

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANA CATHARINA FERNANDES PEREIRA FERREIRA BERNARDES**

**Avaliação dos efeitos de lactonas sesquiterpênicas na  
hiperuricemia, excreção do ácido úrico, estresse oxidativo  
e artrite gotosa**

**Ouro Preto  
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Avaliação dos efeitos de lactonas sesquiterpênicas na  
hiperuricemia, excreção do ácido úrico, estresse oxidativo  
e artrite gotosa**

**Autora:** Ana Catharina Fernandes Pereira Ferreira Bernardes

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dênia Antunes Saúde Guimarães

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - CiPharma, da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos. Linha de Pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Ouro Preto

2018

B517a Bernardes, Ana Catharina Fernandes Pereira Ferreira.  
Avaliação dos efeitos de lactonas sesquiterpênicas na hiperuricemia, excreção do ácido úrico, estresse oxidativo e artrite gotosa [manuscrito] / Ana Catharina Fernandes Pereira Ferreira Bernardes. - 2018.  
xix, 94f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dênia Antunes Saúde Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Lactonas sesquiterpênicas. 2. Inflamação. 3. Gota. 4. Estresse oxidativo. 5. Nocicepção. I. Guimarães, Dênia Antunes Saúde. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.72-002.78

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Escola de Farmácia

### LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 149ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Ana Catharina Fernandes Pereira Ferreira Bernardes**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação dos efeitos de lactonas sesquiterpênicas na hiperuricemia, excreção do ácido úrico, estresse oxidativo e artrite gotosa”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 26 de outubro de 2018.

Prof. Dra. Márcio de Matos Coelho  
UFMG

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso  
UFOP

Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães  
UFOP

**Este trabalho foi realizado sob a orientação da  
Profª. Drª. Dênia Antunes Saúde Guimarães**

**Laboratório de Plantas Medicinais  
(LAPLAMED)**

**Ouro Preto  
2018**

**Este trabalho foi financiado por:**

**FAPEMIG**

**CAPES**

**CNPQ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À professora Dênia Antunes Saúde Guimarães pela oportunidade, por todos os ensinamentos, paciência, convívio e por ser uma grande inspiração.

Aos professores do CiPharma pelos ensinamentos. Aos técnicos e demais funcionários do CiPharma.

À professora Andrea Grabe pela disponibilização do equipamento anestesiômetro do Laboratório de Farmacologia.

Às professoras Daniela Sachs e Daniela Caldeira pelos ensinamentos e auxílio nos experimentos.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal (CCA-UFOP) pela disponibilização dos animais.

Ao técnico Rodrigo Dian e ao Laboratório de Imunopatologia pelas análises no citômetro.

Aos colegas e amigos do LAPLAMED, em especial: Grazielle, Camila Müller, Marcela, Tamires, Camila Barros, Rafaela e Arthur, pela colaboração na realização dos experimentos e pelo convívio diário.

À Amanda Quaresma pelas conversas, ajuda diária, disponibilidade e pela amizade.

À aluna de iniciação científica Manuela por estar sempre disposta a ajudar.

À Thayane pela convivência e por ter se tornado uma grande amiga.

Ao meu pai Edson (*in memorian*) e minha mãe Ângela, por acreditarem em mim e por me fazerem ir sempre além.

Aos meus irmãos Edson Filho e Ana Carolina pelo apoio e amizade.

À minha amada sobrinha e afilhada Marina por ser sempre um sinônimo de alegria.

Ao meu padrasto Eduardo pelo apoio e energias positivas.

À minha avó Ana (*in memorian*) de quem eu orgulhosamente herdei o nome e o amor pelas plantas.

À toda a minha família e amigos por se fazerem presentes mesmo com a distância, especialmente aos amigos de Ouro Branco: Lina, Rayra, Isabela, Felipe e Hérmon. Aos primos: Luana, Jordânia, Luís Felipe, Clarisse, Walter Neto, Lara, Manuela, Gustavo e Clara. E aos tios: Juninho, Edvânia, Regina, Cristina e Gustavo.

Ao meu amor Gustavo pelo companheirismo, incentivo e por me fazer acreditar em mim.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio e pela bolsa concedida.



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

A gota é uma artrite inflamatória aguda causada pela deposição de cristais de urato monossódico nas articulações. A elevação do ácido úrico no sangue pode ser decorrente a vários fatores. As lactonas sesquiterpênicas são substâncias de ocorrência em espécies do gênero *Lychnophora* (arnica brasileira). O grupo de pesquisa do LAPLAMED/CiPharma/EF/UFOP vem trabalhando há alguns anos com as lactonas sesquiterpênicas e reuniu volume considerável de dados que justificam a seleção destas substâncias como candidatas ao desenvolvimento de fármacos antigota. Estudos prévios realizados por este grupo demonstraram que licnofolida, eremantolida C e goiazensolida promoveram a redução das concentrações séricas de ácido úrico em camundongos Swiss. Entretanto, o mecanismo de ação para a atividade anti-hiperuricêmica não foi totalmente elucidado. A inflamação nas articulações gera um estresse oxidativo nas células de defesa, liberando mediadores pró-inflamatórios. O controle terapêutico da gota consiste em tratar as crises inflamatórias agudas e reduzir os níveis séricos de ácido úrico. Há um número limitado de medicamentos utilizados na prática clínica da gota e eles possuem efeitos adversos severos. Novas opções terapêuticas são necessárias para o tratamento desta patologia. Objetivando avaliar os mecanismos pelos quais as lactonas sesquiterpênicas exercem as ações farmacológicas descritas, o presente estudo avaliou a ação anti-hiperuricêmica, uricosúrica e de inibição da xantina oxidase de licnofolida, eremantolida C e goiazensolida em ratos Wistar além da ação anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante em camundongos C57BL/6. A metodologia do primeiro modelo animal consistiu em tratar ratos hiperuricêmicos com os medicamentos usados clinicamente no tratamento da gota e com as lactonas sesquiterpênicas. O ácido úrico foi dosado no sangue e urina dos ratos, e o fígado retirado para dosagem da atividade residual da enzima xantina oxidase hepática. As lactonas sesquiterpênicas apresentaram atividade anti-hiperuricêmica nas doses de 5 e 10 mg/kg, e ação uricosúrica e/ou inibitória da atividade da xantina oxidase hepática, dependendo da dose. A ação uricosúrica de goiazensolida e licnofolida foi observada na dose de 5 mg/kg. Goiazensolida e licnofolida na dose de 10 mg/kg demonstraram efeitos uricosúricos e de inibição da xantina oxidase, assim como a eremantolida C nas doses de 5 e 10 mg/kg. No segundo modelo experimental, camundongos da

linhagem C57BL/6 com artrite induzida por MSU na articulação tibiofemoral foram tratados com indometacina e a vitamina C como controles anti-inflamatório e antioxidante, respectivamente, além das lactonas sesquiterpênicas. A nocicepção foi avaliada antes e após a indução da inflamação e tratamento. O líquido articular foi removido para análise da migração de neutrófilos e o tecido periarticular removido para dosagem das enzimas SOD e CAT; além das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . As três lactonas sesquiterpênicas foram eficazes como antinociceptivas e antioxidantes. O efeito anti-inflamatório ocorreu devido a inibição da migração de neutrófilos e inibição da produção de TNF- $\alpha$ . Sendo assim, licnofolida, eremantolida C e goiazensolida são candidatas promissoras para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da inflamação, hiperuricemia e gota.

## ABSTRACT

Gout is an acute inflammatory arthritis caused by monosodium urate crystals' deposition on joints. The increase of blood uric acid levels might be due to several factors. Sesquiterpene lactones are compounds that occur in *Lychnophora* genus' species (arnica brasiliensis). The study group from LAPLAMED/CiPharma/EF/UFOP has been working for some time with sesquiterpene lactones and collected considerable data that justifies those compounds selection as candidates to gout drugs' development. Previous studies made by this group showed that lychnopholide, eremantholide C and goyazensolide promoted decrease in serum uric acid concentrations on Swiss mice. However, the anti-hyperuricemic mechanism of action was not entirely elucidated. Joint inflammation causes oxidative stress on defense cells, releasing pro-inflammatory mediators. Gout therapy control consists on treating acute inflammatory crisis and on reducing serum uric acid levels. There is a restricted number of drugs used in clinical practice of gout and they show several side effects. New therapeutic options are needed to treat that pathology. Aiming the evaluation of mechanisms which those sesquiterpene lactones exert the pharmacological actions described, the present study evaluated the anti-hyperuricemic, uricosuric and xanthine oxidase inhibition actions of lychnopholide, eremantholide C and goyazensolide on Wistar rats, furthermore the anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant actions on C57BL/6 mice. The first animal model methodology consisted in treating hyperuricemic rats with the clinical used gout drugs and with the sesquiterpene lactones. Uric acid was dosed on blood and urine, and liver was taken off to xanthine oxidase liver enzyme residual activity dosage. The sesquiterpene lactones presented anti-hyperuricemic activity on 5 and 10 mg/kg doses, and uricosuric and/or liver xanthine oxidase inhibition activity on a dose-dependent manner. It was observed uricosuric action of goyazensolide and lychnopholide at 5 mg/kg dose. Goyazensolide and lychnopholide at 10 mg/kg dose showed uricosuric effects and xanthine oxidase inhibition, as well as eremantholide C at 5 and 10 mg/kg doses. At the second animal experimental model, C57BL/6 mice with arthritis induced by MSU on tibiofemoral joint were treated with NSAID indomethacin and vitamin C as antioxidant control, besides the sesquiterpene lactones. Nociception was evaluated before and after inflammation induction and treatment. Joint fluid was collected to analyse neutrophils' migration and

periarticular tissue removed to SOD and CAT enzymes' dosage; besides the IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokines dosage. All three lactones were effective as antinociceptive and antioxidant. Anti-inflammatory effect occurred due to inhibition of neutrophil migration and due to inhibition of TNF- $\alpha$  synthesis. Therefore, lychnopholide, eremantholide C and goyazensolide are promising candidates to drugs' development for hyperuricemia and gout treatment.

## LISTAS DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AU	Ácido úrico
CAT	Catalase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.p.m.	Erro padrão da média
Hex	Hexano
hOAT4	Transportador de ânions orgânicos 4
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LT1	Fração acetato de etila:hexano (1:1) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de <i>Lychnophora trichocarpa</i>
LT2	Fração acetato de etila:hexano (1:4) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico de LT1
LT3	Fração acetato de etila:hexano (1:3) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico de LT2
LT4	Fração acetato de etila:hexano (1:4) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico de LT3
LT5	Fração acetato de etila:hexano (1:4) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico de LT4
LT6	Fração acetato de etila:hexano (1:4) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico de LT5
LT7	Fração acetato de etila:hexano (1:4) obtida anteriormente do fracionamento cromatográfico de LT6
MSU	Urato monossódico
n	Número de elementos de uma amostra
OP	Oxonato de potássio

PF	Ponto de fusão
p/v	Peso/volume
Rf	Fator de retenção
SOD	Superóxido dismutase
URAT1	Trocador de ânion urato renal 1
UV	Ultravioleta
XOD	Xantina oxidase

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fracionamento cromatográfico de LT1.....	14
<b>Tabela 2.</b> Fracionamento cromatográfico de LT2.....	15
<b>Tabela 3.</b> Fracionamento cromatográfico de LT3.....	16
<b>Tabela 4.</b> Fracionamento cromatográfico de LT6.....	18
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H de LT7 (400 MHz) e de licnofolida (270 MHz, BOHLMANN et al., 1980) em CDCl <sub>3</sub> , δ (ppm), J (Hz).....	20
<b>Tabela 6.</b> Dados de δ (ppm) do RMN de <sup>13</sup> C de licnofolida a 100 MHz em CDCl <sub>3</sub> (VICHNEWISK et al., 1989), e LT7 a 100 MHz em CDCl <sub>3</sub> .....	28
<b>Tabela 7.</b> Efeitos das lactonas sesquiterpênicas e dos controles positivos: benzbromarona, probenecida e alopurinol na ingestão de água, excreção de urina, excreção de ácido úrico e concentração sérica de ácido úrico em ratos Wistar hiperuricêmicos.....	45
<b>Tabela 8.</b> Efeitos das lactonas sesquiterpênicas e do alopurinol sobre a atividade da xantina oxidase hepática em ratos Wistar hiperuricêmicos.....	47
<b>Tabela 9.</b> Hipernocicepção dos animais representada pela % de variação da pressão na pata (gramas) do limiar de estímulo entre os tempos 0h e 6h após inflamação induzida por injeção intra-articular de MSU e tratamento com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	62
<b>Tabela 10.</b> Contagem de leucócitos totais e neutrófilos/mL no lavado articular de animais com inflamação induzida por MSU tratados com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	68
<b>Tabela 11.</b> Concentração de IL-1β no homogenato do tecido periarticular de animais com inflamação induzida por MSU tratados com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	70
<b>Tabela 12.</b> Concentração de TNF-α no homogenato do tecido periarticular de animais com inflamação induzida por MSU tratados com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	71
<b>Tabela 13.</b> Valores de unidades de SOD por miligrama de proteínas totais e unidades de CAT por miligrama de proteínas totais, além da relação SOD/CAT para avaliação do estresse oxidativo no homogenato de camundongos C57BL/6 com inflamação articular induzida por MSU, tratados com vitamina C e as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses.....	74



