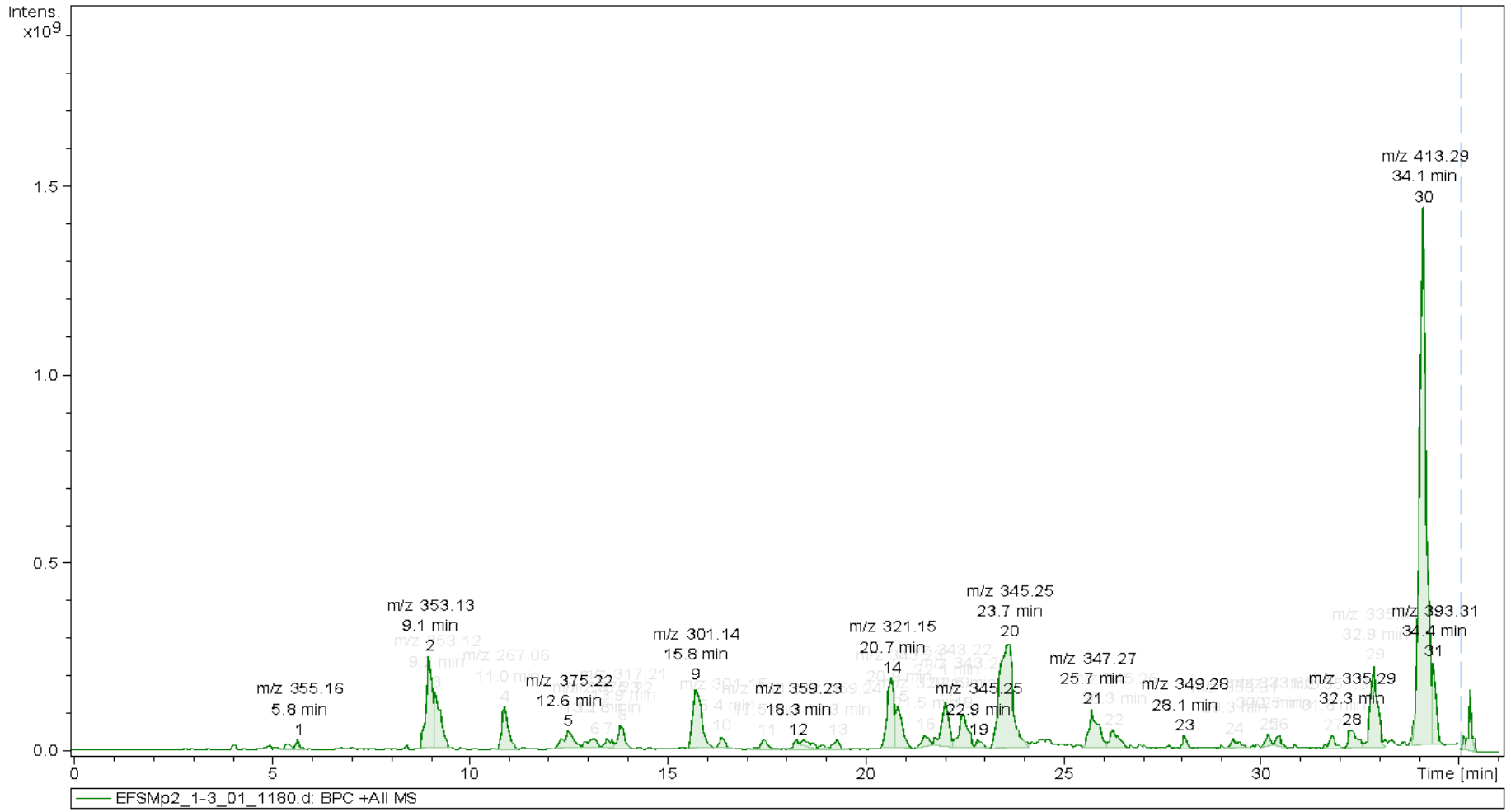


Figura 22. Cromatograma (BPC) do EFSMp3 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. Análises em CLAE-ESI-IT-MS em coluna Phenomenexl®, Luna (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 40% para 95% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min.

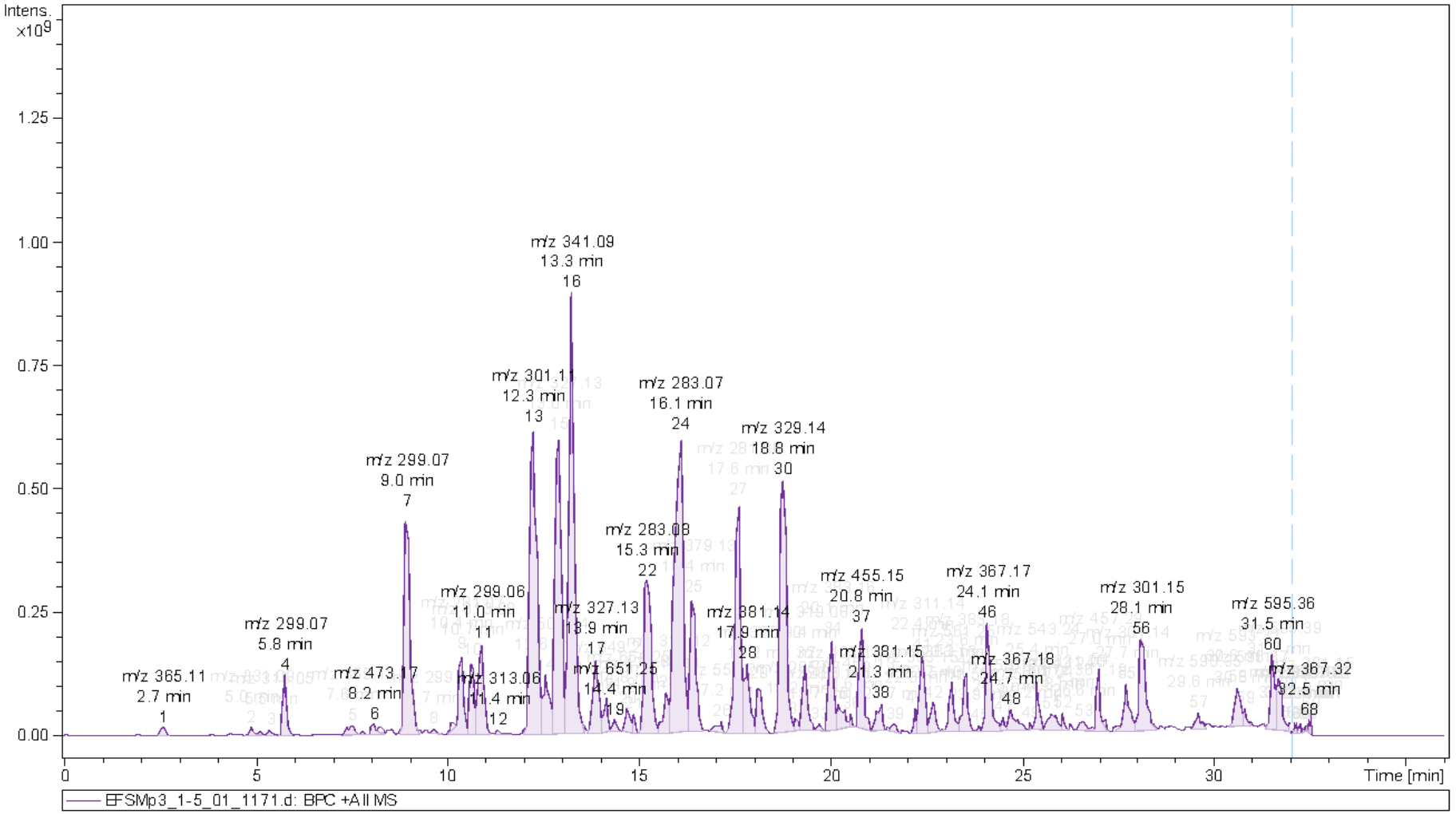
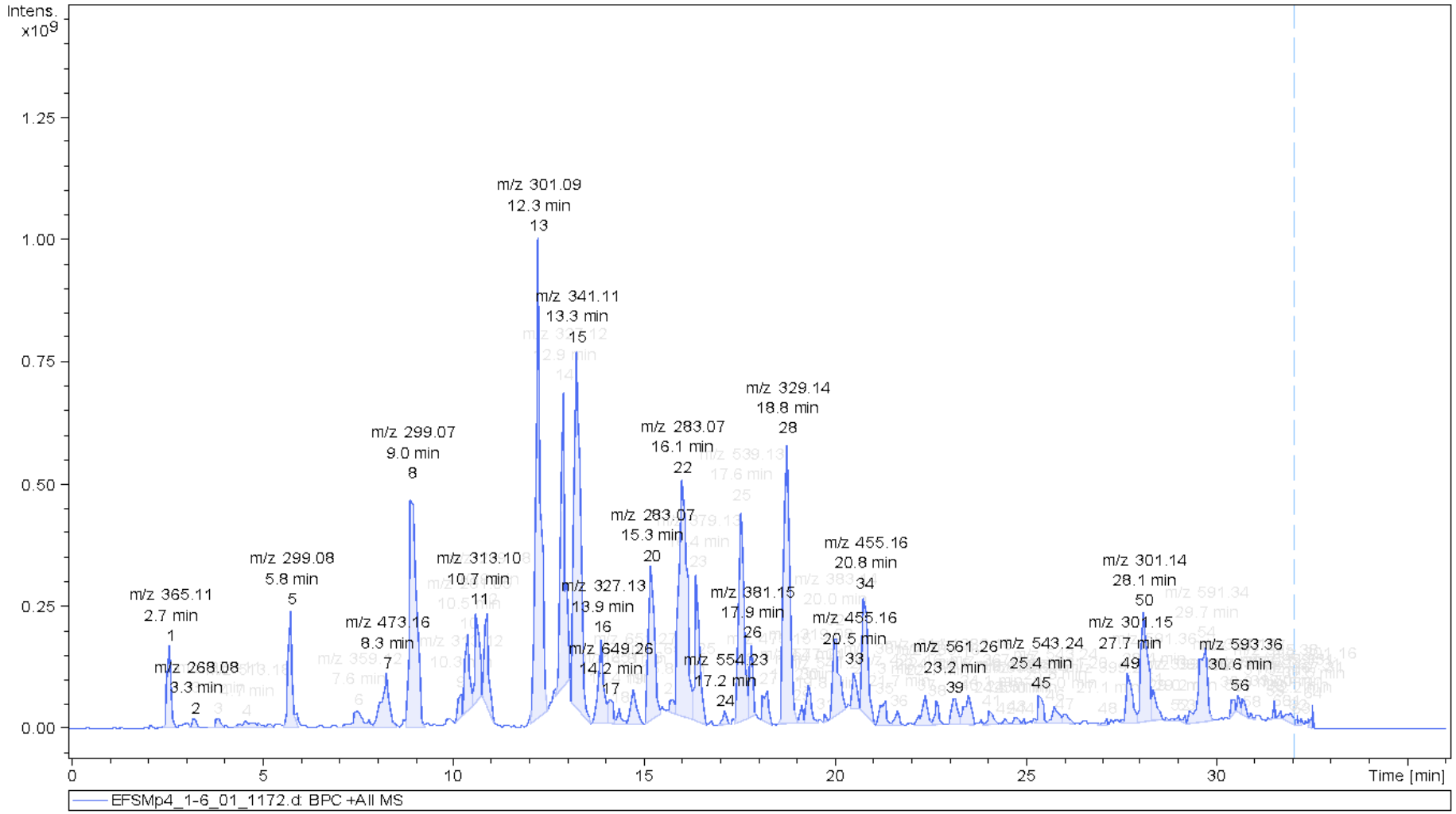


Figura 17. Cromatograma (BPC) do EFSMp4 (1 mg/mL) em modo de ionização positivo mostrando os valores de t_R e *m/z* para cada pico. Análises em CLAE-ESI-IT-MS em coluna Phenomenexl®, Luna (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 40% para 95% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min.



5.2.4 Fracionamento de EFSMp4 por cromatografia em coluna de fase normal (CC) e análises das sub-frações CCMp

O estabelecimento das condições de separação por CC de fase normal foi feito seguindo as recomendações referidas por STILL et al. (1978) com adaptações. As condições foram estabelecidas a partir de análises por CCD, determinando desta forma uma sequência de eluentes para o sistema cromatográfico. Foi utilizada uma condição inicial de CCD onde todas manchas da cromatoplaca mostravam valores de R_f<0,5 (condição em CCD A) e outra condição que proporcionou distribuição das bandas entre 0,2<R_f<0,8 (condição em CCD B). O primeiro eluente da fase móvel da CC correspondeu à fase móvel da condição A em CCD e o último eluente da CC correspondeu à fase móvel da condição B em CCD, tendo sido estabelecido um gradiente de força de eluição crescente entre estes eluentes. Um total de 70 frações foram obtidas e analisadas por CCD e CLAE-DAD com o objetivo de purificar os metabólitos secundários majoritários da EFSMp4 os quais coincidem com os metabólitos secundários majoritários identificados no EEMp. A Tabela 5 apresenta as massas obtidas para cada sub-fração e o rendimento das mesmas e a Figura 24 mostra os resultados da análise por CCD, com evidência das diferenças qualitativas na composição das sub-frações.

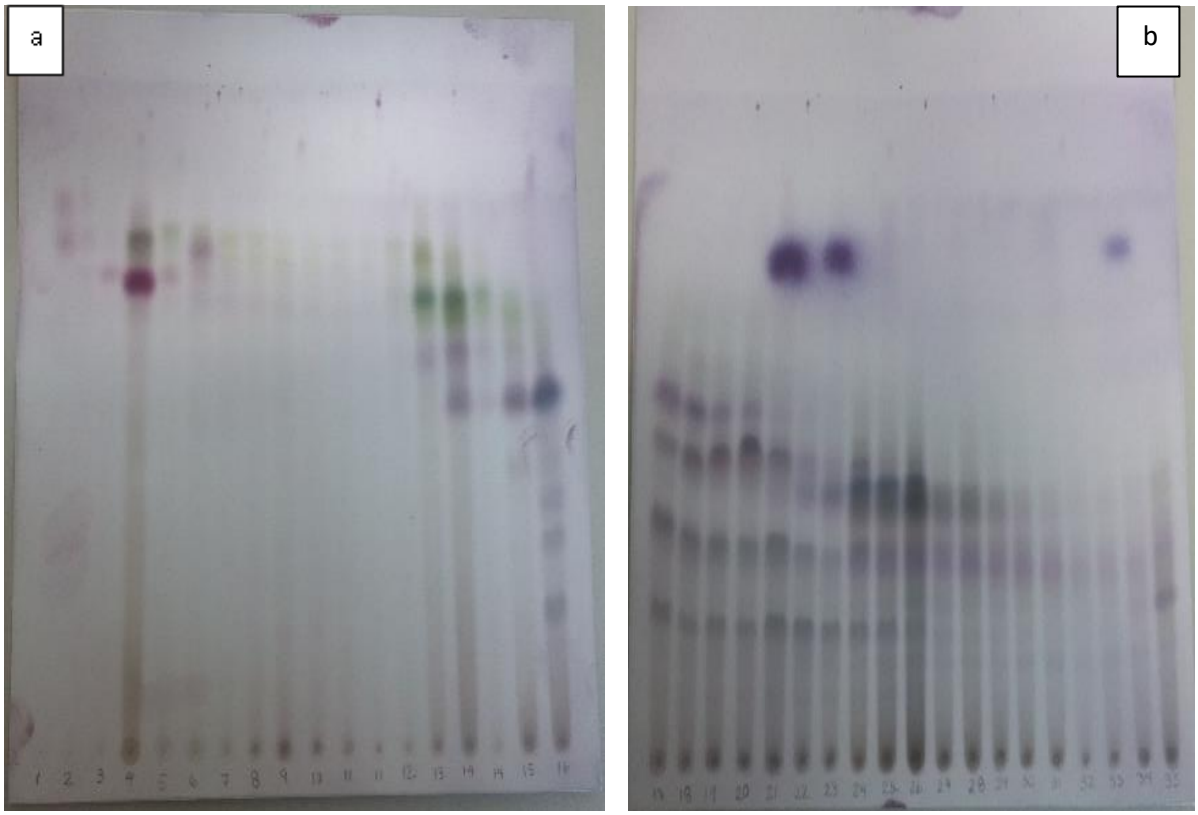
Tabela 5: Massas e rendimento das sub-frações obtidas a partir de EFSMp4

Sub-fração	Massa (mg)	Rendimento (%)	Sub-fração	Massa (mg)	Rendimento (%)	Sub-fração	Massa (mg)	Rendimento (%)	Sub-fração	Massa (mg)	Rendimento (%)
CCMp1	1,2	0,33	CCMp20	6,9	1,91	CCMp39	2,1	0,58	CCMp58	3,1	0,86
CCMp2	1,1	0,30	CCMp21	11,7	3,25	CCMp40	3,2	0,88	CCMp59	3,3	0,91
CCMp3	0,7	0,19	CCMp22	5,5	1,52	CCMp41	1,9	0,52	CCMp60	3,4	0,94
CCMp4	0,8	0,22	CCMp23	8,8	2,44	CCMp42	3,2	0,88	CCMp61	44,45	12,34
CCMp5	0,6	0,16	CCMp24	7,4	2,05	CCMp43	3,8	1,05	CCMp62	33,1	9,16
CCMp6	1,5	0,41	CCMp25	7,5	2,08	CCMp44	6,1	1,69	CCMp63	7,3	2,02
CCMp7	1,4	0,38	CCMp26	9,1	2,52	CCMp45	8,2	2,27	CCMp64	3,9	1,08
CCMp8	0,9	0,25	CCMp27	7,8	2,16	CCMp46	9,1	2,52	CCMp65	2,8	0,77
CCMp9	1,1	0,30	CCMp28	7,3	2,02	CCMp47	6,4	1,77	CCMp66	2,3	0,63
CCMp10	1,3	0,36	CCMp29	4,3	1,19	CCMp48	4,4	1,22	CCMp67	2,4	0,66
CCMp11	1,5	0,41	CCMp30	2,5	0,69	CCMp49	3,4	0,94	CCMp68	1,5	0,41
CCMp12	2,6	0,72	CCMp31	1,5	0,41	CCMp50	10,0	2,77	CCMp69	1,8	0,50
CCMp13	3,2	0,88	CCMp32	2,4	0,66	CCMp51	14,1	3,91	CCMp70	0,7	0,19
CCMp14	4,9	1,36	CCMp33	2,0	0,55	CCMp52	11,8	3,27			
CCMp15	11,0	3,05	CCMp34	1,4	0,38	CCMp53	6,7	1,86			
CCMp16	16,2	4,50	CCMp35	1,8	0,50	CCMp54	4,8	1,33			
CCMp17	10,6	2,94	CCMp36	2,5	0,69	CCMp55	4,3	1,19			
CCMp18	7,7	2,13	CCMp37	2,8	0,77	CCMp56	3,7	1,02			
CCMp19	6,6	1,83	CCMp38	2,2	0,61	CCMp57	3,5	0,97	Rendimento total		97,76

A análise das cromatoplacas permitiu observar várias frações pouco complexas e substâncias semipurificadas, indicando uma boa eficiência do método de fracionamento utilizado.

Para o monitoramento inicial por CLAE-DAD foram selecionadas algumas das frações, considerando as semelhanças entre várias frações consecutivas e as diferenças entre os grupos de frações, os perfis cromatográficos são apresentados nas figuras 25-28. É importante destacar o perfil da fração CCMp44 a qual apresenta dois picos majoritários bem resolvidos, com t_R 19,58 e 22,12 min, que coincidem com os perfis do EEMp e da EFSMp4 nas condições de gradiente exploratório. Também no caso dos espectros no UV o perfil é semelhante com valor de $\lambda_{máx}$ de 324 e 325 nm respectivamente. A figura 29 mostra o espectro de absorção no UV de um dos picos maioritários da fração em análise.

Figura 24. Análise por CCD (sílica gel; 0,25mm) de frações obtidas por CC de fase normal (CCMp) selecionadas utilizando tolueno:acetato de etila:metanol (60:35:5) como fase móvel – cromatoplacas após revelação com anisaldeído sulfúrico. Figura 18a) frações 1 a 16, 18b) frações 17 a 35, 18c) frações 36 a 54 e 18d) frações 55 a 70.



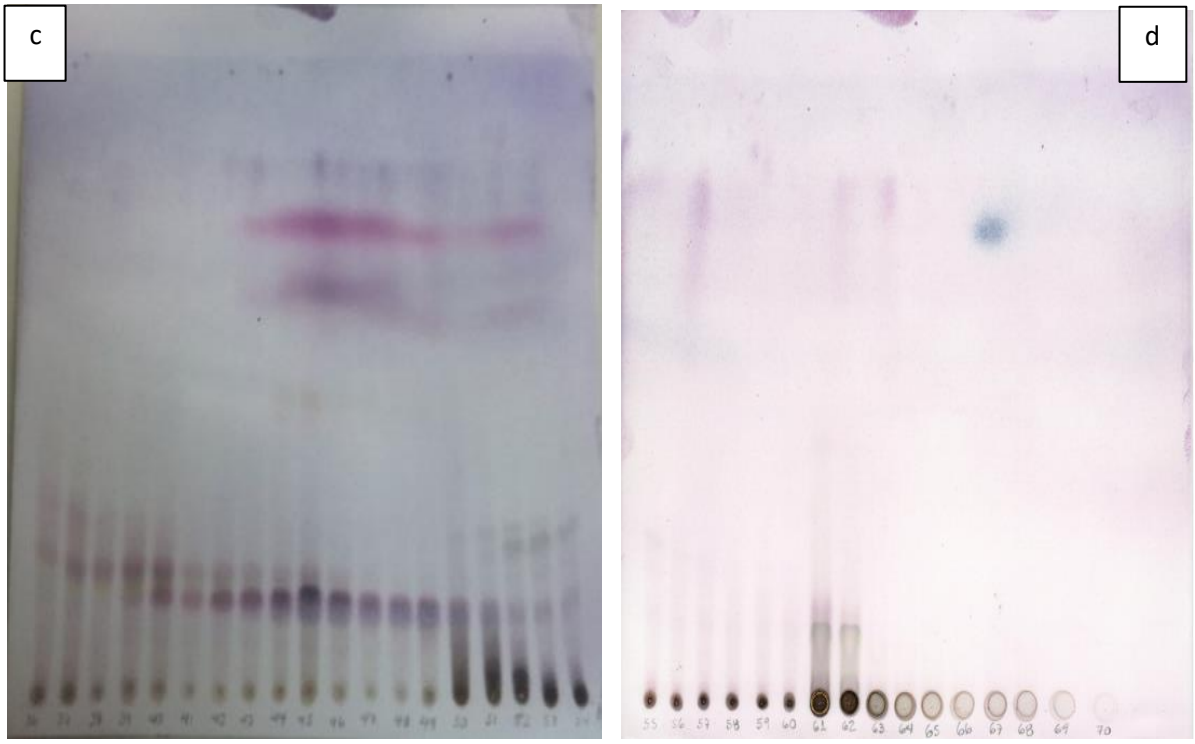


Figura 25. Cromatograma da fração CCMp16. Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, com monitoramento em 324 nm; volume de injeção de 20µL.

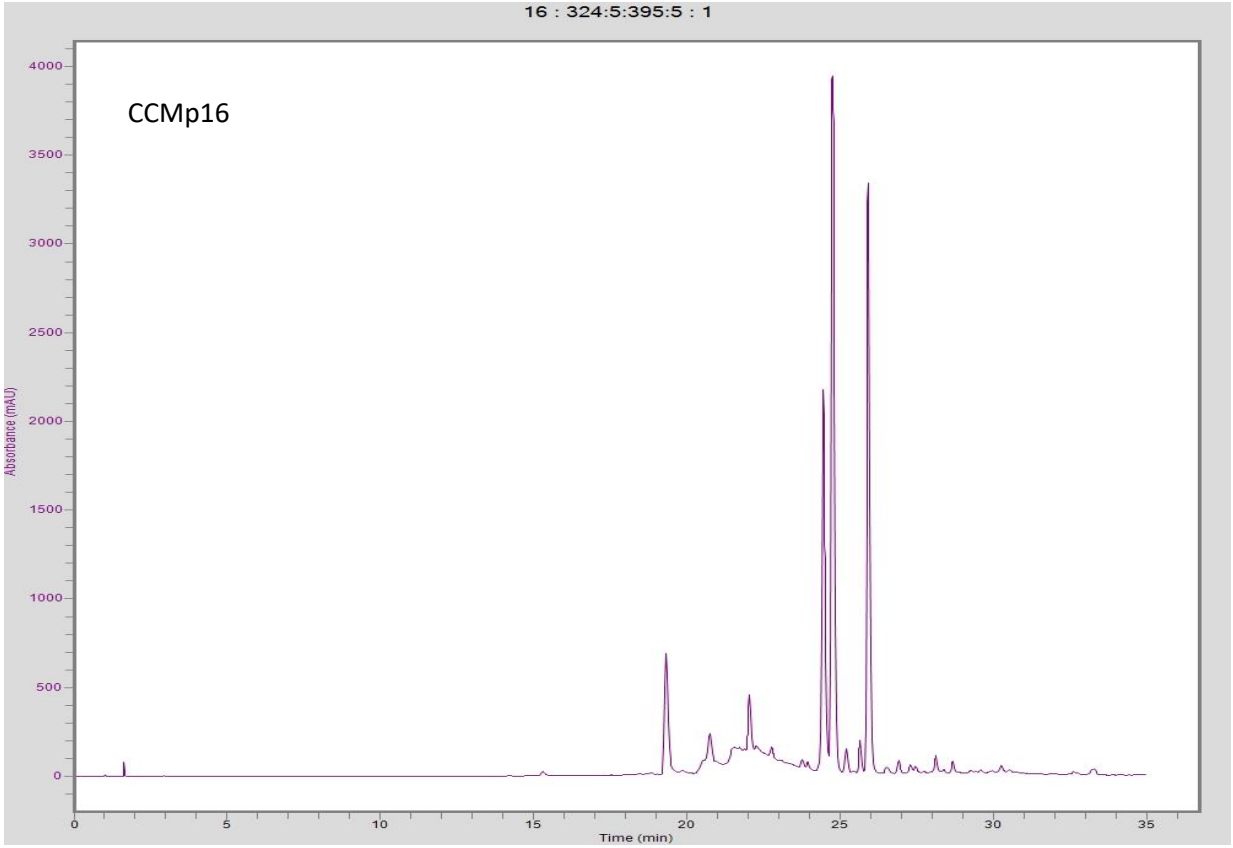


Figura 26. Cromatograma da fração CCMp24. Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, com monitoramento em 324 nm; volume de injeção de 20µL.

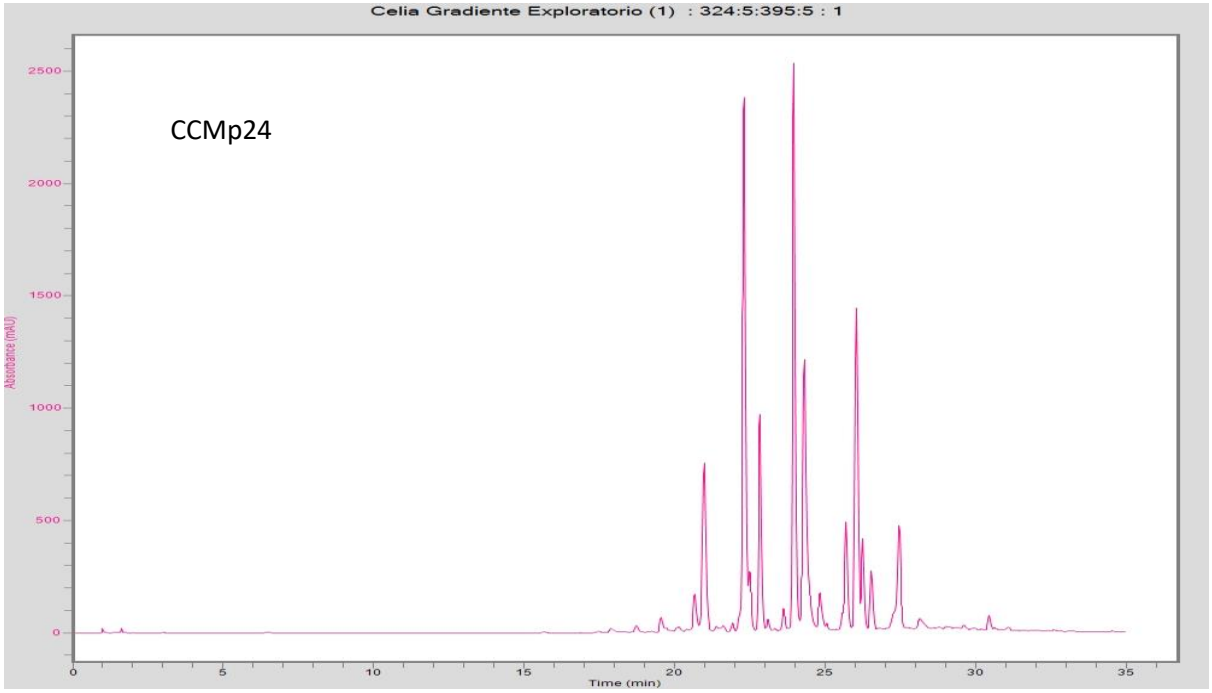


Figura 27. Cromatograma da fração CCMp44. Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, com monitoramento em 324 nm; volume de injeção de 20µL.

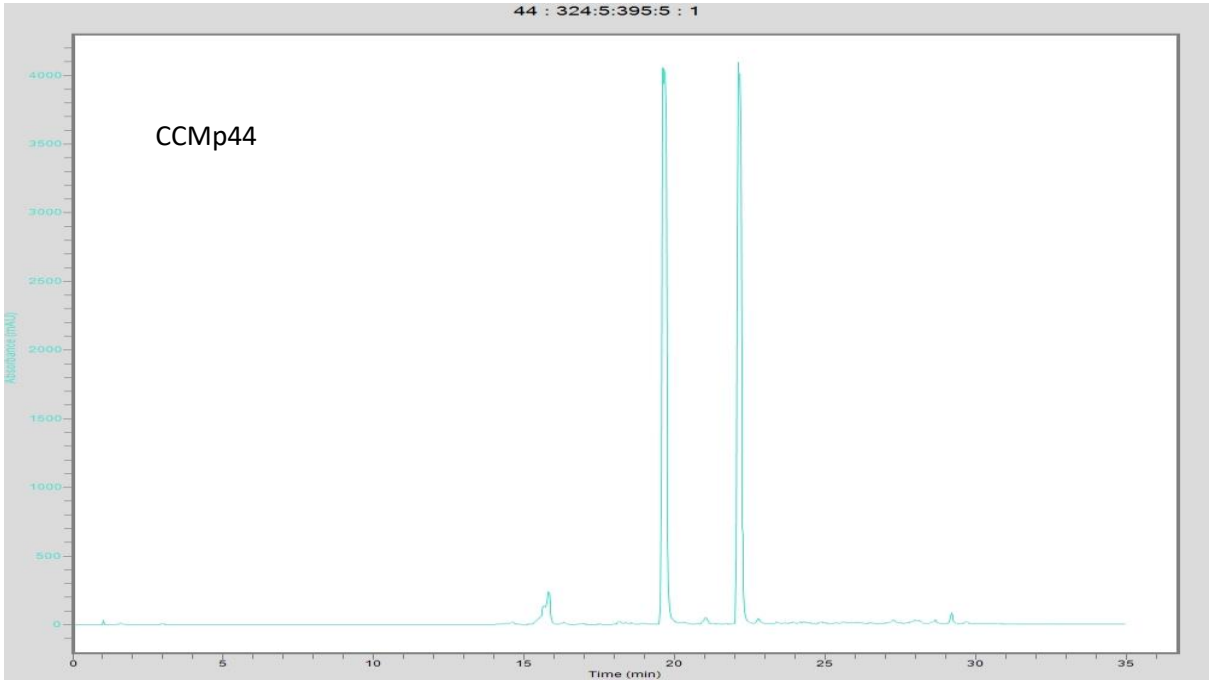


Figura 28. Cromatograma da fração CCMp51. Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, com monitoramento em 324 nm; volume de injeção de 20µL.

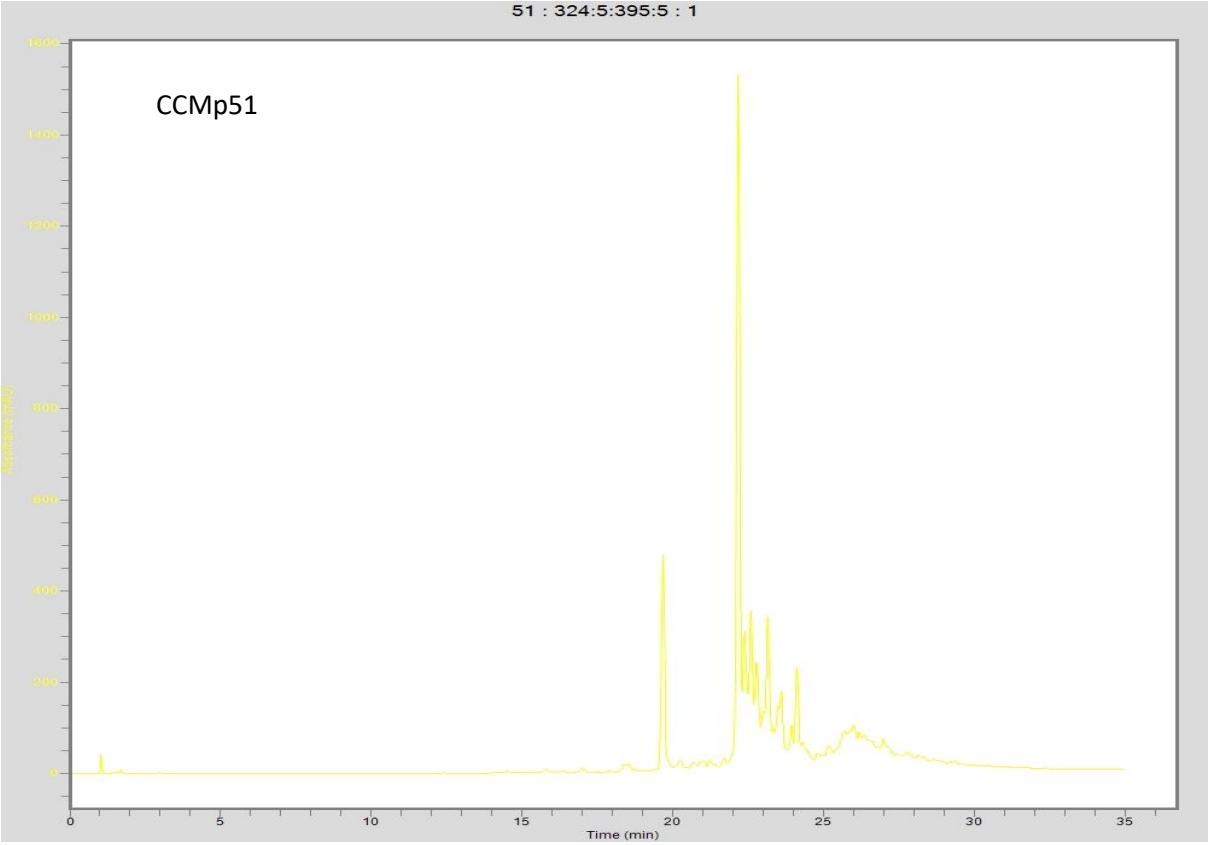
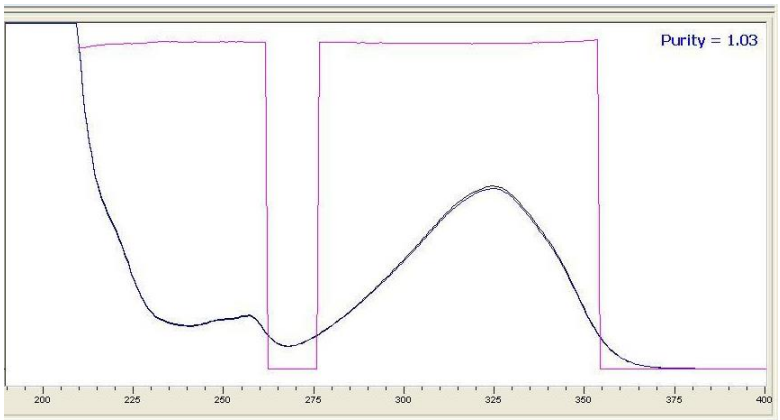


Figura 29. Espectro de absorção no UV para o pico majoritário 2 (t_R= 22,12 min) da fração CCMp44.



5.2.5 Purificação de metabólitos majoritários por CLAE-UV semipreparativa

Após vários procedimentos de fracionamento por CC, as subfrações com perfil de CCD semelhante ao CCMp44 (CCMp43-49) foram reunidas (332,9 mg) e a partir delas foi feita a purificação de dois dos metabólitos majoritários, os quais foram denominados como SPMp1 e SPMp2. A figura 30 mostra o cromatograma preparativo e a figura 31 representa os cromatogramas dos metabólitos majoritários uma vez purificados, evidenciando um resultado satisfatório no processo de purificação, desde que não apresentam substâncias interferentes em nenhum dos casos.

Figura 30. Cromatograma preparativo do procedimento de purificação de substâncias majoritárias. Análises em CLAE-UV coluna de fase reversa Agilent® Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm x 7 µm, Zorbax), modo isocrático com MeOH 45% por 45 min, vazão 8 mL/min, volume de injeção 0,7 mL; monitoramento em 324 nm.