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tofo gotoso causado pelo acúmulo de cristais de MSU nas articulações.....	3
<b>Figura 2.</b> Catabolismo dos nucleotídeos purínicos.....	4
<b>Figura 3.</b> Rota biossintética de algumas lactonas sesquiterpênicas.....	8
<b>Figura 4.</b> CCD das frações 56-61 de LT1.....	15
<b>Figura 5.</b> CCD do padrão de licnofolida e de LT5 utilizando como eluente $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (50:50) e revelada com sulfato cérico.....	17
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	20
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região $\delta$ 6,25-6,00.....	21
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região $\delta$ 5,75-5,30.....	21
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região $\delta$ 4,55-4,50.....	22
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região $\delta$ 3,65 - 3,76.....	22
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região $\delta$ 2,25 - 2,50.....	23
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão nas regiões $\delta$ 1,86 - 1,90 e $\delta$ 2,06 - 2,10.....	23
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão nas regiões $\delta$ 1,77 -1,80 e de $\delta$ 1,52 -1,59.....	24
<b>Figura 14.</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de LT7.....	24
<b>Figura 15.</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ com expansão na região $\delta$ 1,5-6,4 x $\delta$ 5,01-6,27.....	25
<b>Figura 16.</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ com expansão na região $\delta$ 4,22-4,74 x $\delta$ 1,8-4,8.....	26
<b>Figura 17.</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ com expansão na região $\delta$ 3,91-3,44 x $\delta$ 3,5-6,5.....	26
<b>Figura 18.</b> Mapa de contornos COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ com expansão na região $\delta$ 2,63-2,23 x $\delta$ 2,17-2,59.....	27
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	29
<b>Figura 20.</b> Subespectro DEPT de LT7.....	29

<b>Figura 21.</b> Mapa de contornos HSQC de LT7.....	30
<b>Figura 22.</b> Expansão entre as regiões $\delta$ 5,35-6,27 (RMN $^1\text{H}$ ) e $\delta$ 100-141 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.....	31
<b>Figura 23.</b> Expansão entre as regiões $\delta$ 3,63-5,49 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 45-85 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.....	32
<b>Figura 24.</b> Expansão entre as regiões $\delta$ 2,20-2,55 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 30-57 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.....	32
<b>Figura 25.</b> Expansão entre as regiões $\delta$ 1,48-2,17 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 14,7-21,5 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.....	33
<b>Figura 26.</b> HMBC de LT7 com expansão entre as regiões $\delta$ 6,55-5,94 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 42-172 (RMN $^{13}\text{C}$ ).....	34
<b>Figura 27.</b> HMBC de LT7 com expansão entre as regiões $\delta$ 6,139-6,030 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 0-220 (RMN $^{13}\text{C}$ ).....	35
<b>Figura 28.</b> HMBC de LT7 com expansão entre as regiões $\delta$ 5,75-5,68 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 0-220 (RMN $^{13}\text{C}$ ).....	35
<b>Figura 29.</b> HMBC de LT7 com expansão entre as regiões $\delta$ 5,54-5,37 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 0-220 (RMN $^{13}\text{C}$ ).....	36
<b>Figura 30.</b> HMBC de LT7 com expansão entre as regiões $\delta$ 2,58-2,26 (RMN $^1\text{H}$ ) x $\delta$ 0-220 (RMN $^{13}\text{C}$ ).....	36
<b>Figura 31.</b> Esquema da avaliação da atividade anti-hiperuricêmica, uricosúrica e de inibição da xantina oxidase hepática (XOD) das lactonas sesquiterpênicas.....	41
<b>Figura 32.</b> Curva de calibração do ácido úrico.....	43
<b>Figura 33.</b> Concentrações séricas de ácido úrico em ratos hiperuricêmicos após os tratamentos com as lactonas sesquiterpênicas, alopurinol, probenecida e benzbromarona.....	44
<b>Figura 34.</b> Excreção de ácido úrico após o tratamento de ratos hiperuricêmicos com as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses e com os controles positivos usados clinicamente, probenecida e benzbromarona.....	46
<b>Figura 35.</b> Animais posicionados nas caixas de acrílico para o teste de pressão crescente na pata.....	53
<b>Figura 36.</b> Teste de pressão crescente na pata de camundongos (von Frey).....	53
<b>Figura 37.</b> Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	57
<b>Figura 38.</b> Curva padrão de proteínas totais.....	59

<b>Figura 39.</b> Esquema da avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-artrite e antioxidante em camundongos C57BL/6.....	61
<b>Figura 40.</b> Efeitos induzidos pelas lactonas sesquiterpênicas devido ao estímulo no tempo 0h e 6h após inflamação induzida por injeção intra-articular de MSU.....	63
<b>Figura 41.</b> Gráficos obtidos por análises utilizando o software FlowJo com a amostra sem o marcador para a definição do branco.....	65
<b>Figura 42.</b> Gráficos obtidos por análises utilizando o software FlowJo com uma amostra contendo o marcador para neutrófilos (Ly6-G).....	67
<b>Figura 43.</b> Contagem de neutrófilos no lavado intra-articular de camundongos C57BL/6 com inflamação induzida, após o tratamento com a indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	68
<b>Figura 44.</b> Curva padrão de IL-1 $\beta$ .....	69
<b>Figura 45.</b> Concentração de IL-1 $\beta$ no homogenato do tecido periarticular de camundongos C57BL/6 com inflamação induzida, após o tratamento com a indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	70
<b>Figura 46.</b> Curva padrão de TNF- $\alpha$ .....	71
<b>Figura 47.</b> Concentração de TNF- $\alpha$ no homogenato do tecido periarticular de camundongos C57BL/6 com inflamação induzida, após o tratamento com a indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.....	72
<b>Figura 48.</b> Unidades de SOD/miligramas de proteínas totais dos grupos controle normal e com inflamação induzida por MSU, tratados com vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses.....	75
<b>Figura 49.</b> Unidades de CAT/miligramas de proteínas totais dos grupos controle normal e com inflamação induzida por MSU, tratados com vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses.....	75
<b>Figura 50.</b> Relação SOD/CAT dos grupos controle normal e com inflamação induzida por MSU, tratados com vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses.....	76

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Hiperuricemia e gota.....	2
2.2. Tratamento da hiperuricemia e gota.....	5
2.3. Plantas medicinais no tratamento da hiperuricemia, gota e inflamações .....	5
2.4. Lactonas sesquiterpênicas .....	7
3. JUSTIFICATIVA .....	11
4. OBJETIVOS .....	12
4.1. Gerais .....	12
4.2. Específicos .....	12
5. OBTENÇÃO DA LACTONA SESQUITERPÊNICA LICNOFOLIDA .....	13
5.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
5.1.1. Equipamentos, Reagentes e Solventes .....	13
5.1.2. Isolamento da licnofolida.....	13
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
6. AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTI-HIPERURICÊMICA: ATIVIDADE URICOSÚRICA E DE INIBIÇÃO DA XANTINA OXIDASE.....	37
6.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
6.1.1. Reagentes, solventes, medicamentos e equipamentos.....	37
6.2. Preparo das soluções .....	37
6.2.1. Solução de oxonato de potássio.....	37
6.2.2. Solução de ácido úrico .....	37
6.2.3. Benzbromarona, Probenecida e Alopurinol .....	38
6.2.4. Licnofolida, Eremantolida C e Goiazensolida .....	38
6.2.5. Tampão Fosfato 50 mM.....	38
6.2.6. Reagente de Bradford .....	38
6.2.7. Solução de oxonato de potássio 1 mM.....	39
6.2.8. Solução de xantina 250 µM .....	39
6.2.9. HCl 0,6 M .....	39
6.3. Animais .....	39
6.4. Avaliação da atividade anti-hiperuricêmica.....	39
6.5. Avaliação da atividade de inibição da xantina oxidase .....	41
6.5.1. Dosagem de proteínas totais.....	42
6.5.2. Avaliação da atividade residual da xantina oxidase hepática .....	42

6.6. Análise estatística .....	43
6.7. Resultados.....	43
6.7.1. Dosagem do ácido úrico sérico.....	43
6.7.2. Excreção de ácido úrico .....	44
6.7.3. Inibição da xantina oxidase .....	46
6.8. Discussão .....	47
<b>7. AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-ARTRITE GOTOSA.....</b>	<b>49</b>
7.1. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
7.1.1. Reagentes, solventes, material e equipamentos .....	49
7.1.2. Preparo das soluções .....	50
7.2. Animais .....	51
7.3. Avaliação da atividade antinociceptiva: teste de pressão crescente na pata de camundongos (filamentos de von Frey).....	51
7.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa.....	54
7.4.1. Contagem de neutrófilos .....	54
7.4.2. Dosagem da citocina IL-1 $\beta$ .....	54
7.4.3. Dosagem da citocina TNF- $\alpha$ .....	55
7.5. Avaliação das defesas antioxidantes .....	56
7.5.1. Preparo dos homogenatos .....	57
7.5.2. Dosagem de proteínas totais.....	57
7.5.3. Dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD) .....	59
7.5.4. Dosagem da enzima catalase (CAT) .....	60
7.6. Análise estatística .....	61
7.7. Resultados.....	61
7.7.1. Atividade antinociceptiva .....	61
7.7.2. Atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa .....	64
7.7.3. Avaliação das defesas antioxidantes .....	73
7.8. Discussão .....	78
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>83</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>
10.1. Certificado de aprovação do protocolo ceua 2016/54 .....	94

## 1. INTRODUÇÃO

A evolução do homem permitiu que houvesse um rápido crescimento na pesquisa em diversos aspectos. Na área médica, essa pesquisa envolve uma busca por uma qualidade de vida melhor e por um aumento na expectativa de vida. Medicamentos e vacinas vêm sendo desenvolvidos para este propósito, muitos deles a partir de produtos naturais (BRUSOTTI et al., 2014). A pesquisa fitoquímica baseada na etnofarmacologia tem se mostrado extremamente eficaz para a descoberta de novas substâncias com efeitos farmacológicos e seus mecanismos de ação. A biodiversidade é uma fonte ilimitada de compostos químicos capazes de se tornarem fármacos. Existem diversas técnicas de separação e purificação desses compostos a fim de se obter um maior rendimento e eficácia na separação (BRUSOTTI et al., 2014). 6% dos 877 novos medicamentos produzidos entre 1981 e 2002 são classificados como produtos naturais, e 27% são compostos sintetizados a partir de produtos naturais, demonstrando a importância dessas substâncias para a indústria farmacêutica (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Plantas brasileiras vêm sendo estudadas cada vez mais ao longo dos anos, demonstrando seus potenciais biológicos trazendo alternativas para o tratamento de doenças como a hiperuricemia e a gota. Como por exemplo a *Campomanesia velutina*, conhecida popularmente como gabiroba, cujo extrato etanólico foi eficaz no tratamento de camundongos hiperuricêmicos. Substâncias isoladas deste extrato também demonstraram promissor efeito farmacológico (ARAÚJO et al., 2016). Outras substâncias isoladas de plantas brasileiras como a *Pimenta pseudocaryophyllus* e a *Tabebuia roseoalba*, demonstraram ação anti-hiperuricêmica e anti-inflamatória (FERRARI et al., 2016; FERRAZ-FILHA et al., 2017). O gênero *Lychnophora* possui diversas espécies com uma ampla gama de compostos a serem estudados. Extratos obtidos de espécies do gênero *Lychnophora* demonstraram efeitos anti-inflamatório e anti-hiperuricêmico. As lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Lychnophora* demonstraram potencial sobre a inflamação e hiperuricemia. (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; DE SOUZA et al., 2012; UGOLINE et al., 2017).