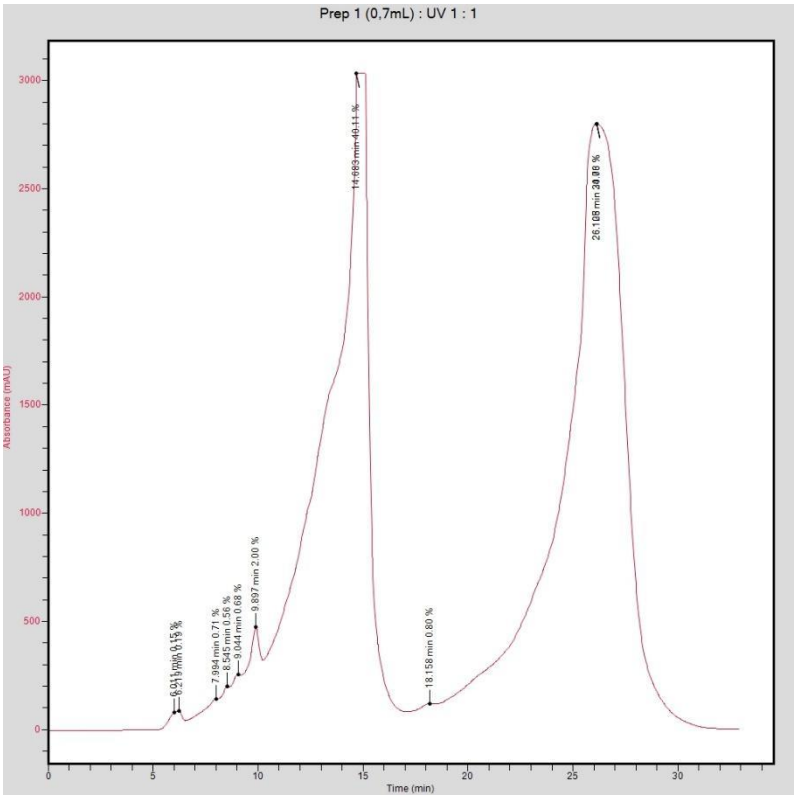
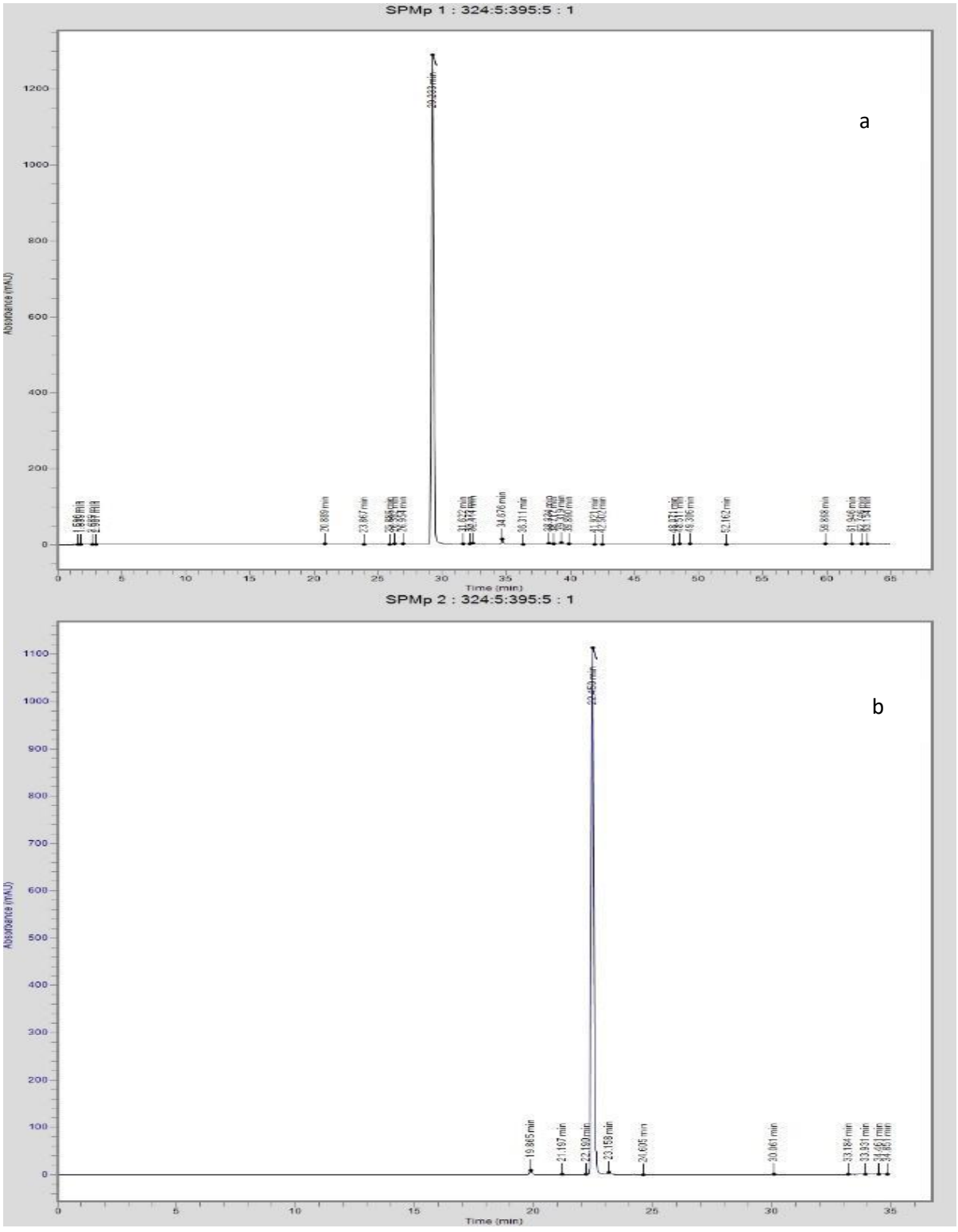


Figura 31. Cromatogramas das substâncias purificadas SPMp1 (a) e SPMp2 (b). Análises em CLAE-DAD em coluna Agilent® (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeOH 5% para 100% (v/v) em 60 min, mantendo isocraticamente MeOH 100% por 5 min; vazão de 1 mL/min; detecção em *λ* 190-400 nm, com monitoramento em 324 nm; volume de injeção de 20µL.



Após os procedimentos de purificação foram obtidos 62,4 mg de SPMp1 e 71,4 mg de SPMp2, para um 18,74 e um 21,44% de rendimento. A porcentagem de pureza das substáncias no UV (324nm), determinada através da normalização das áreas dos picos nos cromatogramas foi de 97,4 e 98,7% respectivamente, valores elevados de pureza que se correspondem com o índice de pureza determinado pelo software para amabos os picos na análise da subfração CCMp44.

5.2.6 Determinação estrutural das substâncias isoladas

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi feita a partir dos resultados das análises espectrométricas e da consulta aos dados da literatura. Os espectros de RMN são apresentados nos Apêndices 1 a 4.

O espectro de massas (ESI^+, MS^1) relativo à substância purificada SPMp1 apresentou um pico relativo ao íon aduto $[M+Na]^+$ com valor de *m/z* de 299,29 concordante com a fórmula empírica $C_{15}H_{16}O_5$. A substância SPMp2 apresentou dois picos relativos aos íons adutos $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ com valores de *m/z* de 300,80 e 317,25 concordantes com a fórmula empírica $C_{15}H_{18}O_5$ (Figura 32). Os espectros de RMN de ^{13}C para as duas substâncias apresentaram 15 sinais (Tabela 6), sendo 10 sinais similares àqueles já relatados na literatura por Mesquita et al. (2008) e Ito & Furukawa (1987) para o núcleo 7-metoxicumarinico (figura 33). Quanto ao espectro de RMN de ^1H os sinais em δ 6,18 (*d; J* = 9,7 Hz), 7,81 (*d; J* = 9,7 Hz), 7,48 (*d; J* = 8,7 Hz) e 6,98 (*d; J* = 8,7 Hz) observados para SPMp1, são típicos dos hidrogénios aromáticos presentes nas posições 3 – 6**.** Ainda, o sinal em δ 3,93 (*s*) foi atribuído aos hidrogênios pertencentes ao $-OCH_3$ na posição 7*.* A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^1H para o núcleo cumarínico metoxilado foi realizada de forma semelhante para SPMp2. Estes resultados foram coerentes com os já descritos na literatura (Tabela 6). A análise dos espectros então permitiu estabelecer a presença desse núcleo para as duas substâncias purificadas, com diferenças estruturais apenas na cadeia lateral na posição 8. As bandas de absorção no UV com $\lambda_{máx}$=324 nm (SPMp1) e $\lambda_{máx}$= 325 nm (SPMp2) também são coerentes com a proposta de estrutura das duas cumarinas.

As bandas largas de absorção no IV (Figura 35) observadas em 3.400 cm^{-1} (SPMp1) e 3410 cm^{-1} (SPMp2) confirmam a presença de grupos hidroxila na cadeia lateral da posição 8 do anel aromático (C-1´ a C-5´). As bandas no entorno de 3.000 cm^{-1} representam a deformação axial de C-H aromático e alifático. A coerência dos

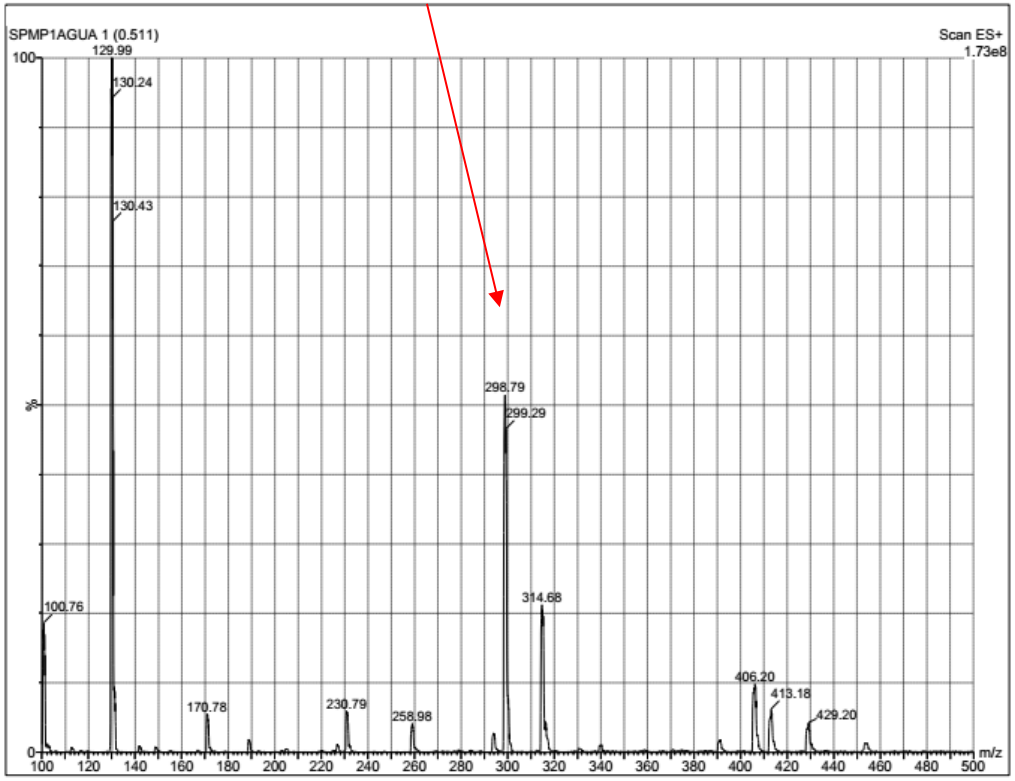
dados de RMN de ^{13}C e ^{1}H das duas substâncias purificadas SPMp1 e SPMp2 com dados obtidos por outros pesquisadores, também foi observada na análise focada especialmente na cadeia lateral. Os sinais no espectro de RMN de ^{1}H em 5,29 (*d; J* = 8,9 Hz), 4,79 (*d; J* = 8,9 Hz), 4,60 (*s*), 4,57 (*s*) e 1,65 (*s*) para SPMp1 são similares aos obtidos por Saeed et al. (2011). No caso dos dados de RMN de ^{1}H obtidos para SPMp2, os sinais 2,99 (*dd; J* = 13,5; 9,9Hz), 3,04 (*dd; J* = 13,5; 3,2Hz) e 3,65 (*dd; J* = 9,8; 3,1Hz) foram similares aos obtidos por Imai et al. (1989). Os sinais 1,26 (*s*) e 1,28 (*s*) foram atribuídos aos grupo $-CH_3$ nas posições 4` e 5`.

A análise desses resultados permitiu identificar as duas substâncias purificadas, SPMp1 e SPMp2, como duas cumarinas, 8-[1',2'-dihidroxi-3'-metilbut-3'-enil]-7-metoxicromen-2-ona (murpanidina) e 8-[2',3'-dihidroxi-3'-metilbutil]-7-metoxicromen-2-ona (hidrato de meranzina), respectivamente (figura 34a e 34b).

Figura 32. Espectro de massas (ESI+, MS1) para substâncias purificadas: murpanidina (SPMp1) e hidrato de meranzina (SPMp2).

SPMp1 $[M+Na]^+$ - *m/z* de 299,29
Fórmula empírica $C_{15}H_{16}O_5$

SPMp2 $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ - *m/z* de 300,80 e 317,25
Fórmula empírica $C_{15}H_{18}O_5$



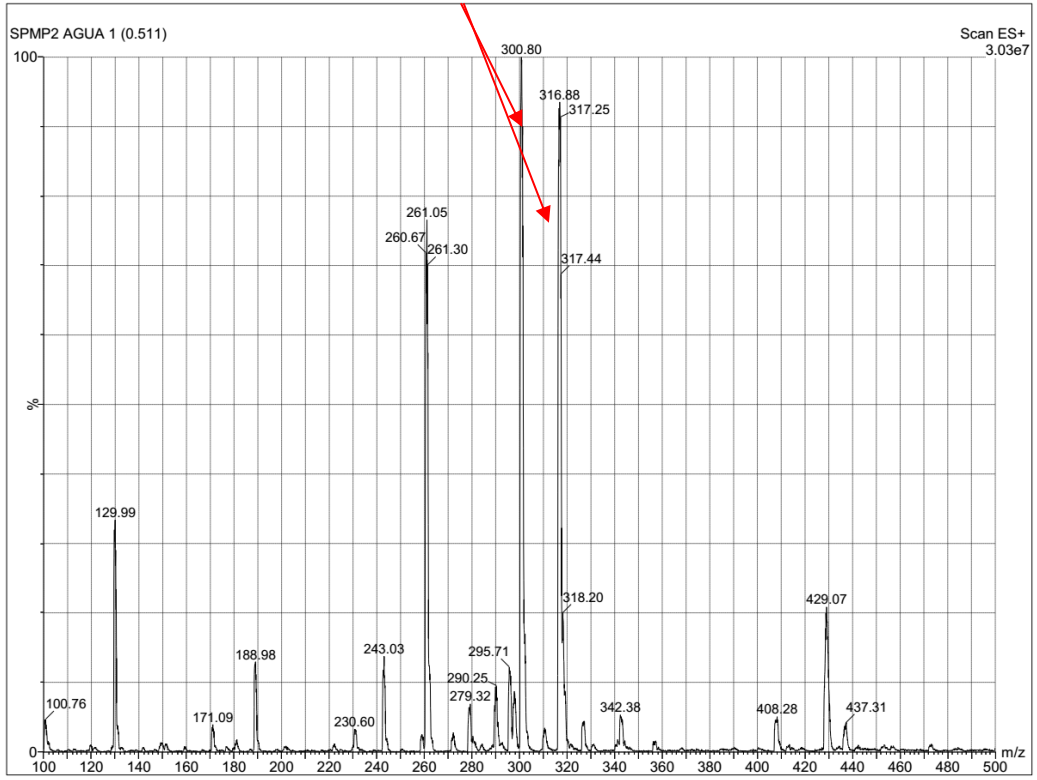


Figura 33. Estrutura da 7-metoxicumarina.

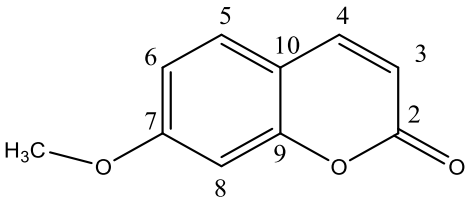


Tabela 6: Dados espectrométricos de RMN obtidos para as substâncias purificadas SPMp1 e SPMp2 a 600 MHz para ^{1}H e a 150 MHz para ^{13}C, em metanol-d4.

C	δ ^{13}C*	δ ^{13}C SPMp1	δ ^{13}C SPMp2	δ ^{1}H (J; Hz) *	δ ^{1}H SPMp1 (J; Hz)	δ ^{1}H (J; Hz) **	δ ^{1}H SPMp2 (J; Hz)
2	162,8	**162,7**	**163,7**	**-**	**-**	**-**	**-**
3	113,3	**113,2**	**112,9**	6,34 *d* (9,6)	**6,23 d (9,7)**	6,15 *d* (9,5)	**6,22 *d* (9,4)**
4	146,2	**146,2**	**146,4**	7,86 *d* (9,6)	**7,85 d (9,7)**	7,56 *d* (9,5)	**7,86 *d* (9,4)**
5	130,3	**130,3**	**128,4**	7,53 *d* (8,8)	**7,53 d (8,7)**	7,28 *d* (8,5)	**7,47 *d* (8,7)**
6	109,6	**109,5**	**109,0**	7,03 *d* (8,8)	**7,03 d (8,7)**	6,79 *d* (8,5)	**7,02 *d* (8,7)**
7	162,2	**162,2**	**163,5**	**-**	**-**	**-**	**-**
8	117,9	**117,8**	**117,1**	**-**	**-**	**-**	**-**
9	154,2	**154,2**	**154,7**	**-**	**-**	**-**	**-**
10	114,9	**114,4**	**114,3**	**-**	**-**	**-**	**-**
7-OMe	56,7	**56,7**	**56,6**	3,94 *s*	**3,93 s**	3,85 *s*	**3,93 *s***
1´	69,9	**69,8**	**25,6**	5,33 *d* (8,8)	**5,33 d (8,9)**	2,90 *dd* (14,0; 8,5) 3,00 *dd* (14,0; 4,2)	**2,99 *dd* (13,5; 9,9)** **3,04 *dd* (13,5; 3,2)**
2´	79,1	**79,1**	**78,7**	4,83 *d* (8,8)	**4,82 d (8,9)**	3,56 *dd* (8,5; 4,2)	**3,65 *dd* (9,9; 3,2)**
3´	146,3	**146,3**	**74,1**	-	**-**	-	**-**
4´	17,5	**17,5**	**26,2**	1,63 *s*	**1,62 s**	1,25 *s*	**1,28 s**
5´	113,7	**113,7**	**25,4**	4,63 *s* 4,53 *s*	**4,62 s** **4,52 s**		**1,26 *s***

*Saeed et al. (Journal of Asian Natural Products Research, 2011)

** Imai et al. (Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1989)

Figura 34. Estruturas propostas para as substâncias purificadas: a) murpanidina e b) hidrato de meranzina.

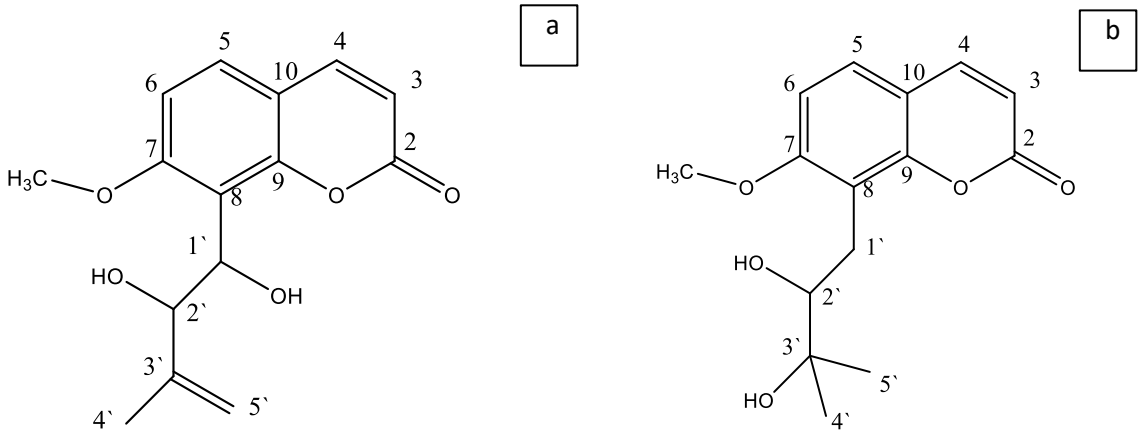
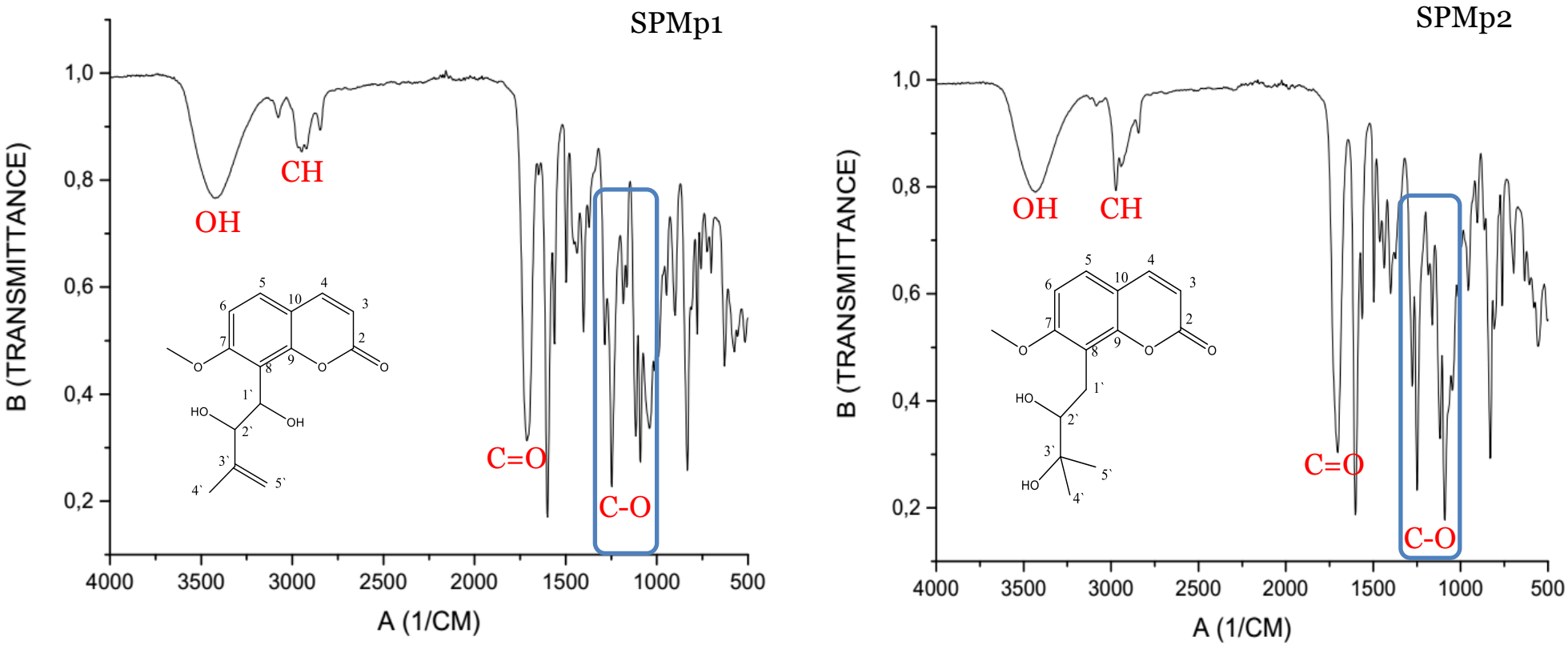


Figura 35. Espectro de absorção no IV para substâncias purificadas: murpanidina (SPMp1) e hidrato de meranzina (SPMp2).



5.2.7 Quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp

O hidrato de meranzina aparace como o metabólito majoritário do extrato, presente também nas frações EFSMp3 e EFSMp4. A quantificação desse metabólito no extrato contribuirá na padronização do mesmo e na correlação com a dosagem e os efeitos farmacológicos observados. A curva analítica do hidrato de meranzina (Figura 36) foi construída a partir de suas concentrações versus valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 7).

Figura 36. Curva analítica para solução padrão de hidrato de meranzina.

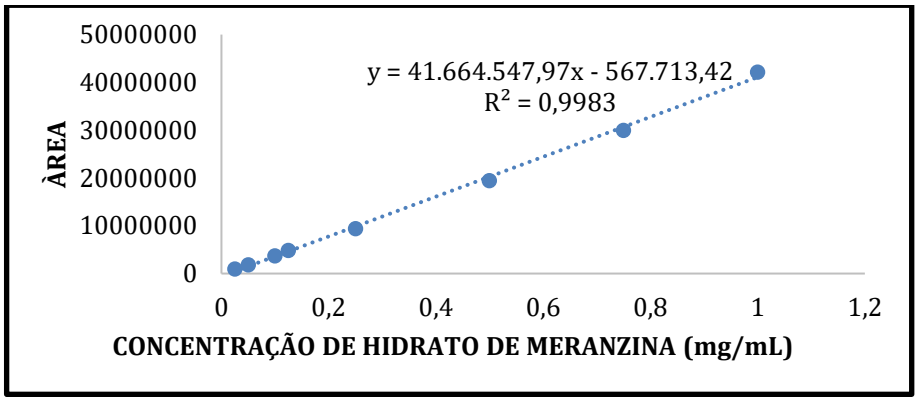


Tabela 7. Dados das análises em CLAE-DAD do hidrato de meranzina para a construção da curva analítica. (média de três análises)

Concentración (mg/ml)	t_R (min)	Área dos picos
0,025	17,34	908382,3
0,05	17,32	1807724,7
0,1	17,31	3696577,7
0,125	17,29	4835887,3
0,25	17,26	9356471,3
0,5	17,23	19445358,0
0,75	17,20	29953505,3
1	17,16	42115120,3

A média dos valores das áreas dos picos com t_R igual ao do hidrato de meranzina no cromatograma do extrato EEMp aplicada na equação do gráfico (figura 36), forneceu um valor de 8,4% (p/p) de hidrato de meranzina no extrato analisado (tabela 8).

Tabela 8: Dados obtidos na quantificação do hidrato de meranzina no extrato EEMp. (média de três análises)

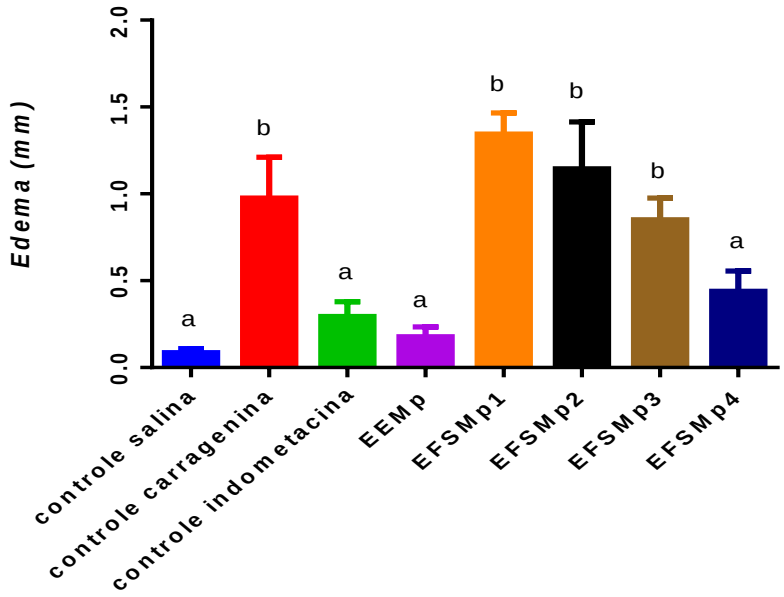
Amostra	Massa inicial (mg)	t_R (min) hidrato de meranzina	Área dos picos	% hidrato de meranzina (p/p)
EEMp	5,6	17,13	11438932,7	8,4

5.3 ENSAIO BIOLÓGICOS

5.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de edema de pata em rato

O ensaio de edema de pata em ratos é amplamente utilizado na avaliação do efeito anti-inflamatório de novos fármacos e na validação do efeito tradicional relatado para espécies vegetais. A figura 37 mostra os resultados do ensaio de edema de pata em ratos, para o EEMp e as frações EFSMp.

Figura 37. Efeito da administração oral do EEMp (300mg/Kg) e das frações EFSMp1 (20mg/Kg), EFSMp2 (30mg/Kg), EFSMp3 (25mg/Kg) e EFSMp4 (150mg/Kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina (200 µg/pata) em ratos. O edema foi expresso como a diferença em milímetros entre a espessura final (4h) e a espessura inicial, cada barra representa a média ± desvio padrão (n= 6).



Letras diferentes indicam diferenças significativas para p<0,05 em relação ao controle (indometacina)

O melhor efeito anti-inflamatório foi observado no EEMp, seguido da fração EFSMp4, sem diferenças significativas com o grupo controle (indometacina), resultado que faz todo sentido, considerando que é essa a fração com a maior complexidade química e onde estão presentes os metabolitos majoritários do extrato. De qualquer forma não pode ser confirmado que as outras frações não possuam um efeito, pois o fato de ter definido a doses em função dos rendimentos das frações e consequentemente ter usado doses muito menores para EFSMp1-3,

pode estar influenciando o resultado observado. É importante ressaltar que a seleção das doses em função dos rendimentos de cada fração responde à necessidade de avaliar nossas frações na proporção aproximada na que elas estão no extrato final a fim de trazer informação relevante à ação anti-inflamatória *in vivo*, capaz de contribuir na validação e uso racional dos produtos derivados de *M. paniculata* que já estão incluídos na Lista Básica de Medicamentos de Cuba (MINSAP, 2016). Esses resultados também confirmam resultados anteriores, sendo que o efeito anti-inflamatório da tintura (80%) de *M. paniculata* coletada em Cuba já tinha sido avaliado pelo modelo de edema de orelha em camundongos, induzido por óleo de cróton, mostrando um 36% de inibição da inflamação em experimento onde a indometacina conseguiu inibir a inflamação em um 44% (SÁNCHEZ, 2015). No nosso caso foram alcançados valores de inibição da inflamação de 81 e 54% para EEMp e EFSMp4, respectivamente.

5.3.1.1 Teste de gastrotoxicidade

A análise dos estômagos dos animais submetidos aos ensaios de edema de pata permitiu corroborar os efeitos deletérios da indometacina na mucosa gástrica, e mesmo que o efeito negativo do EEMp e das frações EFSMp na mucosa tinha sido menor, a espécie não pode ser relacionada com o efeito de gastroproteção relatado para outras espécies vegetais com atividade anti-inflamatória como *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) e *Baccharis trimera* (Less.) DC. (GENÉ et al., 1996; DIAS et al., 2009; FERREIRA et al., 2011)

As figuras 38 e 39 mostram imagens dos estômagos de vários dos animais submetidos ao ensaio e a tabela 9 refere os graus das lesões encontradas na avaliação microscópica dos estômagos dos animais de cada grupo. Para realizar esta análise as lesões foram contadas e medidas através do programa Motic Images Plus® 2.0, obtendo-se o número de ulcerações com diferentes graus de lesão, seguindo o índice de ulcerogênese gástrica (I.U.G.), que obedece a critérios numéricos para a classificação das lesões da mucosa gástrica (4.4.1.1). A análise estatística dos resultados não mostrou diferenças significativas entre o grupo controle negativo e os grupos tratados com EEMp e frações EFSMp, sendo EFSMp4 a fração com maior ação anti-inflamatória e a que gerou o menor número de ulcerações, mesmo tendo sido adminstrada em dose maior (150 mg/kg) que as demais frações (20-30 mg/kg). Quanto ao grupo tratado com indometacina,

apresentou diferenças significativas com relação aos outros grupos, com exceção do grupo tratado com EEMp (100mg/Kg). É importante destacar que mesmo quando nossas amostras não apresentaram um efeito gastroprotetor foi observada uma relação dose-resposta indicando que um aumento da dose do extrato diminui a ulceração. Considerando que os efeitos gastrotóxicos são um dos maiores efeitos colaterais que acometem usuários de anti-inflamatórios, nossos resultados sugerem que o uso do extrato na dosagem de 300 mg/Kg não gera um efeito gastrotóxico.

Figura 38. Mucosa gástrica de animais submetidos aos ensaios de edema de pata. Grupo 1- Controle carragenina; Grupo 2- Controle indometacina; Grupo 3- EEMp (100mg/Kg); Grupo 4- EEMp (150mg/Kg) e Grupo 5- EEMp (300 mg/Kg).

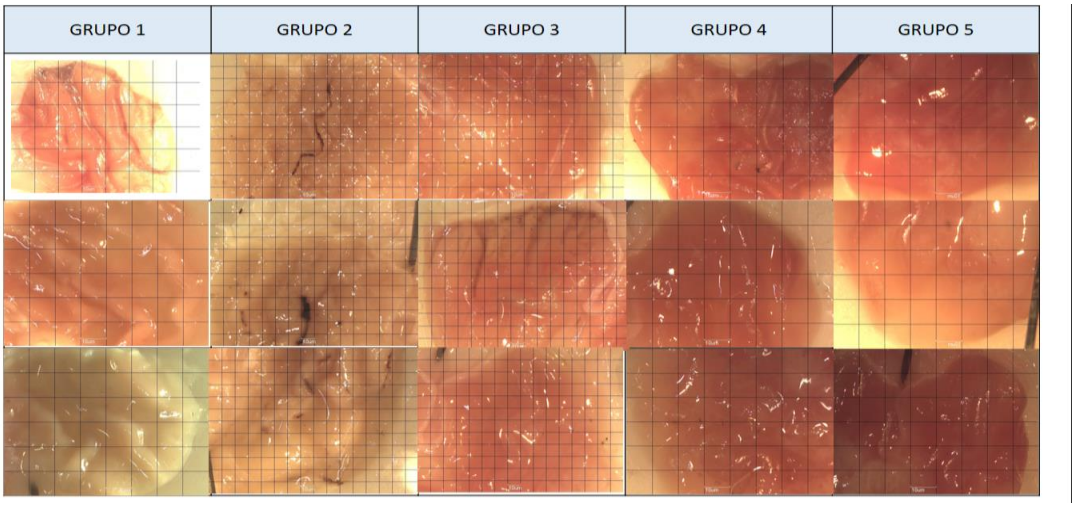


Figura 39. Mucosa gástrica de animais submetidos aos ensaios de edema de pata. Grupo 1- Controle carragenina; Grupo 2- Controle indometacina; Grupo 3- EFSMp1 (20mg/Kg); Grupo 4- EFSMp2 (30 mg/Kg); Grupo 5- EFSMp3 (25 mg/Kg) e Grupo 6- EFSMp4 (150 mg/Kg).

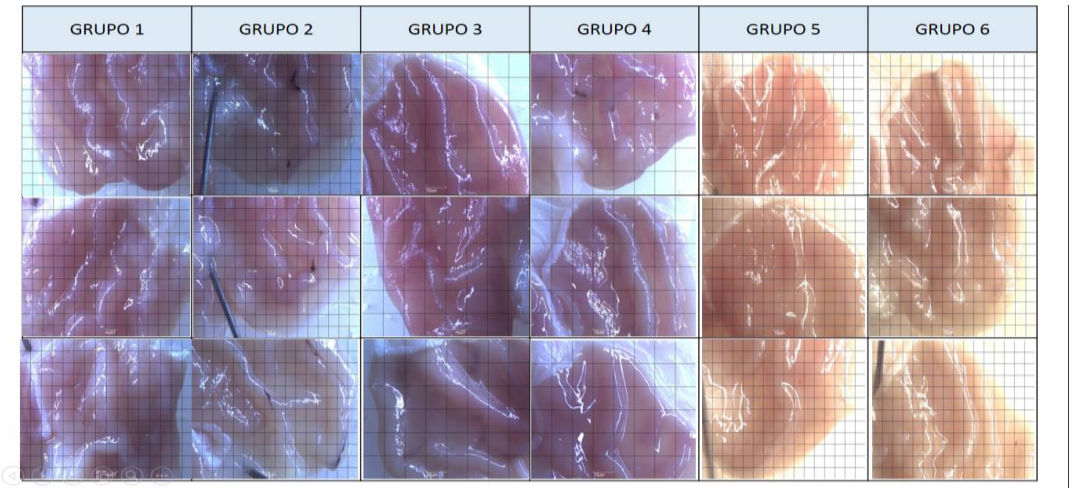


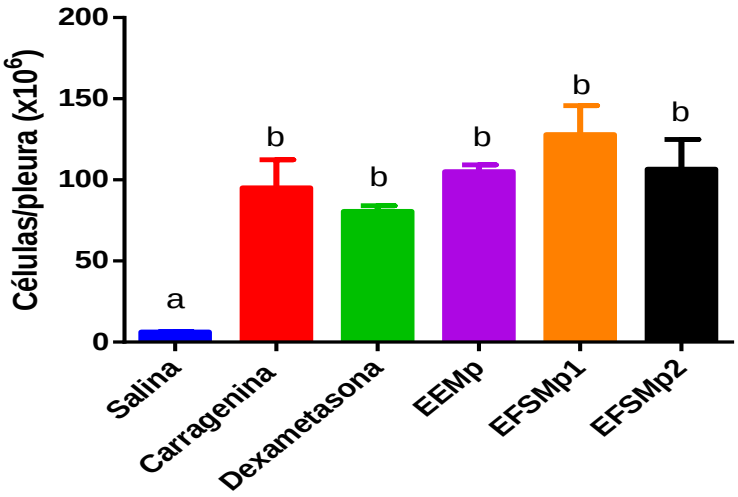
Tabela 9. Efeito ulcerogênico do EEMp e das frações EFSMp. Os resultados representam o número médio de ulceras identificadas em cada grupo ± desvio padrão e o grau em que foram classificadas.