Com isso, há a necessidade do estudo de lactonas sesquiterpênicas isoladas de extratos de *Lychnophora* a fim de avaliar a atividade biológica na hiperuricemia, inflamação e nocicepção.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Hiperuricemia e gota

O aumento dos níveis de ácido úrico sérico, condição conhecida como hiperuricemia, é um fator de risco para diversas doenças. A hiperuricemia causa o acúmulo e depósito de urato nas articulações, provocando a artrite gotosa, que é uma doença inflamatória muito dolorida (BARDIN e RICHETTE, 2014) sendo a mais comum entre as que acometem as articulações em homens acima de 40 anos (SAAG e MIKULS, 2005). A maioria dos pacientes com gota possuem níveis elevados de ácido úrico no sangue e uma porcentagem relevante (10%) dos pacientes com hiperuricemia manifestam a gota (SMITH et al., 2010). A prevalência de hiperuricemia é alta em pacientes com síndrome metabólica, que é o conjunto de fatores de risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade. Hiperuricemia pode ser originada pelo aumento da produção de ácido úrico no sangue, pela diminuição de sua excreção, ou pelas duas vias. Essa condição pode ser causada devido a desordens no metabolismo de purinas (PUIG e MARTINEZ, 2008). Quando o limite fisiológico de solubilidade de urato é alcançado, pode haver a formação e precipitação de cristais de monourato de sódio (MSU) nas articulações criando tofos gotosos (**Figura 1**, página 3). Os cristais de MSU estimulam a resposta imunológica provocando a liberação de citocinas que medeiam e regulam a resposta inflamatória. Além disso, ativam o complexo proteico inflamassoma nos monócitos, resultando na produção e liberação de IL-1 $\beta$  ativa (KRISHNAN, 2010).

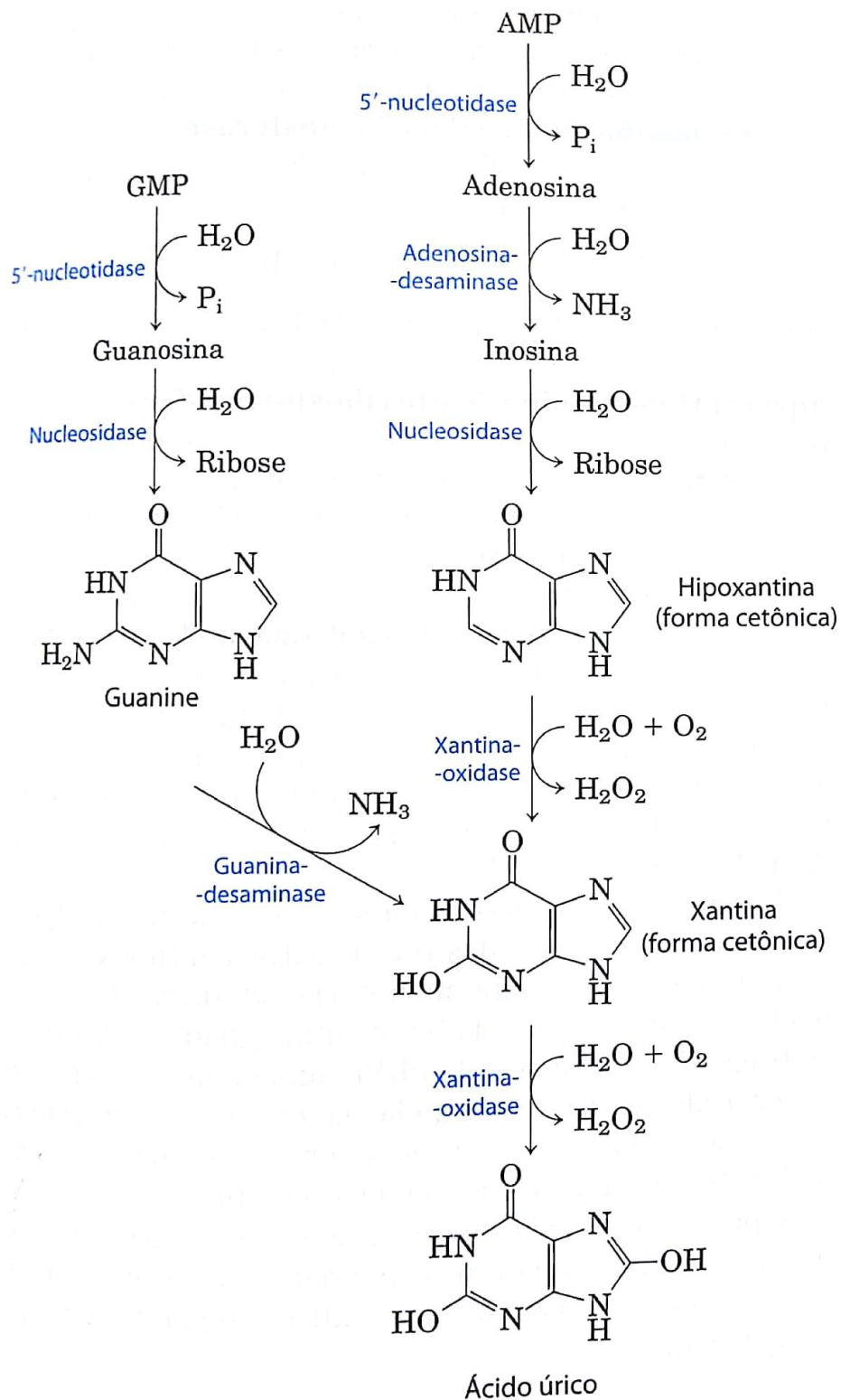


**Figura 1.** Tofo gotoso causado pelo acúmulo de cristais de MSU nas articulações.

Fonte: Neri (2011)

A xantina oxidase (XOD) é a enzima que catalisa a reação de síntese de ácido úrico a partir de hipoxantina e xantina, nas últimas etapas do metabolismo de purinas (**Figura 2**, página 4). Na maioria dos mamíferos, o ácido úrico é metabolizado, pela ação da enzima hepática uricase, a alantoína, que é facilmente excretada na urina. A uricase não está presente nos humanos devido a inativação do gene responsável pela sua síntese, ocorrida no processo de evolução dos primatas. Os mamíferos que possuem a uricase e excretam a alantoína normalmente possuem uma concentração sérica de ácido úrico menor (<2 mg/dL) do que os humanos (>2 mg/dL) (JOHNSON et al., 2003). O urato, forma solúvel do ácido úrico, é um potente antioxidante em ambiente extracelular, capturando radicais hidroxila, oxigênio singleto e peroxinitrito. O ácido úrico perde sua capacidade antioxidante em ambiente hidrofóbico podendo inclusive formar radicais livres (SAUTIN et al., 2007). O estudo realizado por Sautin e colaboradores (2007) demonstrou que o ácido úrico pode aumentar o estresse oxidativo em adipócitos fazendo com que haja a inibição da produção de óxido nítrico. O estudo sugere que a hiperuricemia pode ser um dos fatores que induzem o estresse oxidativo seguido do processo pró-inflamatório e disfunção endócrina no tecido adiposo. Reafirmam a contribuição do aumento sérico de ácido úrico na patogenia da síndrome metabólica.





**Figura 2.** Catabolismo dos nucleotídeos purínicos.

Fonte: NELSON e COX, 2014.

## **2.2. Tratamento da hiperuricemia e gota**

Inibidores da xantina oxidase, como o alopurinol, são muito utilizados no tratamento da hiperuricemia. O alopurinol, apesar de sua eficácia em reduzir os níveis séricos de ácido úrico, apresenta efeitos adversos como nefropatia, reações alérgicas (KONG et al., 2000) e hepatotoxicidade (MCINNES et al., 1981). Agentes uricosúricos aumentam a excreção do ácido úrico pelo bloqueio da reabsorção de urato no túbulo proximal renal, sendo outra opção de tratamento (AHMED et al., 2016). Exemplos de agentes uricosúricos utilizados na terapêutica são a benzbromarona e a probenecida, porém o uso é limitado já que a benzbromarona é proibida em alguns países europeus devido ao risco de causar hepatite fulminante (REINDERS et al., 2007) e a probenecida pode provocar urolitíase e outras complicações renais (MOHAMMAD et al., 2015). Os agentes uricosúricos probenecida, benzbromarona e sulfimpirazona inibem o transportador de ânions orgânicos 4 (hOAT4) e o trocador de ânion urato renal 1 (URAT1), impedindo assim a reabsorção de ácido úrico pelos rins e, conseqüentemente, diminuem os níveis de ácido úrico no plasma. Com uma menor concentração de ácido úrico sérico, os cristais formados nos tecidos e articulações são dissolvidos, diminuindo a longo prazo a formação de tofos gotosos causados pelo depósito de urato. Não há diferenças significativas relatadas em relação aos benefícios do tratamento com benzbromarona ou alopurinol. A benzbromarona possui menos efeitos adversos que a probenecida, levando a uma menor resistência dos pacientes ao tratamento. Não há estudos suficientes para comparar a eficácia entre agentes uricosúricos e inibidores de xantina oxidase (KYDD et al., 2013).

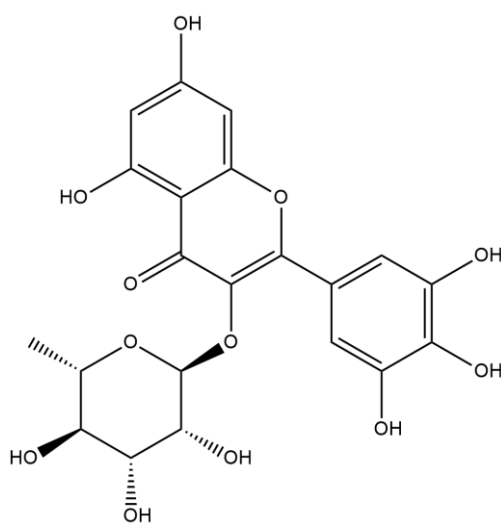
O tratamento anti-hiperuricêmico é importante para evitar crises agudas de gota e não deve ser descontinuado durante as crises. Na fase aguda da gota a abordagem terapêutica visa diminuir a dor e a inflamação com o uso de anti-inflamatórios como corticosteroides, colchicina ou anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (KHANNA et al., 2012).

## **2.3. Plantas medicinais no tratamento da hiperuricemia, gota e inflamações**

Plantas medicinais são usadas por populações do mundo todo para o tratamento e prevenção de diversas doenças, inclusive no Brasil (ALVES et al., 2000). O cerrado ocupa mais de dois milhões de quadrados do território brasileiro, e é composto por uma rica flora. As plantas pertencentes ao cerrado são utilizadas principalmente para tratar doenças

tropicais como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções por fungos e por bactérias (ALVES et al., 2000).

O uso de plantas medicinais pode ser alternativa para o tratamento da hiperuricemia e doenças relacionadas por serem excelente fonte de compostos bioativos. Plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa demonstraram ter efeitos hipouricêmicos. Extratos de *Cinnamomum cassia* (canela da China), *Chrysanthemum indicum* (crisântemo) e *Lycopus europaeus* (marroio-de-água) demonstraram efetiva inibição da enzima xantina oxidase (KONG et al., 2000). As plantas medicinais do Cerrado brasileiro também foram eficazes em diminuir a hiperuricemia. Os extratos aquoso e etanólico de *Campomanesia velutina*, coletada em Minas Gerais e comumente chamada de gabirobeira, reduziram níveis séricos de ácido úrico e inibiram XOD *in vitro* e *in vivo*. Além disso, estes mesmos extratos demonstraram ação anti-inflamatória no edema de pata induzido por MSU. A miricitrina, isolada de ambos extratos, também reduziu os níveis séricos de ácido úrico e inibiu a xantina oxidase hepática (ARAÚJO et al., 2016). A espécie *Pimenta pseudocaryophyllus*, nativa da Mata Atlântica e Cerrado brasileiro, conhecida popularmente como pau-cravo, é utilizada na medicina popular para o tratamento da artrite (PAULA et al., 2012; D'ANGELIS e NEGRELLE, 2014). Ferrari e colaboradores (2016) demonstraram a ação anti-hiperuricêmica dos extratos de *P. pseudocaryophyllus* pela ação uricosúrica e de inibição da xantina oxidase. Também foi demonstrada a ação anti-inflamatória dos extratos aquoso e etanólico e do extrato acetato etílico no edema de pata induzido por MSU (FERRARI et al., 2016). O extrato aquoso das folhas de *Tabebuia roseoalba* (ipê branco) e as substâncias isoladas deste extrato (ácido clorogênico e ácido cafeico) foram capazes de reduzir os níveis séricos de ácido úrico, inibiram a xantina oxidase e reduziram a inflamação no modelo de edema de pata induzido por MSU (FERRAZ-FILHA et al., 2017).