Grupos	Número de úlceras		
	Total	**Grau 1**	**Grau 2**
Controle negativo/n=12	0,58 ± 1,165	0,58	-
indometacina (10mg/Kg) /n=12	7,08 ± 4,252	6,75	0,33
EEMp (100mg/Kg) /n=6	3,66 ± 4,033	3,66	-
EEMp (150mg/Kg) /n=6	1,83 ± 1,722	1,83	-
EEMp (300mg/Kg) /n=6	1,16 ±0,983	1,16	-
EFSMp1 (20mg/Kg) /n=6	3,50 ±1,871	2,83	0,66
EFSMp2 (30mg/Kg) /n=6	2,50 ±1,049	2,50	-
EFSMp3 (25mg/Kg) /n=6	1,33 ±2,338	1,33	-
EFSMp4 (150mg/Kg) /n=6	0,83 ±0,983	0,83	-

5.3.2. Avaliação in vivo da atividade anti-inflamatória do EEMp e frações EFSMp através do modelo de pleurisia

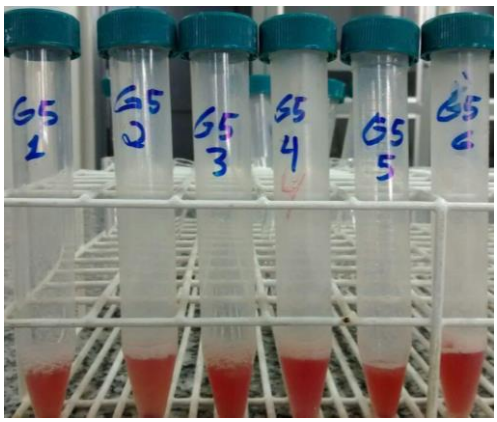
Os resultados deste experimento não foram satisfatórios, pois dentre as amostras testadas EEMp, EFSMp1 e EFSMp2 geraram um aumento no número de células no local da inflamação quando comparado com a carragenina e com o controle utilizado (dexametasona) (figura 40). A dexametasona também não produziu redução significativa na migração celular, uma das primeiras etapas do processo inflamatório, o que significa que não gerou o efeito esperado. Nos casos de EFSMp3 e EFSMp4 os lavados pleurais coletados estavam contaminados com sangue (Figura 41), motivo pelo qual, seguindo o protocolo aprovado, foram desprezados. Como todos os lavados pleurais de animais pertencentes a esses grupos mostraram contaminação com sangue, sugere-se um possível efeito hemorrágico dessas frações o que estaria justificado considerando que os metabólitos majoritários identificados (cumarinas), estão concentrados fundamentalmente nessas frações.

Figura 40. Efeito da administração intrapleural de EEMp (300mg/Kg), EFSMp1 (20mg/Kg) e EFSMp2 (30mg/Kg) sobre a pleurisia induzida por carragenina em ratos. Os resultados representam o número de células presente no liquido pleural expresso como média ± desvio padrão ($x10^6$) (n= 6).



Letras diferentes indicam diferenças significativas para p<0,05 em relação ao controle (salina)

Figura 41. Tubos contendo lavados pleurais coletados de animais pertences ao grupo tratado com EFSMp4 (150mg/Kg).



Mesmo quando todos os resultados dos experimentos *in vivo* não foram conclusivos ou coerentes é importante destacar que devem ser considerados tanto os efeitos anti-inflamatórios observados, quanto o efeito ulcerogênico, junto às evidencias de um possível efeito hemorrágico, para decidir a melhor estratégia para o uso de *M. paniculata* como anti-inflamatório. O uso do extrato poderia ser mais seguro e recomendável do que o uso de frações, que pela maior concentração de metabolitos ativos (cumarinas) poderiam causar efeitos indesejáveis. Além disso, seu uso tópico como anti-inflamatório evitaria tais efeitos adversos.

5.3.3 Avaliação "in vitro" da atividade antioxidante

Ensaios preliminares da atividade antioxidante da tintura (extrato hidroetanólico 80%) de *M. paniculata* colhida em Cuba já tinham sido feitos pelos métodos de DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e FRAP (poder de redução do ferro) com resultados satisfatórios (CASADO, 2014), sendo interessante aprofundar os estudos dessa atividade, devido a sua relação com a atividade anti-inflamatória. No caso do Potencial de Redução Total foi observado um valor de 437,22 ± 70,1mM para a tintura de *M. paniculata* numa concentração de 6,2 mg/mL. São vários os ensaios de atividade antioxidante que podem contribuir ao esclarecimento do efeito anti-inflamatório.

5.3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do $ABTS^{+\bullet}$

No ensaio pelo método do cátion radicalar $ABTS^{+\bullet}$ é observada a descoloração do meio reacional no qual, após a adição de um antioxidante, ocorre a redução da absorbância em 734 nm, sendo proporcional à concentração e à atividade antioxidante. A porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ foi calculada pela seguinte equação:

Equação (3)

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{max} - A_{amostra}}{A_{max}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

% Inibição = porcentagem de captura (inibição) da espécie reativa;

A_{max} = absorbância da espécie reativa na ausência da amostra;

$A_{amostra}$ = absorbância da espécie reativa na presença da amostra.

Os resultados obtidos foram expressos em concentrações das amostras ou padrões capazes de inibir em 50 % o radical $ABTS^{+\bullet}$ (CE_{50}). As análises foram feitas em triplicata e os resultados são as médias das inibições. Os valores foram obtidos através das equações da reta dos gráficos de porcentagem de inibição *versus* a concentração das amostras (Figuras 42 a 45) ou padrões. A fração EFSMp1 não apresentou inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ em nenhuma concentração até o seu limite de solubilidade.

Figura 42. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EEMp (µg/mL) e valor de CE_{50}. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $ABTS^{+}$ na presença de diferentes concentrações da amostra.

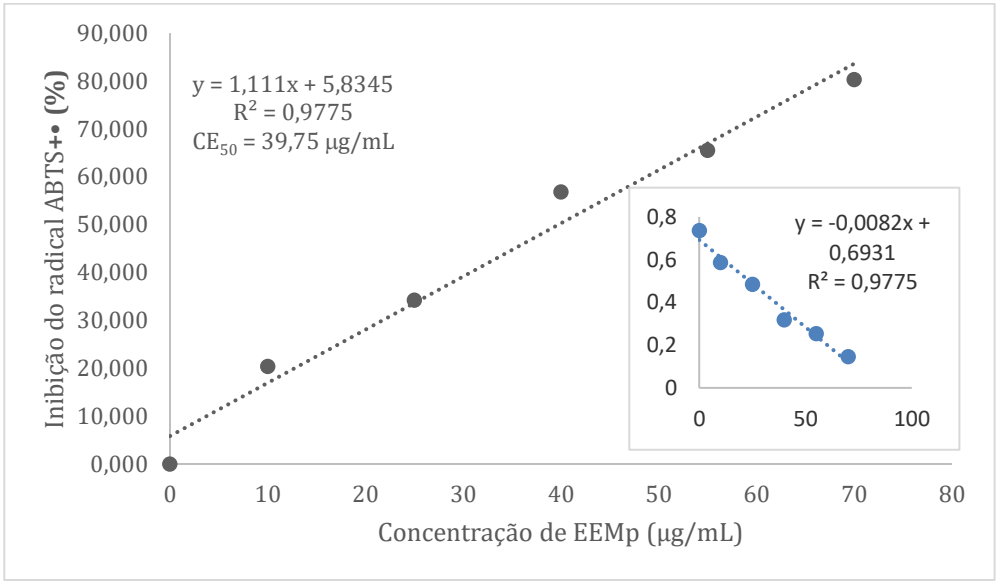


Figura 43. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EFSMp2 (µg/mL) e valor de CE_{50}. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $ABTS^{+}$ na presença de diferentes concentrações da amostra.

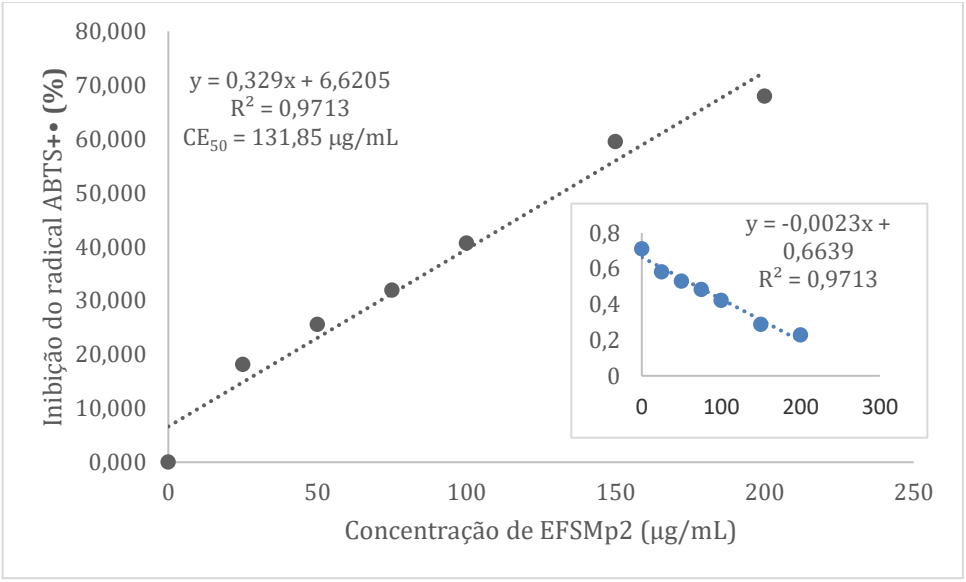


Figura 44. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EFSMp3 (µg/mL) e valor de CE_{50}. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $ABTS^{+}$ na presença de diferentes concentrações da amostra.

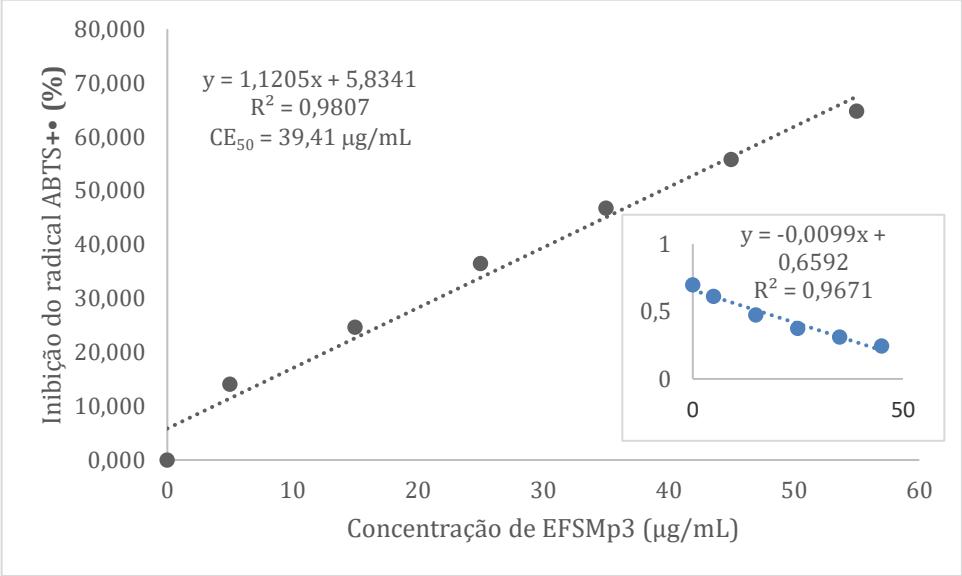
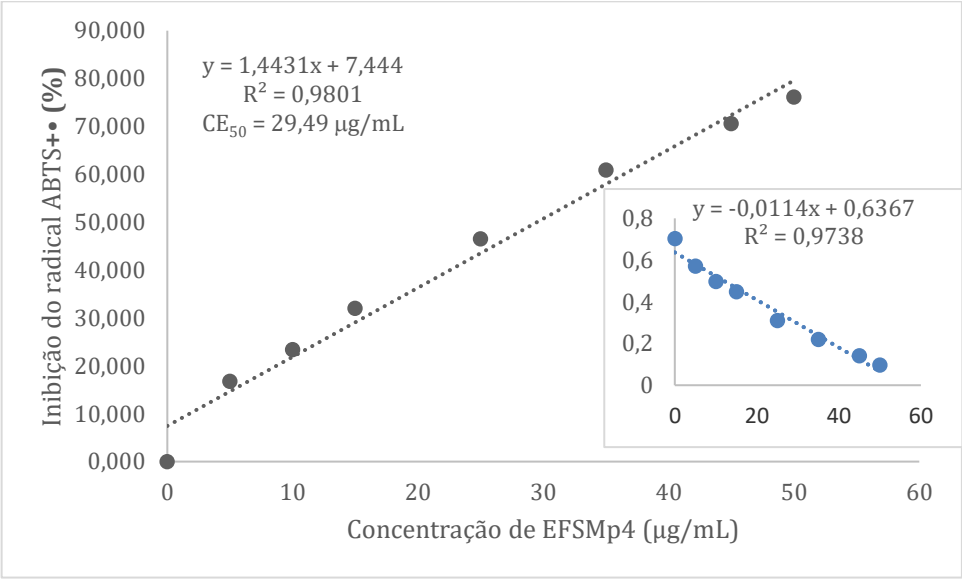


Figura 45. Gráfico da porcentagem de inibição do radical $ABTS^{+\bullet}$ *versus* a concentração de EFSMp4 (µg/mL) e valor de CE_{50}. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $ABTS^{+}$ na presença de diferentes concentrações da amostra.



O menor valor de CE_{50} foi observado para a fração EFSMp4 (29,49 g/mL), seguido por EFSMp3 (39,41 g/mL) e EEMp (39,75 g/mL), porém os valores obtidos para essas amostras foram no mínimo 10 vezes maiores do que os resultados obtidos para os padrões avaliados: CE_{50} (trolox) = 3,01 g/mL; CE_{50} (ácido gálico) = 0,63 g/mL; CE_{50} (quercetina) = 0,68 g/mL e CE_{50} (iohimbina) = 2,89 g/mL.

Outros autores também avaliaram a atividade antioxidante frente ao radical $ABTS^{+\bullet}$ de alguns extratos vegetais. Por exemplo, Chiari (2011) avaliou a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico 70 % de *Psidium guajava* L. e a CI_{50} encontrada foi de 114,4 µg/mL, aproximadamente 3-4 vezes maior do que os valores encontrados para EFSMp4, EFSMp3 e EEMp. Nossos resultados são similares aos alcançados por Lordêllo (2015) que também avaliou a atividade antioxidante frente ao radical $ABTS^{+\bullet}$ de extratos hidroetanólicos 70 % de folhas de *Mentha piperita* (CI_{50} = 30,0 µg/mL), *Mentha rotundifolia* e *Mentha villosa*, que apresentaram os mesmos valores de CI_{50} (40,0 µg/mL).

Para realizar uma análise mais aprofundada da influência e/ou relação de um possível efeito antioxidante sobre a atividade anti-inflamatória de *M. paniculata* devem ser realizados ainda outros testes que avaliem outras ERO relacionadas direta ou indiretamente com a resposta a inflamação.

5.3.3.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ânion radicalar superóxido ($O_2^{-\bullet}$)

O $O2^-$ é uma ERO produzida constantemente no organismo humano em processos fisiológicos. Sua produção também é iniciada com a ativação de fagócitos, como neutrófilos, monócitos e eosinófilos, o que leva à produção de outras ERO, ultrapassando a capacidade antioxidante local, favorecendo o surto oxidativo. Quando há presença de inflamação, os neutrófilos respondem de maneira efetiva a estímulos quimiotáticos, estando presente com uma grande população na resposta inflamatória (Assis, 2012).

Neste ensaio, o ânion superóxido gerado pela reação entre PMS e NADH, reage com NBT para formar uma formazana. O monitoramento é feito por fotometria (560 nm) com a mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana.

Foram testadas concentrações crescentes dos mesmos padrões e amostras submetidos ao ensaio anterior. Porém somente conseguiu-se observar resposta para dois dos padrões avaliados (CE_{50} (quercetina) = 86,65 g/mL e CE_{50} (trolox) = 1,35 g/mL), iohimbina e ácido gálico não mostraram resposta nos seus limites de solubilidade. As amostras em avaliação geraram turbidez no médio sem importar o solvente utilizado (àgua, DMSO, tampão, etanol ou metanol) o que impediu a avaliação das mesmas mediante esse ensaio.

5.3.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de captura do ácido hipocloroso ou da taurina cloramina

A ativação dos neutrófilos em processos inflamatórios também leva à liberação do ácido hipocloroso no organismo. Nesse ensaio a atividade antioxidante da amostra depende de sua capacidade em capturar o HOCl/OCl ou a taurina cloramina, prevenindo a oxidação do 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina [TMB]. A oxidação do TMB pelo HOCl/OCl^- ou pela taurina cloramina gera um cromóforo azul que é monitorado por fotometria (652 nm). Nesse ensaio já foram avaliados os padrões e a análise das amostras está em andamento.

5.3.4 Ensaios de mutagenicidade (Teste de Ames)

As Tabelas 10 e 11 mostram a média do número de revertentes/ placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com o extrato e fração de *M. paniculata*, observados em linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, respectivamente.

A tabela 10 também mostra que as linhagens de *S. typhimurium* foram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do extrato após metabolização, sendo necessário diminuir as concentrações.

Os resultados obtidos mostraram que o extrato *M. paniculata* (EEMp), bem como sua fração (EFSMp4), atuaram induzindo potencial mutagênico de uma maneira direta e indireta, ou seja, nos experimentos sem e com ativação metabólica. Na ausência de metabolização, EEMp foi mutagênico, com um índice de mutagenicidade superior a 2,0 nas linhagens TA98 e TA97a. Essas linhagens detectam mutações do tipo *frameshift*. Já para EFSMp4, nos experimentos sem a mistura S9, a mutagenicidade foi observada além das linhagens TA98 e TA97a, também na linhagem TA100 que detecta mutações por substituição de pares de bases.

Nos ensaios com ativação metabólica, tanto EEMp quanto EFSMp4 induziram um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo nas três linhagens mencionadas, indicando mutagenicidade indireta.

Na linhagem TA102, nenhum efeito mutagênico foi verificado, pois não houve um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes em nenhuma das concentrações avaliadas nos experimentos com e sem S9.

Extratos vegetais apresentam uma diversidade química relevante e podem apresentar atividades mutagênicas. Do ponto de vista toxicológico, os efeitos podem não ser imediatamente correlacionados com a ingestão do produto, mas observado em longo prazo de forma assintomática, se concretizando em efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos, hepatotóxicos ou até mesmo, carcinogênicos (LAPA et al., 2004). O fato de nossas amostras terem induzido o potencial mutagênico acrescenta ainda mais nossa preocupação no uso racional desta e outras plantas medicinais em Cuba, sem toda a informação necessária quanto à qualidade, segurança e eficácia. Mesmo quando o fitoterápico disponível é de uso tópico é importante fazer um uso racional que garanta a segurança e diminua a possibilidade desses efeitos acontecerem.

Tabela 10. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações do extrato de *M. paniculata*, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM									
Extrato de *Murraya paniculata*									
-S9					**+S9**				
Tratamentos mg/placa	**TA98**	**TA100**	**TA97a**	**TA102**	**Tratamentos mg/placa**	**TA98**	**TA100**	**TA97a**	**TA102**
DMSO	18 ± 5	139 ± 11	111 ± 12	254 ± 37	**DMSO**	25 ± 6	126 ± 14	154 ± 8	265 ± 36
2,5	50 ± 4** (2,73)	247 ± 28* (1,78)	228 ± 6** (2,05)	164 ± 21 (0,65)	**1,25**	235 ± 33** (9,40)	545 ± 28** (4,33)	331 ± 15** (2,15)	265 ± 26 (0,95)
5	51 ± 9** (2,78)	230 ± 14* (1,66)	243 ± 15** (2,19)	153 ± 16 (0,60)	**2,5**	248 ± 12** (9,92)	499 ± 18** (3,96)	436 ± 29** (2,83)	297 ± 30 (1,07)
10	45 ± 6** (2,45)	226 ± 20* (1,63)	162 ± 13* (1,45)	128 ± 14 (0,50)	**5,0**	248 ± 38** (9,92)	408 ± 32** (3,24)	154 ± 17 (1,00)	201 ± 30 (0,72)
15	38 ± 3** (2,07)	233 ± 17* (1,67)	153 ± 10 (1,38)	149 ± 17 (0,59)	**7,5**	215 ± 9** (8,60)	301 ± 24** (2,39)	120 ± 11 (0,78)	214 ± 11 (0,77)
20	45 ± 7** (2,45)	209 ± 11* (1,50)	117 ± 9 (1,05)	145 ± 15 (0,57)	**10**	184 ± 26** (7,36)	279 ± 39** (2,21)	109 ± 13 (0,71)	211 ± 13 (0,76)
C+	933 ± 33[b]	2121 ± 193[c]	1257 ± 98[b]	1705 ± 88[d]	**C+**	1115 ± 56[e]	1256 ± 93[e]	1672 ± 103[e]	1168 ± 118[f]

*P <0.05 (ANOVA); **P < 0.01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; [a]Controle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): [b]4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98, TA97a); [c]Azida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); [d]Mitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e [e]2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA97a e TA100); [f]2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

Tabela 11. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações da fração EFSMp4, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM								
Fração de *Murraya paniculata*								
TA98		**TA100**		**TA102**		**TA97a**	
Tratamentos mg/placa	**- S9**	**+ S9**	**- S9**	**+ S9**	**- S9**	**+ S9**	**- S9**	**+ S9**
DMSO[a]	15 ± 2	21 ± 4	86 ± 12	105 ± 11	330 ± 26	248 ± 32	99 ± 6	143 ± 18
0,25	41 ± 11** (2,67)	34 ± 7* (1,59)	**229 ± 11** (2,66)**	135 ± 12 (1,29)	317 ± 31 (0,96)	269 ± 30 (1,09)	206 ± 14** (2,09)	291 ± 25** (2,04)
0,5	74 ± 5** (4,83)	37 ± 8* (1,73)	247 ± 13** (2,87)	146 ± 15 (1,39)	279 ± 25 (0,84)	265 ± 24 (1,07)	222 ± 11** (2,25)	385 ± 10** (2,70)
1,0	107 ± 13** (6,95)	67 ± 12** (3,14)	211 ± 19** (2,45)	223 ± 11** (2,13)	294 ± 14 (0,89)	274 ± 35 (1,10)	145 ± 8 (1,47)	386 ± 32** (2,71)
1,5	102 ± 8** (6,62)	69 ± 5** (3,21)	194 ± 27** (2,26)	241 ± 15** (2,30)	283 ± 23 (0,86)	264 ± 25 (1,06)	142 ± 15 (1,44)	474 ± 35** (3,32)
2,0	45 ± 2** (2,90)	74 ± 10** (3,47)	170 ± 12* (1,98)	250 ± 13** (2,38)	251 ± 15 (0,76)	240 ± 20 (0,97)	122 ± 5 (1,24)	393 ± 25** (2,75)
C +	727 ± 56[b]	1504 ± 125[e]	1239 ± 102[c]	1872 ± 152[e]	1882 ± 103[d]	1720 ± 125[f]	1028 ± 62[b]	1152 ± 83[e]

*P <0.05 (ANOVA); **P < 0.01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; [a]Controle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): [b]4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98, TA97a); [c]Azida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); [d]Mitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e [e]2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA97a e TA100); [f]2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

5.3.5 Ensaios com macrófagos "in vitro"

Para identificar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório é preciso conhecer o que acontece em nível celular com os mediadores envolvidos na resposta inflamatória. Um dos ensaios propostos está relacionado com a inibição de NO em macrófagos o qual também demandou a realização de ensaios de citotoxicidade.

Considerando a fração EFSMp4 como a de melhores resultados nas análises realizadas até o momento (efeito anti-inflamátorio, efeito ulcerogênico, efeito na inihibição do radical $ABTS^{+\bullet}$) e sendo também a fração da qual foram isolados os metabólitos majoritários do extrato: SPMp1 (murpanidina) e SPMp2 (hidrato de meranzina), é que foi decidido trabalhar com as mesmas (EFSMp4, SPMp1 e SPMp2) nos ensaios "*in vitro*" com macrófagos.

A viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7 quando exposta às amostras em estudo é apresentada na tabela 12. Foram realizadas seis réplicas do experimento e cada condição foi testada em triplicata.

Observou-se em várias das réplicas uma tendência à diminuição da viabilidade celular em concentrações menores, resultado não esperado. Por isso, foi realizado um experimento adicional em concentrações mais baixas. O resultado desse experimento é apresentado na tabela 13 (cada condição foi testada em triplicata).

Tabela 12. Atividade citotóxica das amostras em estudo em concentrações de 40-1,25g/mL para macrófagos da linhagem RAW 264.7 determinadas pelo método MTT.

Concentração	**Viabilidade celular (%)**		
(g/mL)	EFSMp4	SPMp1	SPMp2
40	99,93	104,20	98,89
20	105,84	99,53	104,59
10	104,37	104,56	97,46
5	101,70	99,77	92,58
2,5	99,58	96,70	98,36
1,25	95,95	94,40	98,90

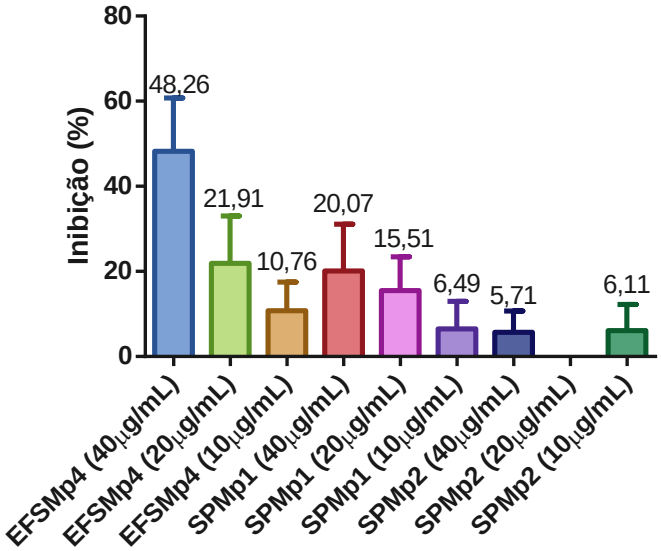
Tabela 13. Atividade citotóxica das amostras em estudo em concentrações de 10-0,3g/mL para macrófagos da linhagem RAW 264.7 determinadas pelo método MTT.

Concentração (g/mL)	**Viabilidade celular (%)**		
	SPMp1	SPMp2	EFSMp4
10	83,28	80,69	84,03
5	90,83	87,00	84,52
2,5	82,67	86,43	87,83
1,25	94,83	84,91	99,27
0,6	88,62	82,09	100,57
0,3	87,85	90,77	94,18

Com exceção de duas concentrações de EFSMp4 (1,25 e 0,6 g/mL), foram observados no experimento valores de viabilidade menores do 95% na maioria dos casos. Concentrações para as quais foram obtidos valores superiores de viabilidade no experimento anterior, dessa vez evidenciaram uma atividade citotóxica maior.

Para a quantificação de NO foram selecionadas as maiores concentrações que alcançaram um 95% de viabilidade (40-10g/mL). Foram realizadas três réplicas do experimento e cada condição foi testada em triplicata. A figura 46 mostra os resultados dos experimentos realizados, cada barra representa a média da porcentagem de inibição obtida para cada condição avaliada, considerando somente valores positivos de inibição.

Figura 46. Efeito das amostras em estudo sobre a inibição de nitrito em ensaio de macrófagos estimulados por LPS (100 ng/mL) *in vitro*.



Em média não foram observados valores de inibição superiores a 50% e, portanto, não é possível estabelecer valores de CI_{50} para as amostras em estudo para o experimento. As porcentagens médias (duas replicatas) de inibição alcançadas na maior concentração testada (40 g/mL) foram 53,96, 30,11 e 8,01% para EFSMp4, SPMp1 e SPMp2, respectivamente.

Resultados similares foram encontrados por Kouloura et al. (2014) na avaliação do efeito anti-inflamtório do extrato de folhas de *Micromelum falcatum* (Rutaceae) e compostos representativos da espécie (cumarinas 7-metoxi- 8-substituidas). No caso, extrato de acetato de etila mostrou un 46% inibição de NO a uma concentração de 20 µg/mL. Também no próprio artigo é relatado que os compostos majoritários testados não mostraram inibição.

Em estudo realizado por LV et al. (2015) foram referidos os valores de CI_{50} de algumas cumarinas e benzocumarinas isoladas da espécie *Murraya alata*. No artigo são destacados aqueles metabólitos que alcançaram valores de CI_{50} menores que 50 µM e comparados com a indometacina que mostrou CI_{50} de 6,3 µM (2,25 µg/mL). Metabólitos isolados mostraram uma ampla faixa de valores de CI_{50} com valores que podem ir de 3 a 13 µg/mL. No caso de nosso experimento um valor de concentração inihibitória no entorno do 50% foi somente observado para a fração EFSMp4.

O efeito sobre a inibição de NO é positivo quando há presença de inflamação crônica, onde uma elevada concentração dele e outros mediadores pode gerar danos nos tecidos inflamados, gerando desde fibrose até destruição tecidual.

5.3.6 Ensaios com neutrófilos "ex vivo"

5.3.6.1 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade, como os experimentos *in vitro*, permitem estabelecer as concentrações das amostras que garantem a viabilidade celular necessária para o desenvolvimento dos experimentos, permitindo uma adequada interpretação dos resultados.

Neste ensaio, além de avaliar as amostras de interesse (EFSMp4, SPMp1 e SPMp2) também foi testado o metanol, solvente usado no preparo das amostras, com a finalidade de avaliar a sua influência nos resultados do teste. As células expostas a metanol mostraram uma viabilidade de 62,41%. A tabela 14 mostra a viabilidade celular dos neutrófilos recrutados, frente às diferentes concentrações testadas para cada amostra.

Tabela 14. Atividade citotóxica das amostras em estudo em concentrações de 40-2,5g/mL em neutrófilos peritoneais determinada pelo método MTT.

Concentração (g/mL)	**Viabilidade celular (%)**		
	EFSMp4	SPMp1	SPMp2
40	8,51	12,77	26,95
20	10,64	41,13	33,33
10	21,28	45,39	23,40
5	27,66	61,70	43,97
2,5	66,67	71,63	41,13

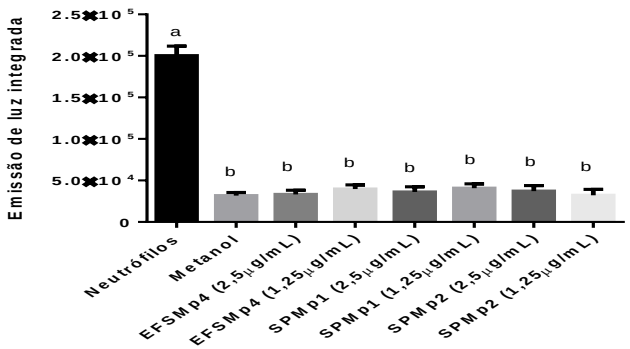
Os resultados evidenciaram que a viabilidade das células expostas às amostras em estudo foi afetada pela presença do metanol. Considerando uma morte celular de aproximadamente 38% relacionada ao metanol, somente as menores concentrações das amostras EFSMp4 e SPMp1 (2,5g/mL) garantem uma porcentagem adequada de viabilidade celular para a realização dos ensaios de função neutrofílica.

5.3.6.2 Avaliação de parâmetros da função neutrofílica

5.3.6.2.1 Quimiluminescência luminol-dependente (NOX2/MPO)

Este ensaio permite avaliar a produção geral de ERO nos neutrófilos estimulados, também conhecido como "*Burst* oxidativo". A figura 47 apresenta a emissão de luz integrada, indicativa do *pool* de ERO gerados por neutrófilos não tratados e tratados tanto com metanol quanto com as amostras em estudo.

Figura 47: Atividade de NOX2/MPO de neutrófilos peritoneais mediante quimiluminescência luminol-dependente. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

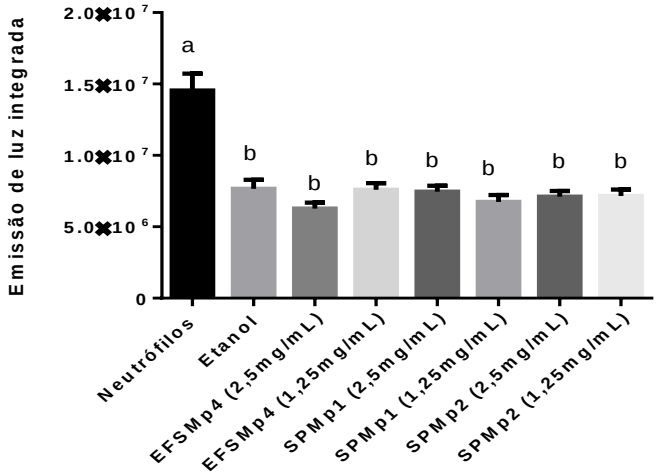


Letras diferentes indicam diferenças significativas para p<0,05 em relação ao controle (Neutrófilos)

O experimento permitiu observar uma diminuição significativa da emissão de luz integrada pelas células tratadas (Metanol, EFSMp4, SPMp1 e SPMp2) quando comparadas com neutrófilos não tratados, o que seria indicativo de uma diminuição na produção de ERO, mas considerando o efeito da citotoxicidade previamente observado, não pode ser concluído ainda que há um efeito antioxidante, pois essa diminuição no sinal poderia estar somente relacionada com uma baixa viabilidade celular e não com o efeito das amostras em estudo sobre a função neutrofílica.

Foi realizado então um outro experimento onde o solvente foi o etanol e sua concentração na reação foi diminuída de 3 para 1%. A figura 48 apresenta a emissão de luz integrada, indicativa do *pool* de ERO gerados por neutrófilos não tratados e tratados tanto com etanol quanto com as amostras em estudo.

Figura 48: Atividade de NOX2/MPO de neutrófilos peritoneais mediante quimiluminescência luminol-dependente. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM).



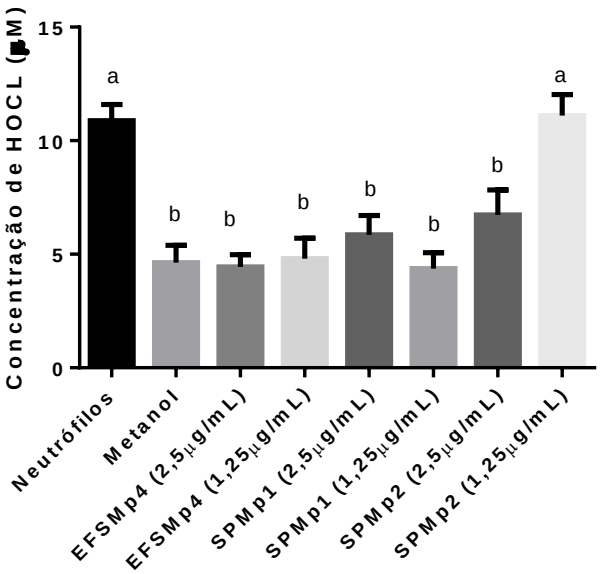
Letras diferentes indicam diferenças significativas para p<0,05 em relação ao controle (Neutrófilos)

Mesmo quando a diferença na emissão de luz integrada entre as amostras e o controle é menor que a observada no experimento anterior, persistem as diferenças significaticas entre amostras e controle, sem ser observadas diferenças quando comparadas com o etanol, nem tendências relacionadas com as diferentes concentrações testadas para cada amostra em estudo. Ainda a viabilidade pode estar interferindo na diminuição do sinal.

5.3.6.2.2 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (Produção de ácido hipocloroso)

O ácido hipocloroso (HOCl) é um potente oxidante produzido por neutrófilos ativados, a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o íon de cloreto em uma reação catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO). O experimento permitiu observar uma diminuição significativa na produção de HOCl pelas células tratadas (Metanol, EFSMp4 e SPMp1) quando comparadas com neutrófilos não tratados(figura 49). Para a amostra SPMp2 observou-se uma inibição dose-resposta, sem mostrar diferenças significativa à concentração de 1,25μg/mL quando comparado com neutrófilos não tratados.