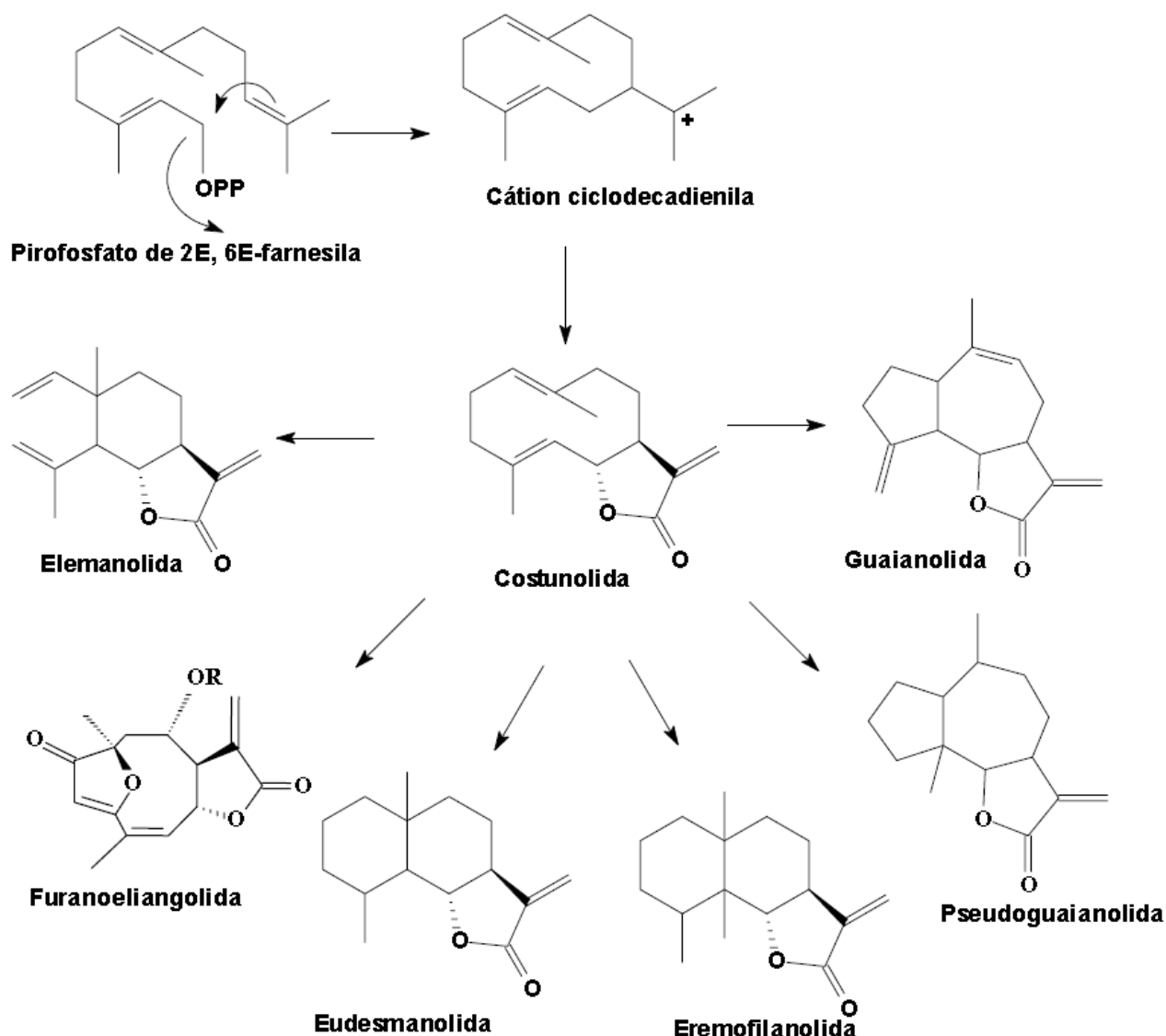


Miricitrina

Espécies do gênero *Lychnophora* (Asteraceae) são conhecidas como arnica e são usadas popularmente para tratar inflamação, dor, reumatismo e picadas de insetos (SAÚDE et al., 1998; CHAVES et al., 2015). Flavonoides, triterpenos e lactonas sesquiterpênicas foram isolados de diversas espécies do gênero *Lychnophora* (BOHLMANN e JAKUPOVIC, 1990). Os extratos etanólicos de *L. ericoides*, *L. pinaster*, *L. trichocarpha* e *L. passerina* apresentaram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelo de inflamação (edema de pata) induzido por carragenina (GOBBO-NETO E LOPES, 2007; GUZZO et al., 2008; DE SOUZA et al., 2012; FERRARI et al., 2013; UGOLINE et al., 2017). *L. trichocarpha*, *L. passerina* e *L. pinaster* também demonstraram efeitos sobre a hiperuricemia e edema de pata induzido por cristais de urato monossódico (DE SOUZA et al., 2012; UGOLINE et al., 2017; MÜLLER, 2017).

#### 2.4. Lactonas sesquiterpênicas

Os metabólitos secundários de plantas são essenciais em sua proteção contra agentes patogênicos. As lactonas sesquiterpênicas estão presentes em sua grande maioria na família Asteraceae e há mais de 5000 compostos conhecidos. São terpenóides formados em plantas pela via do ácido mevalônico (BRUNETON, 1995; THOLL, 2015), a partir de uma condensação do tipo cabeça-cauda de três unidades isoprênicas, seguida de ciclização e formação do grupo lactona (éster cíclico) que pode ter a conformação *cis* ou *trans*. São terpenóides incolores e estáveis, classificadas de acordo com o esqueleto carbocíclico, sendo as seguintes classes as mais comumente encontradas na natureza: germacranolidas (anel de 10 membros); eudesmanolidas (6/6-bicíclicos); e guaianolidas (5/7-bicíclicos) (**Figura 3**, página 8) (GHANTOUS et al., 2010). As atividades farmacológicas das lactonas sesquiterpênicas são pesquisadas há anos, e muitas dessas atividades são atribuídas ao grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona presente na molécula, que reage através de uma adição nucleofílica do tipo Michael a grupos sulfidril ou amino de proteínas (RODRIGUEZ et al., 1976). Estas atividades biológicas sofrem influência de três principais propriedades químicas das lactonas sesquiterpênicas: (1) reatividade do centro alquilante; (2) cadeia lateral e lipofilicidade; (3) geometria molecular e características eletrônicas (GHANTOUS et al., 2010).



**Figura 3.** Rota biossintética de algumas lactonas sesquiterpênicas.

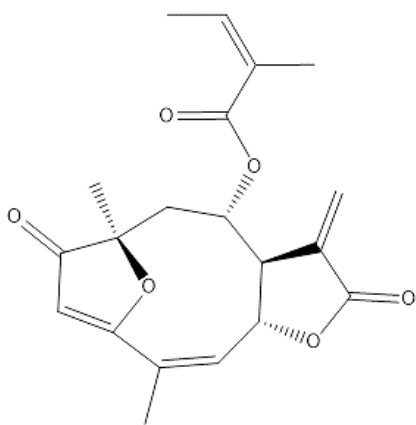
Fonte: BRUNETON, 1995; FERRARI, 2008.

A atividade tripanocida de lactonas sesquiterpênicas isoladas do gênero *Mikania* (*in vitro* e *in vivo*) (LAURELLA et al., 2017) e do gênero *Lychnophora* (*in vitro*) (DE OLIVEIRA et al., 1996) foi comprovada. Além disso, as lactonas sesquiterpênicas isoladas do gênero *Mikania* também demonstraram atividade anti-Leishmania, sendo a atividade anti-protozoária diretamente relacionada à porção lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada presente em suas estruturas (LAURELLA et al., 2017). Neste mesmo estudo foi demonstrada a capacidade dessas substâncias de estimular a produção de citocinas cruciais no processo inflamatório. A atividade anti-malária de lactonas sesquiterpênicas isoladas da espécie *Vernonia fimbriifera* Less. (Asteraceae) foi descrita por Bordignon e colaboradores (2018), sendo as

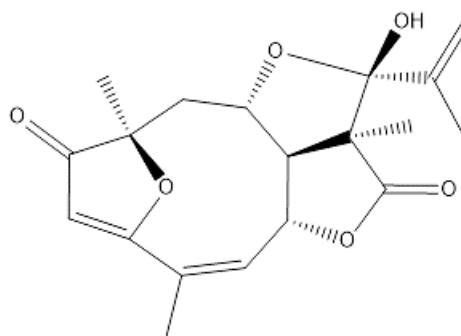
cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas cruciais nesta atividade devido a sua alta reatividade (rápidas adições do tipo Michael a grupos tióis livres).

A lactona sesquiterpênica artemisinina e seus derivados, além de importantes antimaláricos, estão em ensaios clínicos para o tratamento do câncer, assim como tapsigargina e partenólídeo (GHANTOUS et al., 2010). Além disso, estudos comprovaram também as atividades antiviral, antifúngica e antibacteriana de diversas lactonas sesquiterpênicas (CHATURVEDI et al., 2011).

Eremantolida C e licnofolida, lactonas sesquiterpênicas isoladas da espécie *Lychnophora trichocarpha*, demonstraram ação anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina (FERRARI et al., 2013). Testes *in vitro* realizados por Ferrari e colaboradores (2013) demonstraram que essas lactonas foram capazes de promover a produção de IL-10 em células J774.A1 estimuladas por LPS e INF- $\gamma$ . Eremantolida C também mostrou considerável inibição de TNF- $\alpha$ . Neste mesmo estudo, licnofolida promoveu a redução da produção de óxido nítrico por macrófagos J774, ação notável pois o NO produzido na inflamação causa danos aos tecidos endoteliais. De Souza e colaboradores (2012) comprovaram a ação hipouricêmica de licnofolida e eremantolida C, além de seus efeitos anti-inflamatórios sobre o edema de pata induzido por cristais de monourato de sódio.

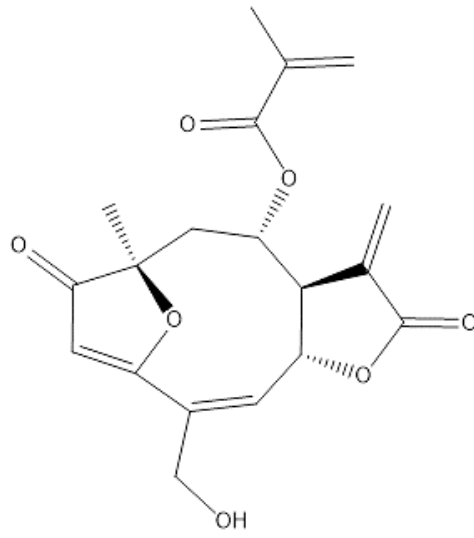


Licnofolida



Eremantolida C

A goiazensolida, lactona sesquiterpênica majoritária da espécie *Lychnophora passerina*, teve suas ações farmacológicas investigadas no modelo animal de hiperuricemia induzida por oxonato de potássio em camundongos Swiss e no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Demonstrou ser eficaz tanto no tratamento da inflamação quanto da hiperuricemia (UGOLINE et al., 2017).



Goiazensolida

### 3. JUSTIFICATIVA

Lactonas sesquiterpênicas estão presentes em 90% das espécies da subtribo *Lychnophorinae* (Asteraceae), a qual pertence o gênero *Lychnophora* (KELES et al., 2010). Em estudos realizados previamente, as lactonas sesquiterpênicas licnofolida e eremantolida C, isoladas de *Lychnophora trichocarpa* demonstraram ação anti-inflamatória em experimentos realizados com macrófagos J774A.1 estimulados por LPS. Também demonstraram atividade anti-inflamatória *in vivo* no edema de pata induzido por carragenina (FERRARI et al., 2013). A goiazensolida, lactona sesquiterpênica isolada de diversas espécies do gênero *Lychnophora*, é um importante marcador químico deste gênero (CHICARO et al., 2004). Extratos etanólicos de *L. passerina*, coletada nas quatro estações do ano, demonstraram atividades anti-inflamatória e anti-hiperuricêmica, sendo a goiazensolida uma das substâncias responsáveis por essas ações (UGOLINE et al., 2017). Licnofolida e eremantolida C, na dose de 25 mg/kg, foram capazes de reduzir as concentrações séricas de ácido úrico em camundongos Swiss e não foram capazes de inibir a atividade da xantina oxidase hepática. Os mecanismos pelos quais estas lactonas sesquiterpênicas produziram o efeito hiporuricêmico não foram elucidados (de SOUZA et al., 2012). Camundongos Swiss tratados com goiazensolida (10 mg/kg) tiveram as concentrações séricas de ácido úrico reduzidas pela inibição da atividade da XOD (UGOLINE et al., 2017).

A gota é uma artrite inflamatória que atinge de 1 a 4 % da população em países desenvolvidos, principalmente na América do Norte e Europa (KUO et al., 2015). A prevalência da doença é maior em homens, principalmente acima dos 75 anos (SMITH et al., 2014) e está diretamente relacionada a doenças cardiovasculares e renais e a síndrome metabólica (ABBOTT et al., 1988; YU et al., 2012; PUIG e MARTINEZ, 2008).

Devido a necessidade de novos fármacos com ações terapêuticas favoráveis aos tratamentos da hiperuricemia, inflamação e gota, é importante uma investigação mais aprofundada dos mecanismos de ação anti-hiperuricêmica da licnofolida, eremantolida C e goiazensolida, além da avaliação de seus efeitos no estresse oxidativo e na artrite gotosa.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Gerais**

Avaliação das atividades uricosúrica, antinociceptiva, antiartrite gotosa e no estresse oxidativo das lactonas sesquiterpênicas licnofolida, eremantolida C e goiazensolida.

### **4.2. Específicos**

- I. Isolar da espécie *Lychnophora trichocarpha* e caracterizar a lactona sesquiterpênica licnofolida;
- II. Avaliar o efeito uricosúrico e a atividade de inibição da xantina oxidase hepática das lactonas sesquiterpênicas;
- III. Avaliar os efeitos das lactonas sesquiterpênicas sobre a artrite gotosa, inflamação e nocicepção induzidas;
- IV. Avaliar os efeitos das lactonas sesquiterpênicas sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) na cartilagem de camundongos C57BL/6 com artrite gotosa induzida.

## 5. OBTENÇÃO DA LACTONA SESQUITERPÊNICA LICNOFOLIDA

A eremantolida C (sólido branco, PF 214-215 °C, acetato de etila) foi previamente isolada do extrato etanólico de *Lychnophora trichocarpa*, como descrito por Saúde-Guimarães e colaboradores (2014). A goiazensolida (sólido branco, PF 168,7-169,5 °C, clorofórmio) foi previamente isolada do extrato clorofórmico de *Lychnophora passerina*, como descrito por Ugoline e colaboradores (2017). As lactonas previamente isoladas no Laboratório de Plantas Medicinais (LAPLAMED) foram fornecidas pela professora Dênia Antunes Saúde Guimarães para serem utilizadas nos experimentos. A licnofolida usada neste trabalho foi obtida a partir do extrato etanólico de *L. trichocarpa* de acordo com a metodologia descrita a seguir.

### 5.1. MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1.1. Equipamentos, Reagentes e Solventes

Hexano P.A. (Neon), acetato de etila P.A. (Qhemis), diclorometano P.A. (Qhemis), sílica gel 60 (Merck) 0,063-0,200 mm, sílica gel 60 (Merck) 0,040-0,063 mm, balanças Shimadzu e Quimis, Medidor de ponto de fusão M-560 Buchi, evaporador rotativo R-210 (Buchi), espectrofotômetro Varian, cromatógrafo Isolera (Biotage).

#### 5.1.2. Isolamento da licnofolida

##### 5.1.2.1. Material vegetal

A fração LT1 de onde foi obtida a licnofolida é proveniente do extrato clorofórmico das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa* Spreng. coletadas em julho de 2015, em Ouro Preto, MG. As exsiccatas da espécie vegetal encontram-se depositadas no herbário do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP, com o número de referência 20635.

O extrato clorofórmico (165,24 g) foi submetido à cromatografia em coluna de filtração em sílica gel utilizando hexano, acetato de etila e metanol como eluentes, em ordem crescente de polaridade. Os solventes das frações obtidas foram evaporados sob pressão reduzida em rotaevaporador originando as frações hexânica, hexânica:acetato etílico (90:10), hexânica:acetato etílico (80:20), hexânica:acetato etílico (50:50) e

metanólica. Na fração hexânica:acetato etílica (90:10) foi detectada, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a presença da licnofolida. Esta fração foi denominada LT1.

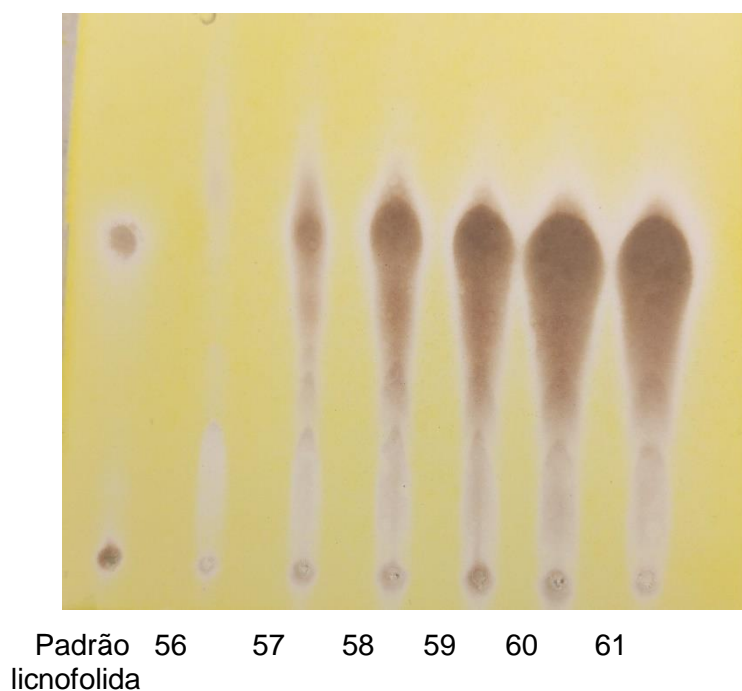
### 5.1.2.2. Fracionamento cromatográfico de LT1

A fração acetato etílica:hexano (1:1), LT1, peso 46,50 g, foi submetida a cromatografia em coluna preparada com fase estacionária sílica gel e eluída com fases móveis obtidas de misturas de hexano (hex) e acetato de etila (AcOEt) em polaridades crescentes.

**Tabela 1.** Fracionamento cromatográfico de LT1.

<b>Eluente</b>	<b>Frações</b>
<b>Hexano 100%</b>	1-15
<b>Hex:AcOEt (95:5)</b>	16-26
<b>Hex:AcOEt (90:10)</b>	27-33
<b>Hex:AcOEt (85:15)</b>	34-40
<b>Hex:AcOEt (80:20)</b>	41-87
<b>Hex:AcOEt (75:25)</b>	88-93
<b>Hex:AcOEt (70:30)</b>	94-117
<b>Hex:AcOEt (65:35)</b>	118-123
<b>Hex:AcOEt (60:40)</b>	124-129
<b>Hex:AcOEt (55:45)</b>	130-135
<b>AcOEt 100%</b>	136-147

As frações obtidas de LT1 foram monitoradas por CCD, utilizando o sulfato cérico como revelador. As frações foram agrupadas de acordo com a presença de mancha branca, antes do aquecimento a 100°C, e mancha marrom, após aquecimento a 100°C, características da licnofolida, e pelo R<sub>f</sub> semelhante ao do padrão (frações 57 a 96, **Figura 4**, página 15), e foram denominadas LT2. LT2 mostrou conter outras substâncias, além de lactonas sesquiterpênicas, levando à condução de novas colunas a fim de obter a completa purificação da licnofolida.



**Figura 4.** CCD das frações 56-61 de LT1.

### 5.1.2.3. Fracionamento cromatográfico de LT2

A coluna foi preparada com sílica gel como fase estacionária e 7,8 g de LT2 e eluída com hexano:acetato de etila em polaridade crescente.

**Tabela 2.** Fracionamento cromatográfico de LT2.

Eluente	Frações
Hexano 100%	1-6
Hex:AcOEt (95:5)	7-12
Hex:AcOEt (90:10)	13-24
Hex:AcOEt (85:15)	25-31
Hex:AcOEt (80:20)	32-39
Hex:AcOEt (75:25)	40-65
Hex:AcOEt (70:30)	66-71

As frações foram monitorados por CCD (eluente Hex:AcOEt, revelador sulfato cérico) e comparadas com o padrão de licofolida. As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram agrupadas. As frações 37-59 demonstraram conter a licofolida por apresentarem mancha branca, antes do aquecimento a 100°C, e mancha, após aquecimento a 100°C, com o mesmo Rf do padrão, porém, também foram observadas

outras substâncias, indicando que a amostra estava impura. Estas frações foram reunidas e denominadas LT3.

#### 5.1.2.4. Fracionamento cromatográfico de LT3

LT3 (6,7 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico de sílica gel utilizando como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em polaridade crescente.

**Tabela 3.** Fracionamento cromatográfico de LT3.

<b>Eluente</b>	<b>Frações</b>
Hexano 100%	1-7
Hex:AcOEt (95:5)	8-14
Hex:AcOEt (90:10)	15-26
Hex:AcOEt (85:15)	27-32
Hex:AcOEt (80:20)	33-51
Hex:AcOEt (75:25)	52-75
Hex:AcOEt (70:30)	76-81

As frações 39-49 apresentaram-se como um sólido branco e a CCD (eluente Hex:AcOEt, revelador sulfato cérico) apresentou apenas uma mancha com o mesmo perfil cromatográfico do padrão licnofolida, porém a avaliação por CCD utilizando diferentes eluentes mostrou outras manchas, de coloração roxa, indicando que a licnofolida ainda não estava pura. As frações 39-49 foram reunidas e denominadas LT4.

#### 5.1.2.5. Fracionamento cromatográfico de LT4

LT4 (3,8 g) foi submetida a fracionamento em cromatografia flash (cromatografia de média pressão) de sílica gel.

O eluente para cromatografia flash foi escolhido por avaliação de LT4 por CCD com diferentes proporções de Hex:AcOEt e comparação com o padrão da licnofolida. O eluente mais adequado encontrado foi Hex:AcOEt (80:20).

Do fracionamento cromatográfico de LT4 foram obtidas 137 frações, monitoradas por CCD, as quais foram reunidas pela semelhança de perfil cromatográfico. As frações 47-82

apresentaram Rf semelhante ao do padrão de licnofolida. Estas foram reunidas e denominadas LT5 (2,3 g).

LT5 foi analisada por CCD (revelador sulfato cérico), utilizando diferentes eluentes [acetona:tolueno (10:90),  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt (50:50),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt (50:50)] que revelaram apenas uma mancha de coloração marrom de mesmo Rf que o padrão, característica da licnofolida (**Figura 5**, página 17).



**Figura 5.** CCD do padrão de licnofolida e de LT5 utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt (50:50) e revelada com sulfato cérico.

A análise do ponto de fusão de LT5 mostrou uma faixa de fusão de 125,4-129,2 °C, próximo ao descrito pela literatura (128-129 °C) para licnofolida. Porém, a ampla faixa de fusão sugere que a amostra ainda não se encontrava pura.

#### **5.1.2.6. Fracionamento cromatográfico de LT5**

LT5 (2,3 g) foi submetida a fracionamento em cromatografia flash no aparelho Isolera – Biotage, que é um sistema automatizado de purificação. Utilizou-se coluna de fase normal (Biotage Snap Cartridge KP Sil 100 g) e foi feita eluição gradiente com hexano e acetato de

etila em polaridades crescentes. 46 frações originadas desse processo foram analisadas por CCD (revelador sulfato cérico) e as frações 34-38, denominadas LT6, mostraram manchas marrom de mesmo Rf que o padrão de licnofolida. Porém, ao revelar a placa de CCD com anisaldeído sulfúrico, outras manchas também apareceram, sugerindo que a amostra não estava pura.

#### 5.1.2.7. Fracionamento cromatográfico de LT6

LT6 (frações 34-38 de LT5, 1,7 g) foi submetida a fracionamento em cromatografia de coluna utilizando a sílica flash, utilizando o eluente em polaridades crescentes.

**Tabela 4.** Fracionamento cromatográfico de LT6.

<b>Eluente</b>	<b>Frações</b>
Hexano 100%	1-3
Hex:AcOEt (98:2)	4-10
Hex:AcOEt (95:5)	11-22
Hex:AcOEt (90:10)	23-53
Hex:AcOEt (85:15)	54-75
Hex:AcOEt (80:20)	76-82
Hex:AcOEt (75:25)	82-91

As frações foram monitoradas por CCD em comparação com o padrão (reveladores sulfato cérico e anisaldeído sulfúrico) e as frações 62-64 (sólido branco, 317 mg) foram reunidas (LT7) pois observou-se apenas uma mancha semelhante ao do padrão, sugerindo que a amostra pode ser a licnofolida. LT7 foi submetida à análise por ressonância magnética nuclear para confirmação da suspeita dessa amostra ser a licnofolida.