Figura 49: Concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA

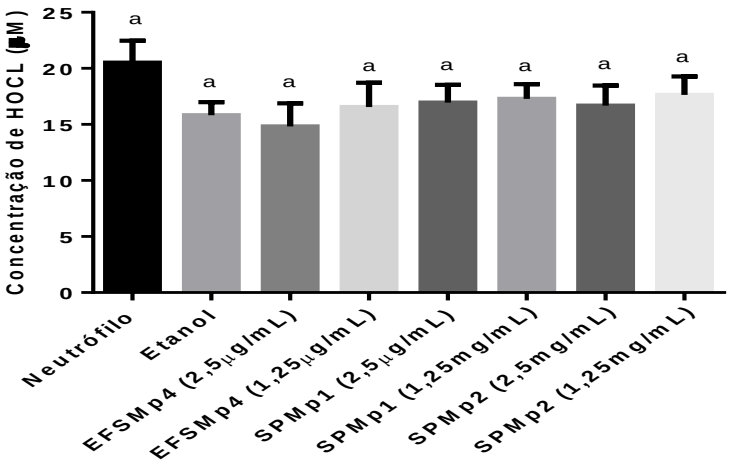


Letras diferentes indicam diferenças significativas para p<0,05 em relação ao controle (Neutrófilos)

Considerando os resultados do ensaio de citotoxicidade e o fato de não ser observadas diferenças significativas entre o grupo tratado com metanol e amostras em estudo (EFSMp4, SPMp1 e SPMp2 - 2,5μg/mL), não pode ser concluído que há um efeito antioxidante relacionado à inibição da enzima MPO.

Foi realizado também neste caso um outro experimento onde o solvente foi o etanol e sua concentração na reação foi diminuída de 3 para 1%. A figura 50 apresenta a concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA, tratados tanto com etanol quanto com as amostras em estudo, e não tratados (controle).

Figura 50: Concentração de HOCl em neutrófilos peritoneais ativados com PMA



Letras diferentes indicam diferenças significativas para p<0,05 em relação ao controle (Neutrófilos)

O resultado desse segundo experimento não evidenciou diferenças significativas entre os grupos, pelo que poderia ser sugerido que essas amostras, nessas concentrações não interferem na produção de HOCl por neutrófilos ativados. Desde o ponto de vista do processo inflamatório agudo, sería um efeito positivo, pois é a presença de ERO nas etapas iniciais da inflamação uma das vias para garantir a eliminação dos agentes causantes da inflamação.

6. CONCLUSÕES

O EEMp (300mg/Kg) e a fração EFSMp4 (150mg/Kg) apresentaram o melhor efeito anti-inflamatório pelo modelo de edema de pata, mostrando também o menor efeito ulcerogênico na mucosa gástrica dos animais tratados. O modelo de pleurisia não permitiu obter resultados associados à atividade anti-inflamatória, porém mostrou evidências de um provável efeito hemorrágico de EFSMp4.

O procedimento de fracionamento biomonitorado pela atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico das folhas de *M. paniculata*, conduziu ao isolamento de dois metabólitos majoritários do extrato, a partir da fração bioativa EFSMp4. A partir dos dados da literatura e das análises espectrométricas os metabólitos purificados foram identificados como duas cumarinas previamente relatadas na espécie a murpanidina e o hidrato de meranzina. Também foi proposta a presença da murralongina a partir das análises por CLAE-EM. Esta classe de cumarinas (7-metoxi-8-preniladas) tem mostrado evidências da sua relação com o efeito anti-inflamatório de extratos vegetais.

Quanto à avaliação da atividade antioxidante pelo método do cátion radical $ABTS^{+\bullet}$, o EEMp e as frações EFSMp3 e EFSMp4 alcançaram os menores valores de CE_{50}, e foram similares a dados encontrados na literatura para outros extratos vegetais.

Em relação à mutagenicidade o extrato de *M. paniculata* e a fração EFSMp4, induziram potencial mutagênico tanto direta, como indiretamente (sem e com ativação metabólica). Mesmo que atualmente sejam muitas as plantas de uso popular que apresentam efeitos genotóxicos, o uso destas deveria ser feito com mais critério para garantir a segurança do paciente e uso racional de os produtos fitoterápicos elaborados a partir delas. O uso de *M. paniculata* por via tópica poderia então garantir uma maior segurança, porém não deve ser descartada a possibilidade de efeitos negativos na saúde.

A fração EFSMp4, a murpanidina (SPMp1) e o hidrato de meranzina (SPMp2) não apresentaram citotoxicidade significativa nas concentrações desde 2,5 até 40g/mL em macrófagos da linhagem celular utilizada (RAW 264.7). Na quantificação de NO não foi possível estabelecer valores de CE_{50} para as amostras em ensaio, pois em média não foram observados valores de inibição superiores a 50% para o

experimento. As porcentagens médias de inibição alcançadas na maior concentração testada (40 g/mL) foram 53,96, 30,11 e 8,01% para EFSMp4, SPMp1 e SPMp2, respectivamente. Sendo assim a fração testada garante uma adequada inibição de NO o que pode contribuir positivamente em processos inflamatórios crónicos nos quais a elevada formação de ERO pode gerar até destruição tecidual. Adicionalmente, considerando a porcentagem de inibição das substâncias purificadas da própria fração, poderia ser inferido que são as fundamentais responsáveis pelo efeito observado para EFSMp4.

Em neutrófilos peritoneais de ratos foi observada citotoxicidade para a fração EFSMp4 e a murpanidina (SPMp1) acima de 2,5 e 5 g/mL, respectivamente, e o hidrato de meranzina (SPMp2) apresentou citotoxicidade em todas as concentrações testadas. O efeito observado nos ensaios de função neutrofílica não permite ainda fazer uma correlação adequada das EROS avaliadas, com o processo inflamatório, mas há evidências da contribuição nas etapas iniciais.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados da pesquisa realizada contribuem no conhecimento tanto químico quanto farmacológico da espécie *M. paniculata* coletada em Cuba, mas também levantam uma série de questões relacionadas fundamentalmente com a eficácia e segurança do seu uso na terapia.

A identificação de um número maior de metabolitos presentes no extrato contribuirá a uma melhor caraterização da espécie.

Estudos farmacologicos deveram ser aprofundados com a finalidade de estabelecer o mecanismo pelo qual o efeito anti-inflamátorio é exercido e a relação com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

As evidências de efeitos tóxicos indicam a necessidade de estabelecer uma via de administração segura para fitoterápicos obtidos a partir do extrato etanólico da planta.

Outros extratos, preferencialmente hidroetanólicos, podem ser estudados com a finalidade de determinar se a regulação dos metabolitos maioritários extraídos (cumarinas) influencia nos efeitos tóxicos observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDAPO A. A.; FALAYI, O. O.; OYAGBEMI, A. A. "Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed Moringa oleifera in some laboratory animals," **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, no. 5, pp. 491–499, 2015.

ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 8a ed., Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARULSELVAN, P.; TANGESTANI FARD, M.; WOAN SEAN, T.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** Volume 2016, Article ID 5276130, 15 pages. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2016/5276130

ASHIHARA, H.; WATANABE, S. Accumulation and function of trigonelline in non-leguminous plants. **Natural Product Communication.** v. 9, n. 6, p. 795-8, 2014.

ASSIS, R. P. **Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-modelo *in vitro*.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmacia) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

BARBOSA, K.; COSTA N, ALFENAS R, ET AL. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição,** Campinas**,** v. 23, n.4, p. 629-643, jul./ago., 2010.

BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som (I): influência do ultra-som na química. **Quim Nova** v. 15, p. 302-315, 1992.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267–281, 1982.

Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemistry Research Toxicology,** v. 9, p. 836–844, 1996

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira. Volume 1**. 5. ed. Brasília, 2010.

CASADO, C.M.M.; GUTIÉRREZ, Y.G.; RODRÍGUEZ, E.A. Acercamiento al género Murraya (Rutaceae) y a la especie *Murraya paniculata* (L) Jack. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.** v. 16, n. 4, p. 408-418, 2011.

CASADO, C.M.M.; GUTIÉRREZ, Y.G.; VARONA, N.T. Evaluación de la calidad, seguridad y capacidad antioxidante de Murraya paniculata L y su tintura. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 2014;19(2):208-217.

CAYMAN CHEMICAL. **Prostaglandin E_2 EIA kit - Monoclonal (Item No. 514010)**. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf>. Acesso em: 02 out 2014.

CHIARI, B. G. Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

CHOWDHURY, J.U.; BHUIYAN M.N.I.; MOHAMMED Y. Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 59-63, 2008.

CIOLI, V.; PUTZOLU, S.; ROSSI, V.; CORZA, B.P.; CORRADINO, C. The role of directtissue contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 50, p. 283-289, 1979.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Modern Pharmacology with Clinical Applications,** Cistercian Studies Series; Edition 5. Little - Brown, University of Michigan. 1997. Digitized 25 Aug 2008. ISBN 0316159344, 9780316159340. p.832.

DANTAS, I.D.S.; SOARES, C.F.A. Avaliação de parâmetros de extração da Cinchona Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Rev. Bras. farmacogn**. v.19, n. 3, 2009.

DARLING, R.L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E.J.; AKUNDA, J.K.; ANGENBACH, R.; LICHTENBERGER, L.M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, suface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. **Gastroenterology,** v. 127, n. 1, p. 94-104, 2004

DASH, G.K.; PATRO, C.P.; MAITI, A.K. Anti-inflammatory and analgesic activity of leaf essential oil from *Murraya koenigii* Spreng. **Hamdard Medicus**, v. 47, p. 22-26, 2004.

DESERT-TROPICALS. Orange jasamine. 2002. Disponible en: http://www. desert- tropicals.com/Plants/Rutaceae/Murraya_paniculata.html.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.

FARD, M. T.; P. ARULSELVAN, G.; KARTHIVASHAN, S. K.; ADAM, S. “Bioactive extract from *Moringa oleifera* inhibits the pro-inflammatory mediators in Lipopolysaccharide stimulated macrophages,” **Pharmacognosy Magazine**, vol. 11, supplement 4, p. S556–S563, 2015

FAZAL, R.; MUHAMMAD, F.; IRID, K.; INAMULLAH, K.; HUMA, S.; SARFARAZ, K.M. Analgesic Activity of Carbazole Alkaloid from *Murraya paniculata* Linn. (Rutaceae). **American-Eurasian Journal of Agricultural and Enviromental Science**, v. 14 n. 3, p. 240-245, 2014.

FERRACIN, R.; DAS, F.; JOÃO, D.S.; VIEIRA, P. Flavonoids from the fruits of *Murraya paniculata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 3, p. 393-6, 1998.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FLEMMING, M.; B. KRAUS, A.; RASCLE E. T. “Revisited antiinflammatory activity of matricine in vitro: comparison with chamazulene,” **Fitoterapia**, vol. 106, p. 122–128, 2015.

GAUTAM, M.K.; SINGH, A.; RAO, C.V.; GOEL, R.K. Toxicological Evaluation of *Murraya Paniculata* (L.) Leaves Extract on Rodents. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 62-67, 2012.

GBIF Backbone Taxonomy. **GBIF Secretariat. Checklist Dataset**, 2016. https://doi.org/10.15468/39omei accessed via GBIF.org on 2017-06-13.

GENÉ, R. M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*. Identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, n. 3, p.232-235, 1996.

GERRITSEN, M. E.; CARLEY, W. W.; RANGES, G. E; ET AL. “Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression,” **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 2, p. 278–292, 1995.

GHANI, A. **Medicinal plants of Bangladesh: Chemical constituents and uses.** 2 ed. Dhaka, Asiatic Society of Bangladesh, 2003.

GONÇALVES, S.C.F. Farmacotecnica de Fitoterapicos. Departamento de Farmacia. Universidade Federal de Ceará. 2005.

HARISH, P. Herbal drugs. Meeting report. **Current Science**, v.81, n.1, p.15-16, 2001.

IMAI, F.; KINOSHITA, T.; SANKAWA, U. Constituents of the leaves of Murraya paniculata collected in Taiwan. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.37, n.2, p.358-362, 1989.

ITO, C.; FURUKAWA, H. The Chemical Composition of *Murraya paniculata*. The Structure of Five New Coumarins and One New Alkaloid and the Stereochemistry of Murrangatin and Related Coumarins. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions**, v. 1, p. 2047-55, 1990.

JEONG, J.G.; KIM, Y.S.; MIN, T.Y.; KIM, S.H. Low concentration of 3-carene stimulates the differentiation of mouse osteoblastic MC3T3-E1 subclone 4 cells. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 18-22, 2007.

JINGTAO, Z.; XIAOFENG, Y.; SHAOCHUN, Q.; XUWEN, L.; YONGRI, J.; DAYUAN, S. Protective effect of total flavonoids extracted from the leaves of Murraya paniculata (L.) Jack on diabetic nephropathy in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.64, p. 231–237, 2014.

JONES, O. T.; HANCOCK J. T. Assays of plasma membrane NADPH oxidase. **Methods in Enzymology**. New York, v. 233, p. 222-229, 1994.

JORGE, R.E.; RAMIS, R.G.; VANDER, H.Y.; SIMÓ, A.E.F.; SAUCEDO, H.Y.; MONTEAGUDO, U.; MORALES, Y.; HOLGADO, B.; HERRERO, M.J.M. Chemical Composition, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Murraya paniculata* Leaves from the Mountains of Central Cuba. **Natural Products Communications**, v. 7, n. 11, p. 1527-30, 2012.

KOULOURA, E.; DANIKA, E.; KIM, S.; HOERLÉ, M.; CUENDET, M.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, L.A. Rapid Identification of Coumarins from Micromelum falcatum by UPLC-HRMS/MS and Targeted Isolation of Three New Derivatives. **Molecules** 2014, v.19, p.15042-15057.

KESTLING, J.R.; HAUNG, J.; SERENSEN, D. Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC-HRMS and LC-MS SPE/NMR and comparative *in vivo* study with standards in a hypertensive rat model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 51, n. 3, p. 705-11, 2010.

KINUPP, V. F. Plantas Alimentícias Não Convecionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas / Valdely Ferreira Kinupp, Harri Lorenzi. – **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2014. ISBN 978-85-86714-46-7.

KINOSHITA, T.; SHIMADA, M. Isolation and structure elucidation of a new prenylcoumarin from *Murraya paniculata* var. omphalocarpa (Rutaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 1, p. 118-20, 2002.

KONG, Y.C.; CHENG, K.F.; CAMBIE, R.C.; WATERMAND, P.G. Yuehchukene: a novel lndole alkaloid with anti-implantation activity. **Jounal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 47-8, 1985.

KUMAR. V.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 8a ed. Elsevier Editora, 2010.

KUMAR, M.P.; NATH, B.D.; SAHA, A.; AHMED, M. Analgesic activity of bark of *Murraya paniculata*. Full Length Research paper. **International Journal of Medicine and Medical Science,** v. 3, n. 4, p. 105-8, 2011.

LANE, T.E.; WU-HSIEH, B.A.; HOWARD, D.H. Gamma interferón cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1468-73, 1993.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGU EIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2004.

LAPCIK, O.; KLEJDUS, B.; DAVIDOVÁ, M.; KOKOSKA, L.; KUBÁN, V.; MORAVCOVÁ, J. Isoflavonoids in the Rutaceae family: 1. Fortunella obovata, *Murraya paniculata* and four Citrus species. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 5, p. 293-9, 2004.

LORDÊLLO, D. M. S. Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de Mentha piperita e estudo comparativo de atividades antioxidantes em espécies de mentas. Dissertação. (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

LOU, Z.C. General control methods for vegetable drugs. Comparative study of methods included in thirteen pharmacopoeias and proposals on their internacional unification. WHO/PHARM/80.502. 1980. p. 8-39.

LV, H. N. ET AL. Anti-inflammatory Coumarin and Benzocoumarin Derivatives from Murraya alata. **Journal of Natural Products,** v.78, n.2, p. 279-285. 2015.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MATOS, M. J.; URIARTE, L. S.; ABREU, O. A.; MOLINA, E.; GUARDADO, Y. E. **Coumarins — An Important Class of Phytochemicals**. Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health (Chapter 5). Licensee InTech©. 2015

MATOS, M. J.; VAZQUEZ-RODRIGUEZ, S.; FONSECA, A.; URIARTE, E.; SANTANA, L.; BORGES, F. Heterocyclic Antioxidants in Nature: Coumarins. **Current Organic Chemistry**, v.21, p.311-324, 2017.

McDonagh, M. **Drug Effectiveness Review Project**. Oregon Health & Science University Portland, Oregon. 2010

MENDONÇA, P. S. B. ET AL. β-glucan induces reactive oxygen species production in human neutrophils to improve the killing of *Candida albicans* and *Candida labrata* isolates from vulvovaginal candidiasis. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-14, 2014.

MESQUITA, S.G.; MARTINEZ, M.F.; ROMOFF, P.; FAVERO, O.A.; LIEBER, S.R.; LAGO, J.H.G. Chemical constituents from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Brasilera de Farmacognosia,** v. 18, n. 4, p.563-8, 2008.

MINSAP. Formulario Nacional de Fitofármcos y Apifármacos. **Ministerio de Salud Pública – ECIMED**, 2014.

MINSAP. Lista Básica de Medicamentos de Cuba. **Ministerio de Salud Pública,** 2016.

MIRANDA, M.M.; CUELLAR, A.C. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana, p. 25-49, 74-79, 2000.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants and redox signaling**, v. 20, n.7, 2014. DOI: 10.1089/ars.2012.5149

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research,** v. 455, p. 29 – 60, 2000.

MOSIHUZZAMAN, M.; CHOUDHARY, M.I. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine. **Pure and Applied Chemistry,** v. 80, n. 10, p. 2195-2230, 2008.

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

MUANGNOI, C.; CHINGSUWANROTE, P.; PRAENGAMTHANACHOTI, P.; SVASTI, S.; TUNTIPOPIPAT, S. "*Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharidestimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines," **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 445–455, 2012.

NAGATA, M. Inflammatory Cells and Oxygen Radicals. **Current Drug Targets - Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 4, 2005.

NARKHEDE, M.B.; AJMIRE, P.V.; WAGH, A.E. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of etanol extract of *Murraya paniculada* leaves in experimental rodents. Research article. **Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,** v. 4, n. 1, 2012.

NEGI, N.; OCHI, A.; KUROSAWA, M.; USHIJIMA, K.; KITAGUCHI, Y.; KUSAKABE, E. Two new dimeric coumarins isolated from *Murraya exotica*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 9, p. 1180-2, 2005.

NGUYEN, M.C.; PHAM, N.K.; HO, V.D.; TRAN, T.H.; BUI, H.T.; NGUYEN, Q.B.; DURANTE, M.; FUSI, F. Vasorelaxing Activity of Two Coumarins from *Murraya paniculata* Leaves**. Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 37, n. 4, p. 694–697, 2014.

OLAWORE, N.O.; OGUNWANDE, I.A.; EKUNDAYO, O.; ADELEKE, K.A. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 1, p. 54-56, 2005.

OMS. World Health Organization. Quality Control Methods for medicinal Plant Materials. Geneva. 1998.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. China. 2013.

PARROTTA, J.A. Healing plants of Peninsular India. **Wallingford, UK and New York: CABI Publishing**. 2001. p. 917.