## 5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de LT7 foram obtidos no espectrofotômetro Bruker 400 MHz do Laboratório Multiusuário do PPG CiPharma na Universidade Federal de Ouro Preto. O clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) foi usado como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As constantes de acoplamento

(J) foram calculadas em Hertz (Hz) a partir dos sinais e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm) e estes foram comparados com os dados da literatura.

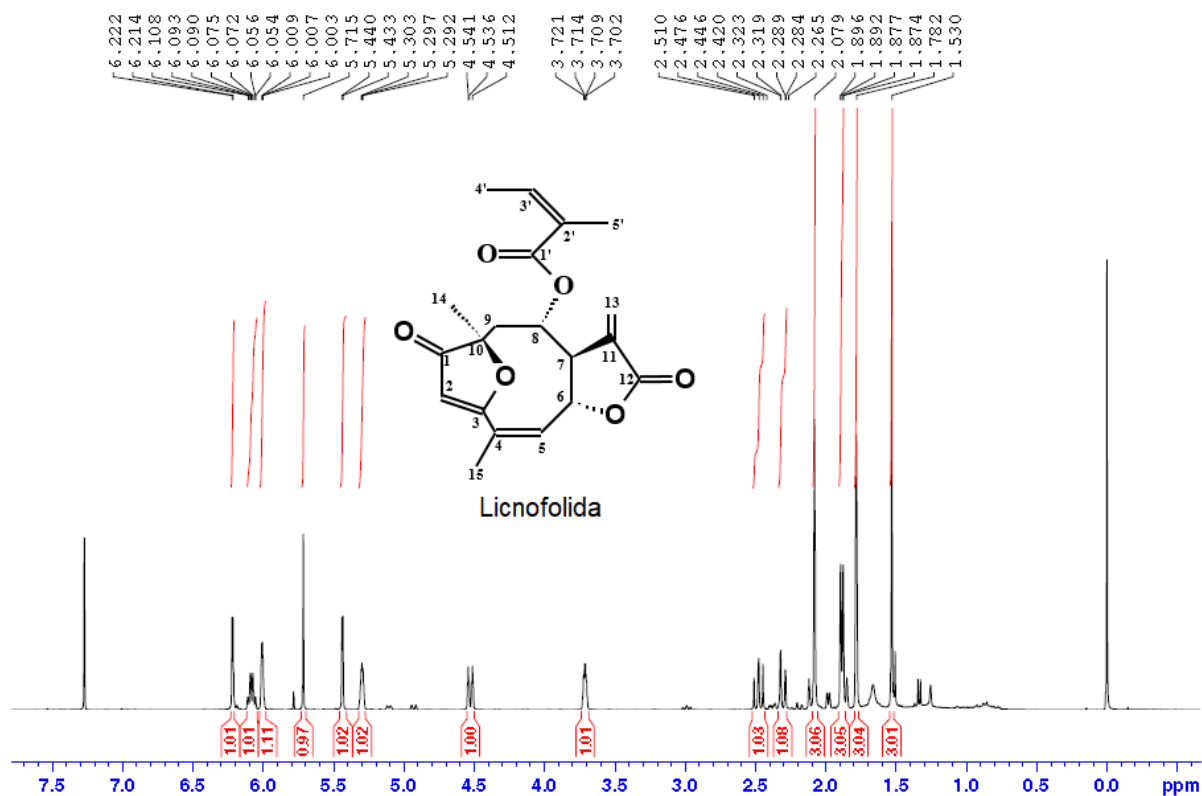
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 (**Figura 6**, página 20) foi observado um simpleto em  $\delta$  5,71, referente ao H-2, característico do grupo furanona da licnofolida (**Figura 8**, página 21). Apresentou também um duplete em  $\delta$  6,22 ( $J = 3,2$  Hz) referente ao hidrogênio H-13a (**Figura 7**, página 21) e outro duplete em  $\delta$  5,44 ( $J = 2,8$  Hz) referente ao hidrogênio H-13b (**Figura 8**, página 21). Estes dupletos indicaram a presença da ligação dupla metileno exocíclica conjugada à carbonila da  $\gamma$ -lactona (YOSHIOKA et al., 1973). Os sinais de H-13a e H-13b mostraram acoplamento com o sinal multiplete de H-7 ( $\delta$  3,71) (**Figura 10**, página 22). O multiplete em  $\delta$  5,30 foi atribuído ao H-6 (**Figura 8**, página 21), que mostrou, pelo mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (**Figura 14**, página 24; **Figura 15**, página 25), relação com os hidrogênios H-5 ( $\delta$  6,01 q;  $J = 3,2; 1,6$  Hz) (**Figura 7**, página 21), H-7 ( $\delta$  3,71 m) (**Figura 10**, página 22) e H-15 ( $\delta$  2,08 t;  $J = 2,0; 4,0$  Hz) (**Figura 12**, página 23). Os deslocamentos químicos em  $\delta$  6,08 (H-3' dq;  $J = 7,2; 1,6$  Hz) (**Figura 7**, página 21),  $\delta$  1,88 (H-4' dq;  $J = 7,2; 1,6$  Hz) (**Figura 12**, página 23) e  $\delta$  1,78 (H-5' m) (**Figura 13**, página 24) mostram a presença do grupo éster angelato, comuns em furanoeliangolidas (BOHLMANN et al., 1980). O duplo tripleto em  $\delta$  4,53 atribuído ao H-8 ( $J = 2,4; 12,0; 2,0$  Hz) (**Figura 9**, página 22), referente aos acoplamentos com H-9a ( $\delta$  2,48 dd;  $J = 12,0; 13,6$  Hz), H-9b ( $\delta$  2,30 dd;  $J = 2,0; 14,0$  Hz) (**Figura 11**, página 23) e H-7 ( $\delta$  3,71 m) (**Figura 16**, página 26). O simpleto em  $\delta$  1,53 foi atribuído ao H-14 (**Figura 13**, página 24).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 19**, página 29) foram identificados sinais em  $\delta$  204,71 (C1, C=O),  $\delta$  104,75 (C2, =CH) e  $\delta$  186,95 (C3, =C-O) referentes ao grupo furanona. O deslocamento químico em  $\delta$  168,96 foi atribuído ao carbono carbonílico C12 da  $\gamma$ -lactona. Os sinais em  $\delta$  133,70 (C11) e 124,32 (C13) são referentes à ligação dupla metileno exocíclica presente na lactona sesquiterpênica licnofolida. Foi possível identificar os carbonos ligados à hidrogênios no espectro DEPT (**Figura 20**, página 29) e seus respectivos hidrogênios no mapa de contornos HSQC (**Figuras 21 a 25**, páginas 30 a 33) e HMBC (**Figuras 26 a 30**, páginas 34 a 36). Os demais deslocamentos químicos também estão de acordo com os dados da literatura para esta substância (VICHNEWISK et al., 1989).

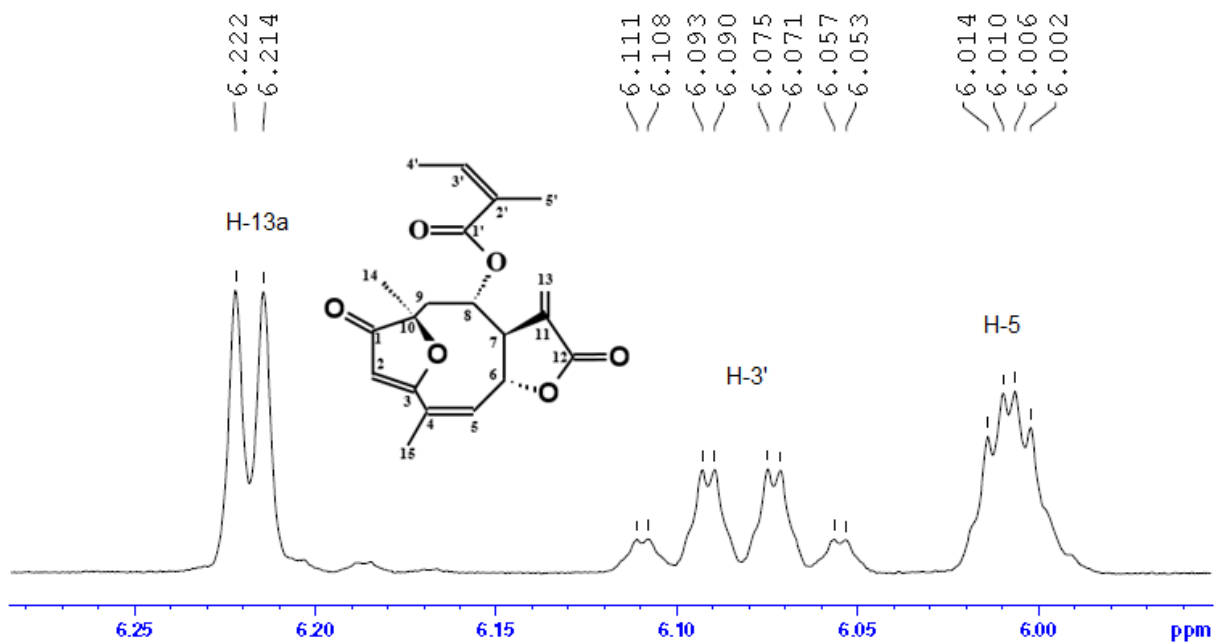


**Tabela 5.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 (400 MHz) e de licnofolida (270 MHz, BOHLMANN et al., 1980) em  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm),  $J$  (Hz).

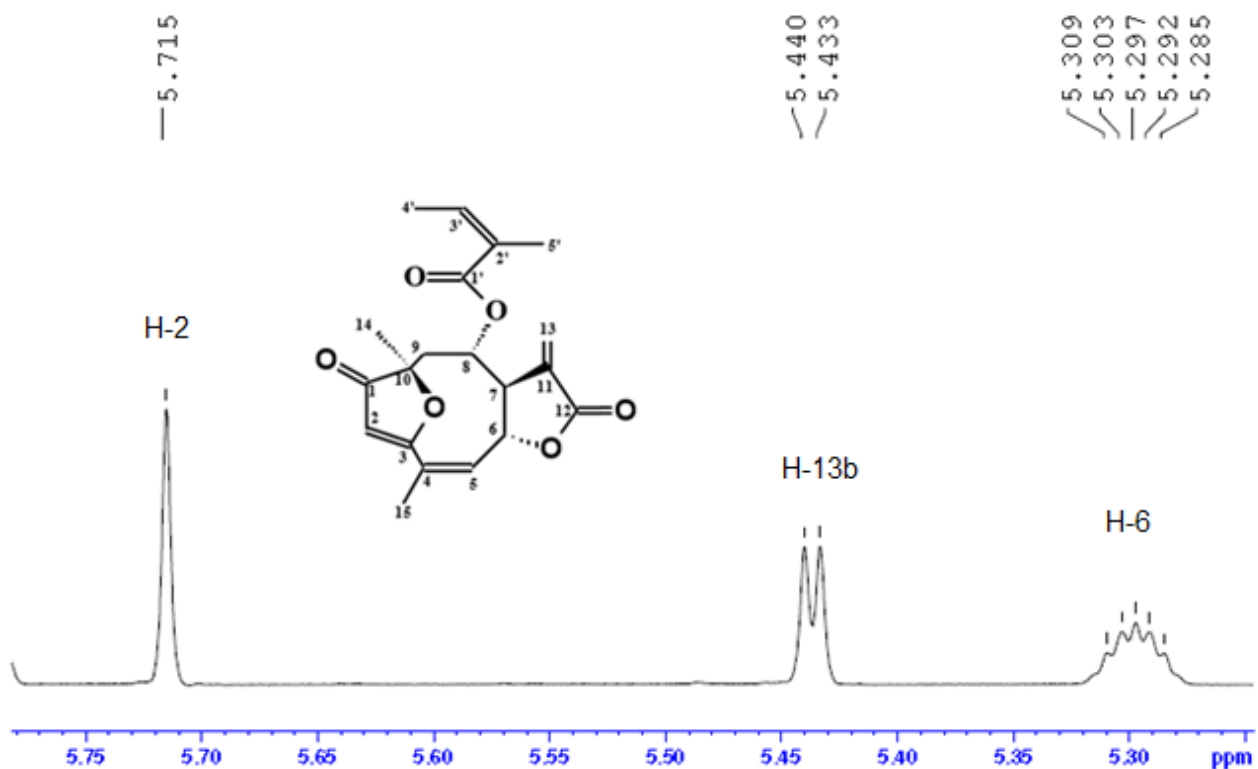
H	Licnofolida	LT7
H-2	5,72 ; s	5,71 ; s
H-5	6,02 ; dq (3,0; 1,7)	6,01 ; q (3,2; 1,6)
H-6	5,30 ; ddq (3,0; 5,0; 2,7)	5,30 ; m
H-7	3,72 ; dddd (2,5; 3,2; 2,8)	3,71 ; m
H-8	4,54 ; ddd (2,5; 12,0; 2,0)	4,53 ; dt (2,4; 12,0; 2,0)
H-9a	2,49 ; dd (12,0; 14,0)	2,48 ; dd (12,0; 13,6)
H-9b	2,32 ; dd (2,0; 14,0)	2,30 ; dd (2,0; 14,0)
H-13a	6,23 ; d (3,2)	6,22 ; d (3,2)
H-13b	5,44 ; d (2,8)	5,44 ; d (2,8)
H-14	1,54 ; s	1,53 ; s
H-15	2,09 ; dd (1,7; 2,7)	2,08 ; t (2,0; 4,0)
H-3'	6,09 ; qq (7,0; 1,5)	6,08 ; dq (7,2; 1,6)
H-4'	1,90 ; dq (7,0; 1,5)	1,88 ; dq (7,2; 1,6)
H-5'	1,80 ; dq (1,5; 1,5)	1,78 ; m



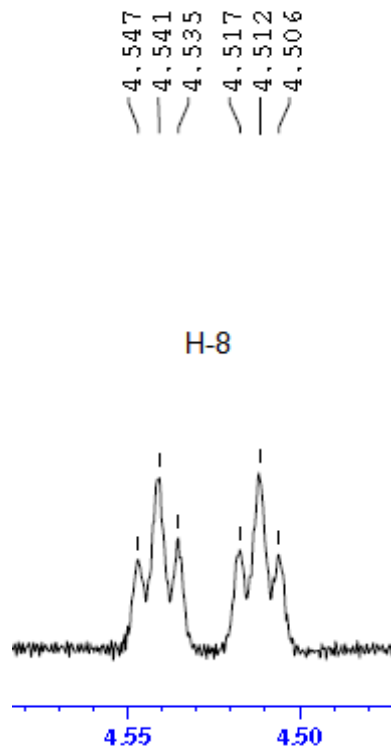
**Figura 6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



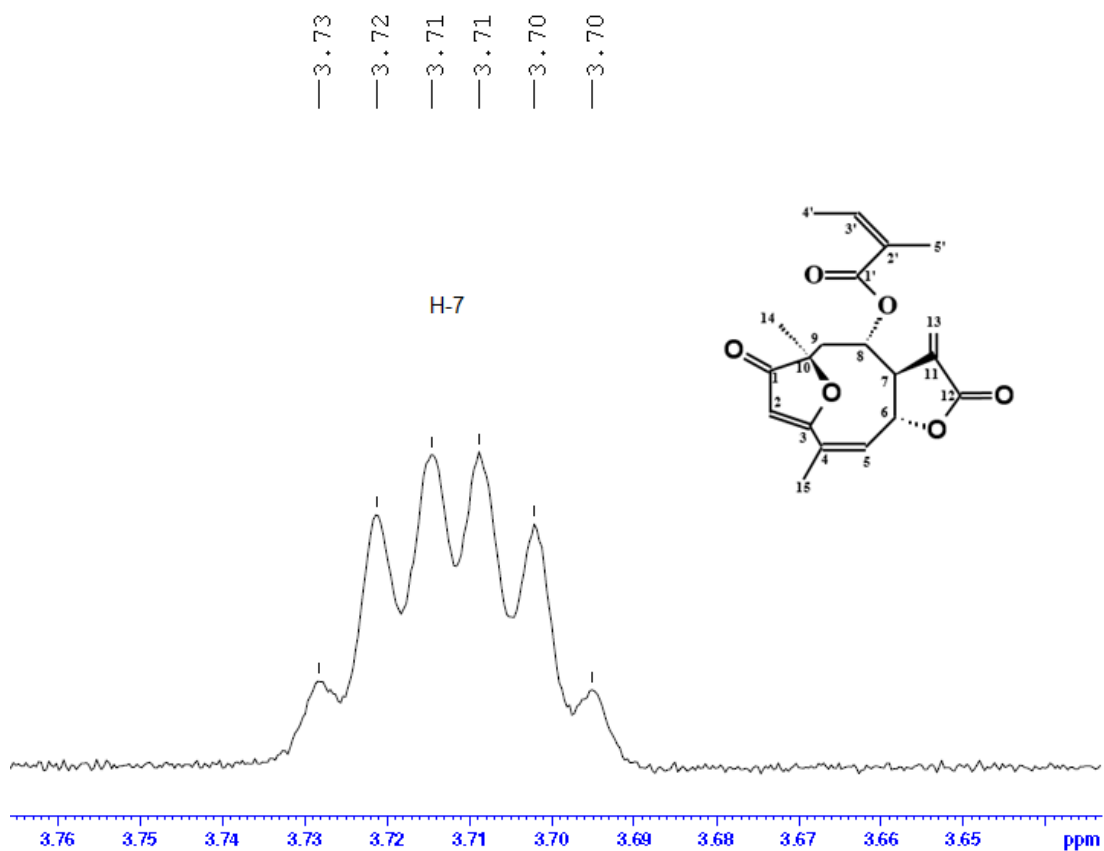
**Figura 7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região  $\delta$  6,25-6,00.



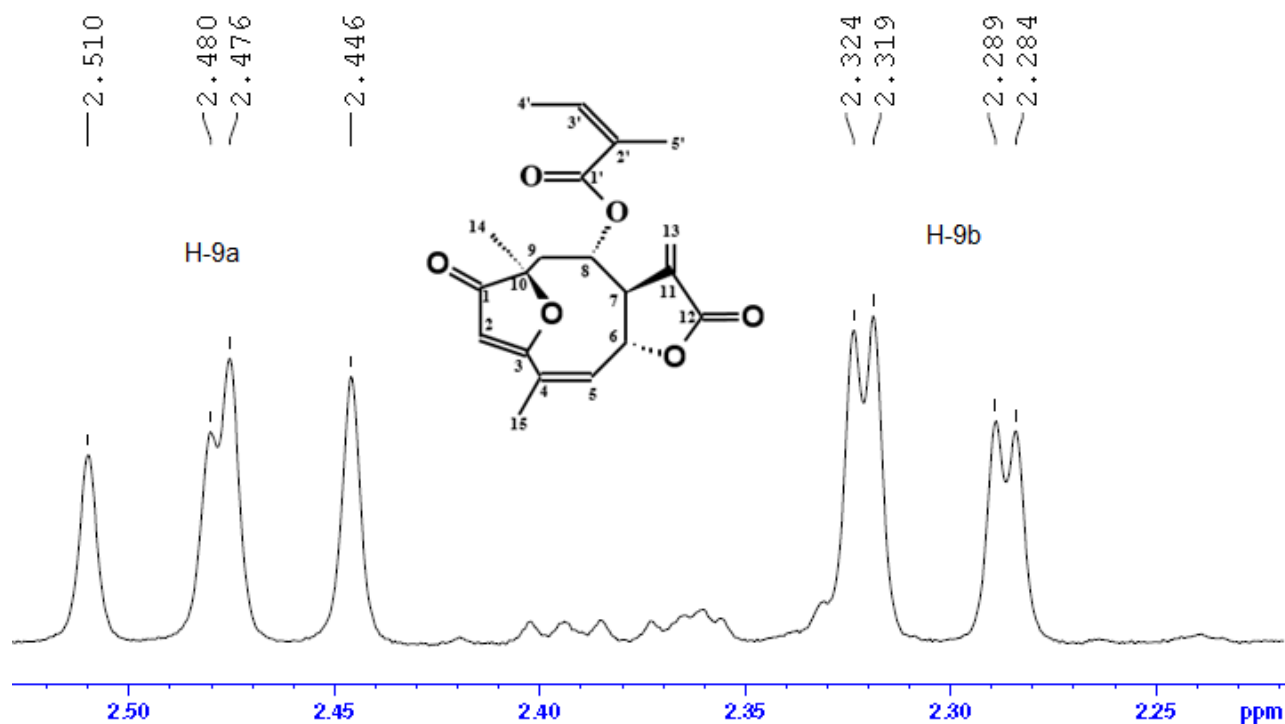
**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região  $\delta$  5,75-5,30.



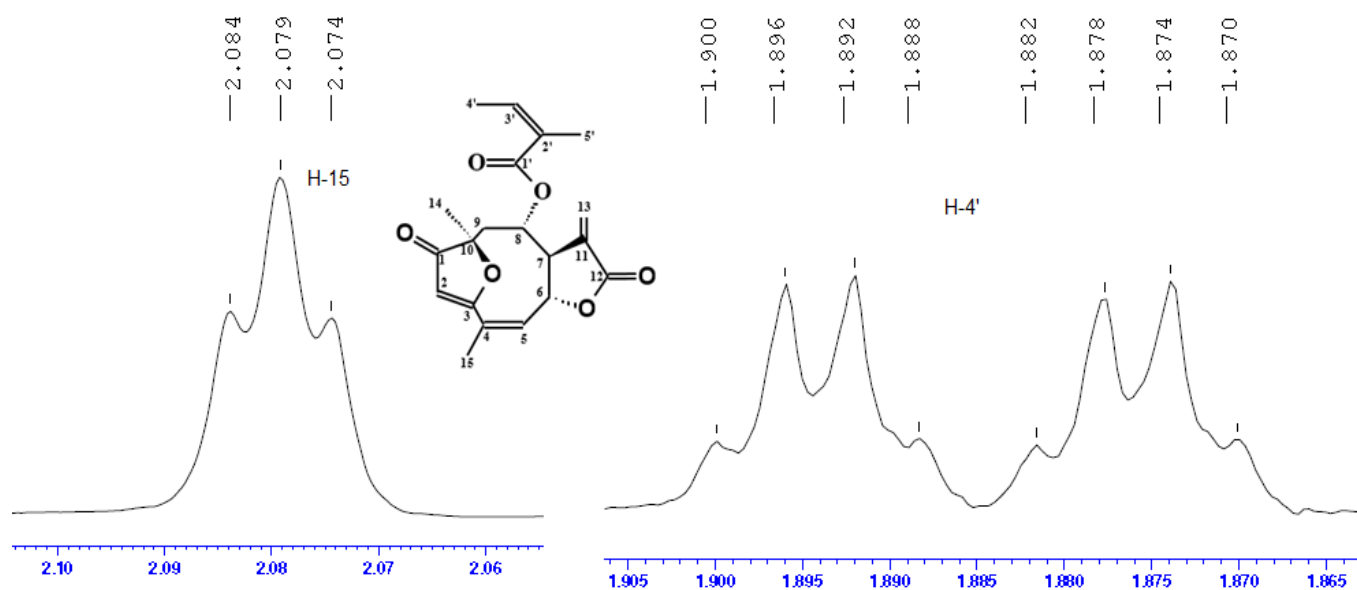
**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região  $\delta$  4,55-4,50.



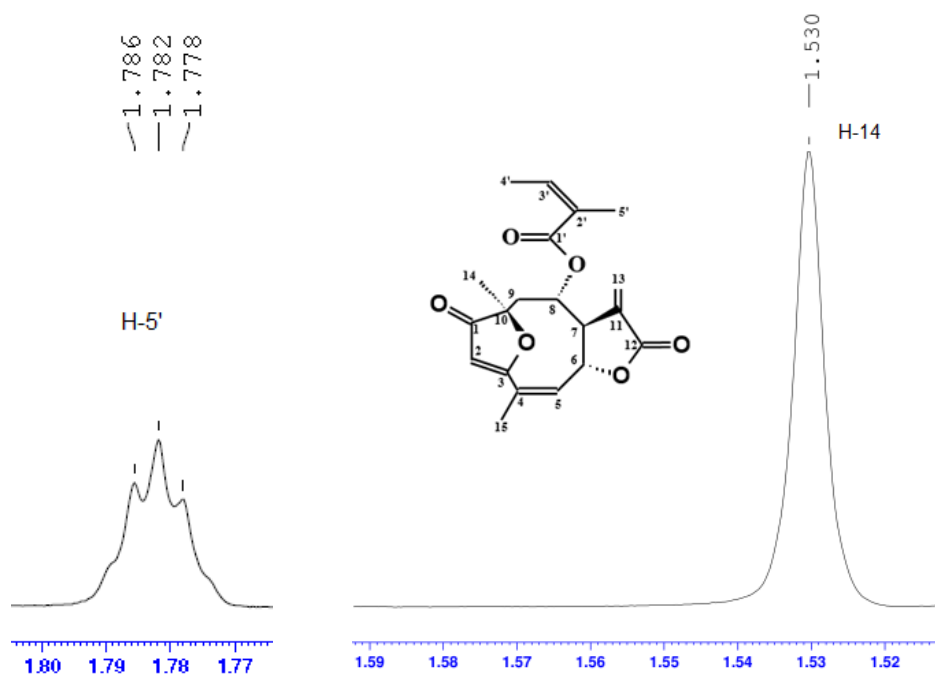
**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região  $\delta$  3,65 - 3,76.



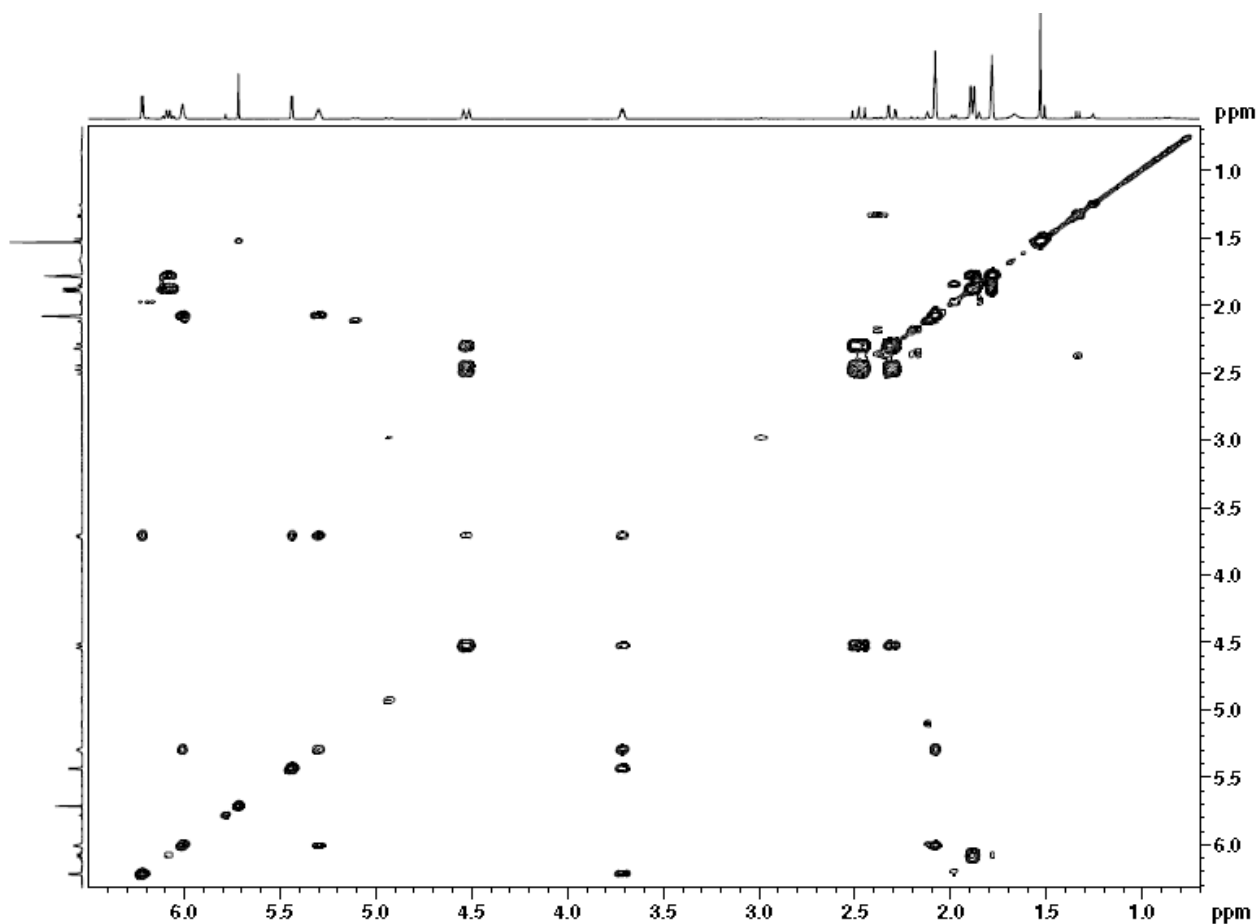
**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão na região  $\delta$  2,25 - 2,50.



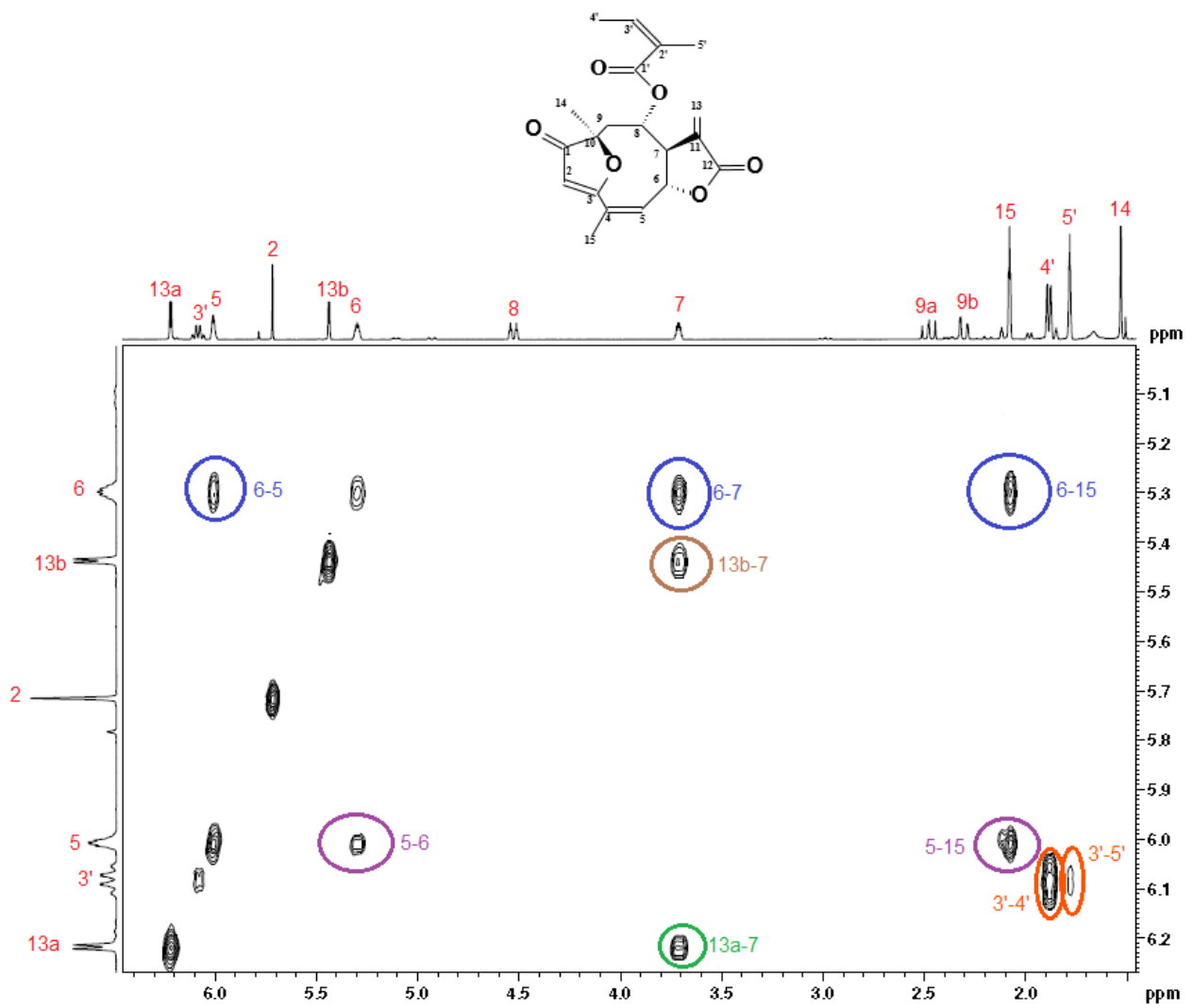
**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) com expansão nas regiões  $\delta$  1,86 - 1,90 e  $\delta$  2,06 - 2,10.



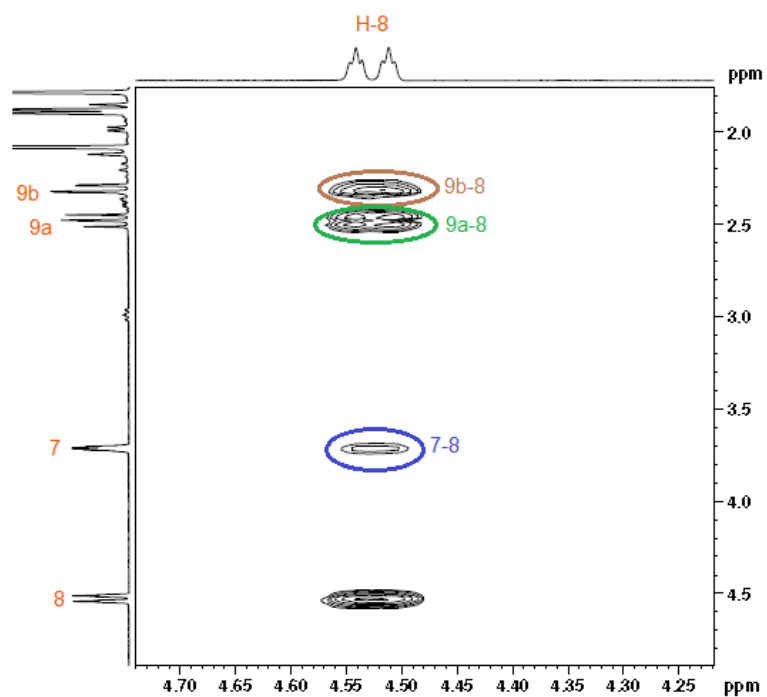
**Figura 13.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de LT7 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) com expansão nas regiões δ 1,77 -1,80 e de δ 1,52 -1,59.



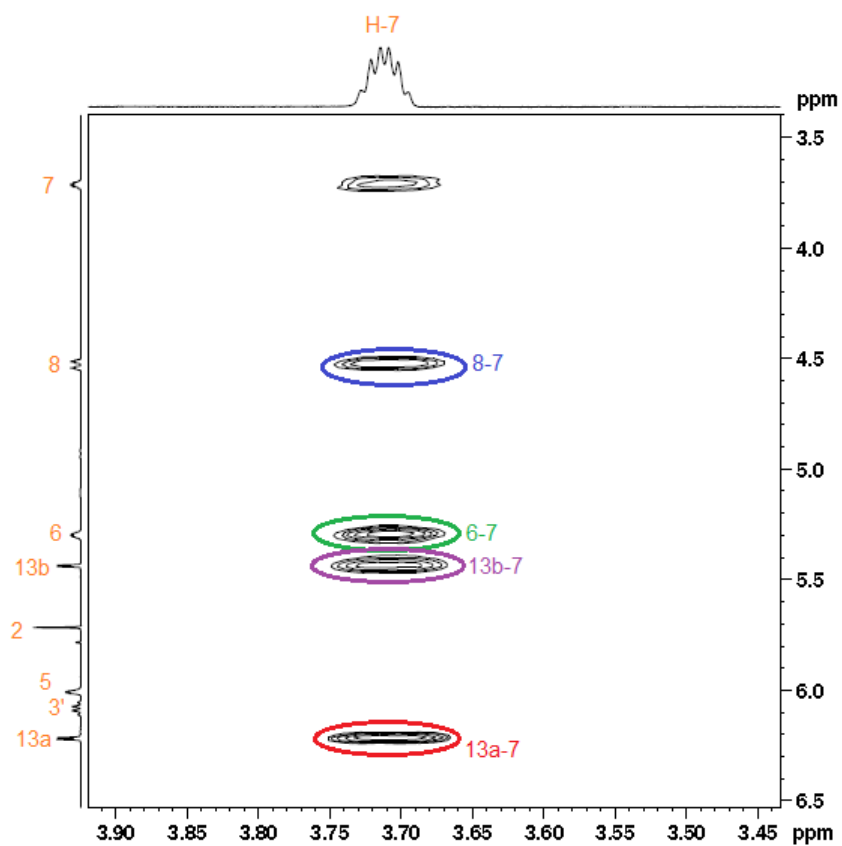
**Figura 14.** Mapa