QING, W,L.; HONG, C.J.; SHA, S.C.; XUE, M.Z.; LONG, Z.L. Chemical Composition and Toxicity against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* of the Essential Oil of *Murraya exotica*. **Molecules**, v. 15, p. 5831-9, 2010.

RAHMAN, M.D.A.; HASANUZZAMAN, M.D.; UDDIN, N.; SHAHID I.Z. Antidiarrhoeal and anti-inflammatory activities of *Murraya paniculata* (L.) JACK. **Pharmacologyonline**, v. 3, p, 768-76, 2010.

RE, R. ET AL. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROCHA, L.G.; ARAGÃO, C.F.S.; LOIOLA, M.I.B.; BEZERRIL, R.A.; PAIVA, N.R.F.; HOLANDA, C.M.C.X.; BRITO, M.E.F. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 51-56, 2009.

RODANANT, P.; SURARIT, R.; SRICHAN, R.; KORSUWANWONG, S. Cytotoxic and anti-inflammatory activity of some Thai medicinal plants. Full Length Research Paper. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 23, p. 4063-68, 2012.

ROIG, JT. **Diccionario botánico de nombres vulgares cubano**. La Habana, Cuba: Ed. científico técnica, 1988.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan.**, São Paulo, v. 20, p. 315-328, 1947.

ROUT, P.K.; RAO, Y.R.; SREE, A.; NAIK, S.N. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murrarya paniculata* (L.) Jack flowers. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 352-7, 2007.

SAEED, S.; SHAH, S.; MEHMOOD, R.; MALIK, A. Paniculacin, a new coumarin derivative from *Murraya paniculata*, **Journal of Asian Natural Products Research**, v.13, n.8, p.724-727, (2011). DOI: 10.1080/10286020.2011.586343

SAIED, S.; UDDIN, S. 1', 2'-o-isopropylidene murrangatin from *Murraya paniculata*. **Journal of Basic and Applied Sciences,** v. 4, n. 1, p. 13-5, 2008.

SÁNCHEZ, W.M. OBTENCIÓN DE UN GEL A PARTIR DE LA TINTURA DE Murraya paniculata (L.) (DROGA SECA). Tesis de Maestría en Tecnología y Control de Medicamentos. 2015. Universidade da Habana, Cuba.

SAWANGJAROEN, N.; PHONGPAICHIT, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; VISUTTHI, M.; SRISUWAN, N.; THAMMAPALERD, N. The anti-amoebic activity of some medicinal plants used by AIDS patients in southern Thailand. **Parasitology Research,** v. 98, p. 588-592, 2006.

SMITH, C. E.; SOTI, S.; JONES, T. A.; NAKAGAWA, A.; XUE, D.; YIN, H. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are Caspase Inhibitors. **Cell Chemical Biology** v.24, p.1–12, 2017 Elsevier Lt.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3ª edição, New York: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOGO, T.; TERAHARA, N.; HISANAGA, A.; ET AL. “Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3- sambubioside, a hibiscus anthocyanin,” **BioFactors**, vol. 41, no. 1, pp. 58–65, 2015

STILL, W.C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2923-5, 1978.

SUNDARAM, M.; SIVAKUMAR, K.; BHUVANESHWARI, A.; THIRUMALAI, P. Studies on *in vitro* Antibacterial, Antifungal Property and Antioxidant Potency of *Murraya paniculata*. **Pakistan Journal of Nutrition,** v. 10, n. 10, p. 925-9, 2011.

VARONA, T.N. Estandarización de los parámetros de calidad de la tintura de *Murraya paniculata* (L.) Jack. Tesis de Maestría en Tecnología y Control de

Medicamentos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 2013.

VENIL, N.S. Novel approaches for activity based standardization of herbal drugs. Commentary. **Current Science**, v. 98, n. 5, p. 610-11, 2010.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 3, p. 711-4, 1973.

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** v. 111, p. 544-7, 1962.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, 16, 4236-4260, 2009.

XIMENES, V. F.; PAINO, I. M. M.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M.; FONSECA, L. M.; BRUNETTI, I.L. “Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid,” **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, pp. 1575–1583, 2005.

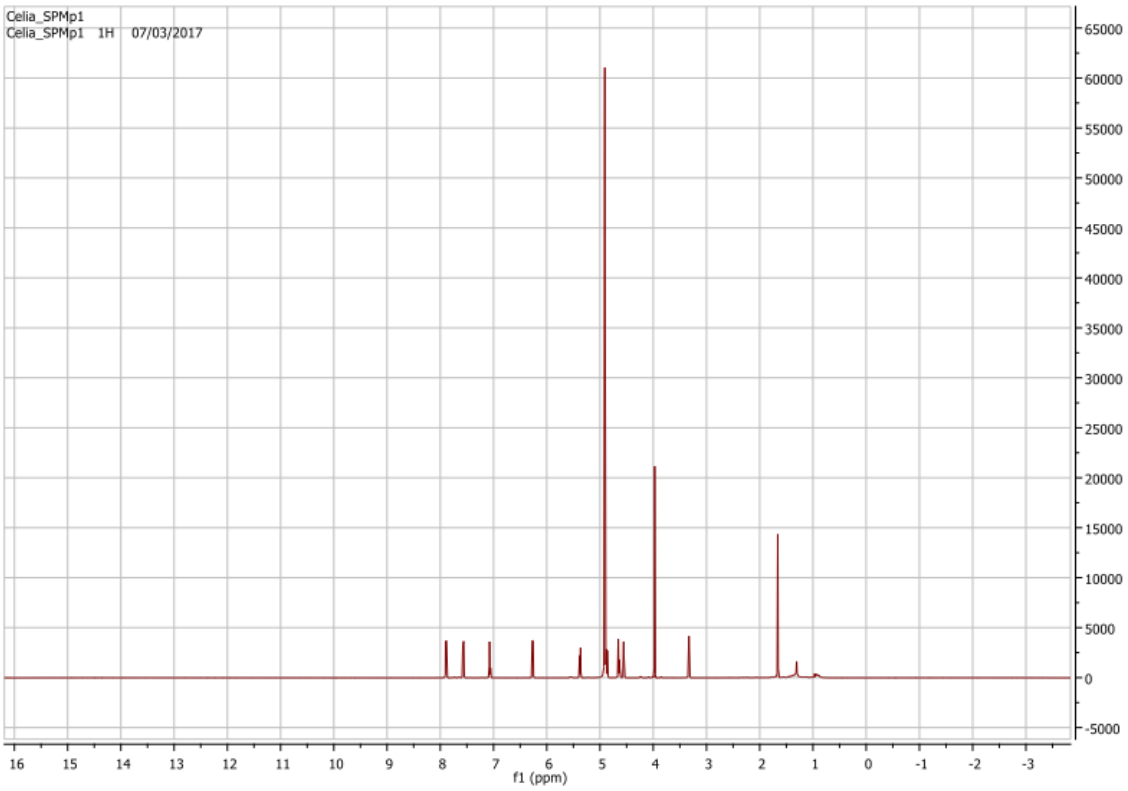
YADAV, N.P.; DIXIT, V.K. Recent approaches in herbal drug standardization. **International Journal of Integrative Biology,** v. 2, p. 195-203, 2008.

ZHANG, J.Y.; LI, N.; CHE, Y.Y.; ZHANG, Y.; LIANG, S.X.; ZHAO, M.B.; JIANG, Y.; TU, P.F. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of *Murraya paniculata* by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 56, n. 5, p. 950-61, 2011.

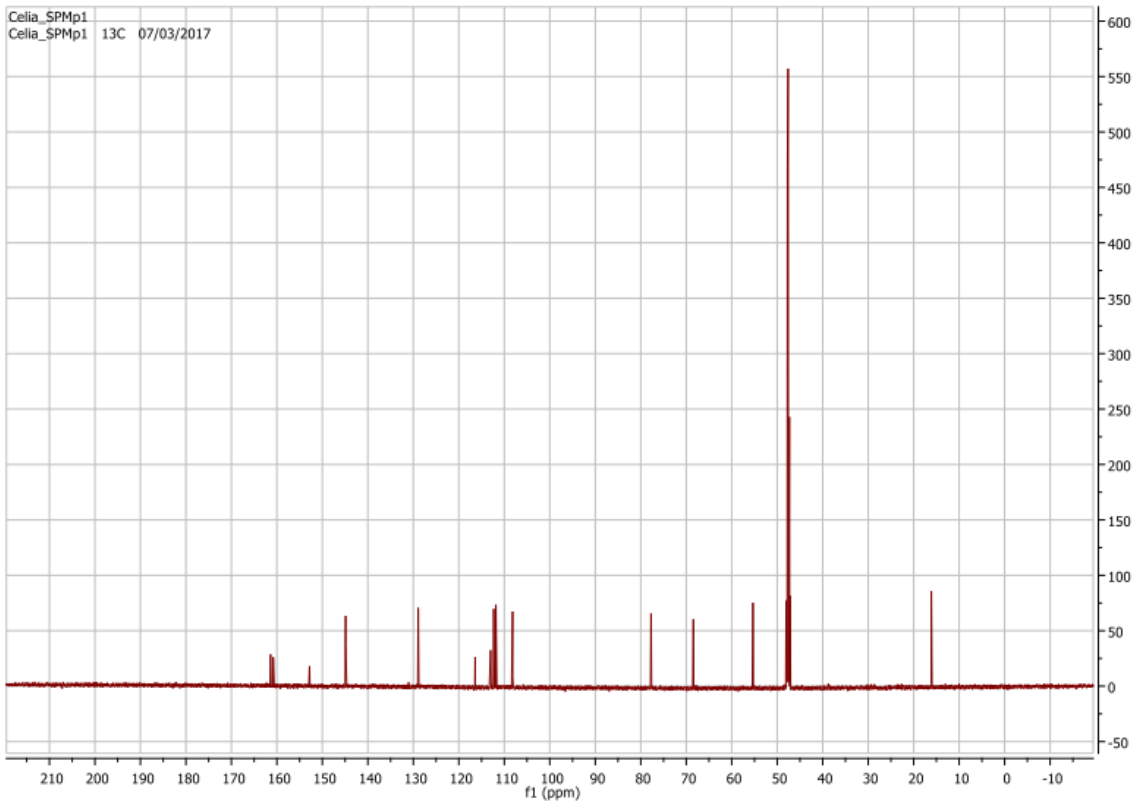
ZHOU, J.; CHAN, L.; ZHOU, S. Trigonelline: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Diabetes and Central Nervous System Disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3523-3531, 2012.

APÊNDICES

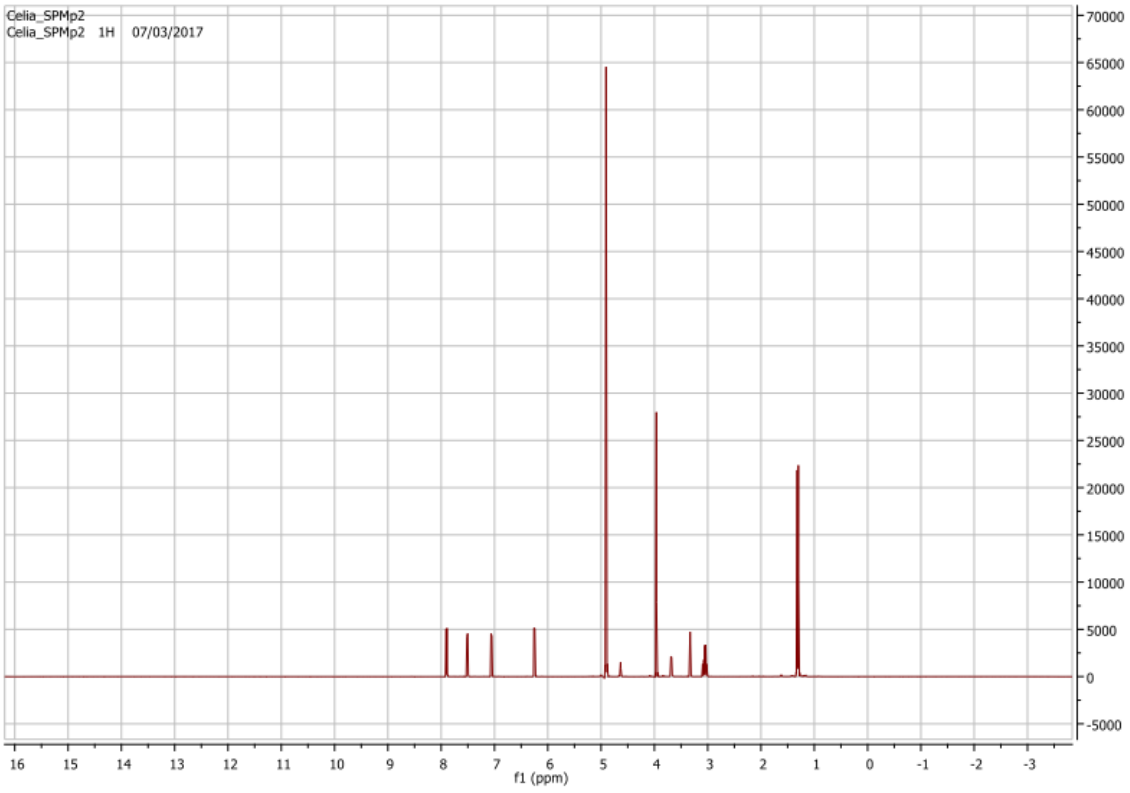
Apêndice 1: Espectro de RMN de ^{1}H da SPMp1 em metanol-d4 obtido a 600 MHz.



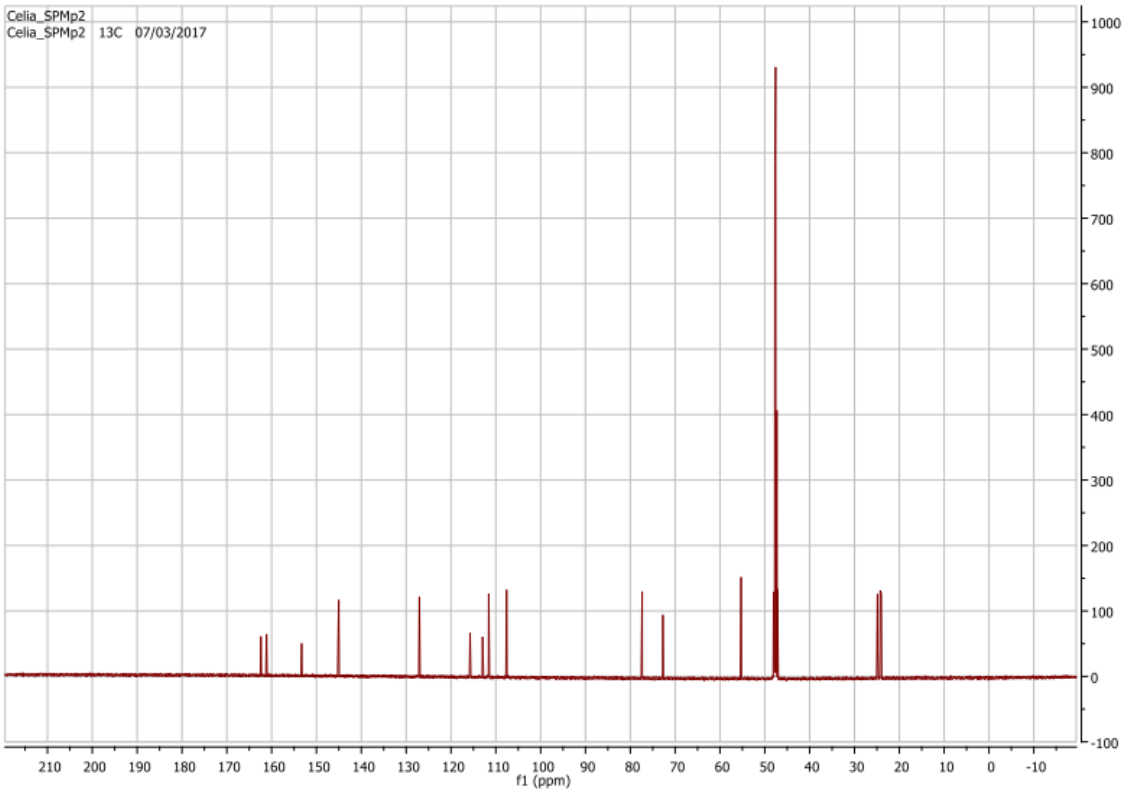
Apêndice 2: Espectro de RMN de ^{13}C da SPMp1 em metanol-d4 obtido a 150 MHz.



Apêndice 3: Espectro de RMN de ^{1}H da SPMp2 em metanol-d4 obtido a 600 MHz.



Apêndice 4: Espectro de RMN de ^{13}C da SPMp2 em metanol-d4 obtido a 150 MHz.



ANEXOS

Anexo 1: Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 09/2015

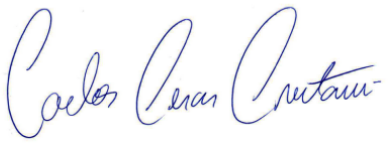
Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 09/2015
Interessada: ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO
Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Projeto: Padronização do Extrato Etanólico das Folhas de Murraya paniculata L. Jack para o desenvolvimento de fitoterápicos com ação anti-inflamatória

Parecer nº 14/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 19 de março de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Padronização do Extrato Etanólico das Folhas de Murraya paniculata L. Jack para o desenvolvimento de fitoterápicos com ação anti-inflamatória", apresentado pelo pós-graduando ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO, sob orientação do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JANEIRO de 2018 em formulário para este fim.

Araraquara, 23 de março de 2015.



Profª Drª CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo 2: Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 46/2016

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 46/2016

Interessado: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Projeto: Estudo do extrato etanólico das folhas de Murraya paniculata L. Jack para o desenvolvimento de fitoterápicos com ação anti-inflamatória.

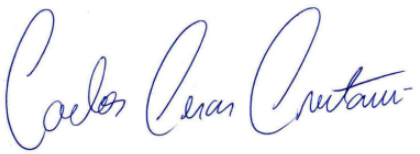
Despacho nº 49/2016 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião do dia 09 de dezembro de 2016, verificou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo do extrato etanólico das folhas de Murraya paniculata L. Jack para o desenvolvimento de fitoterápicos com ação anti-inflamatória.", apresentado pelo Professor Doutor André Gonzaga dos Santos, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, necessita do seguinte esclarecimento/adequação:

I – No item 1 do formulário, atualizar a data de inicio do experimento

Solicita-se, ainda, que a resposta a este despacho seja enviada em forma de carta/ofício de forma ordenada, conforme os itens constantes deste despacho, com os esclarecimentos ou indicações das possíveis alterações efetuadas no novo protocolo preenchido. O projeto em questão terá prazo de até 30 dias para sua adequação, após o que o processo de análise será arquivado, conforme letra c do Art. 21 do Regimento desta CEUA.

Araraquara, 09 de dezembro de 2016.



Prof Dr CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA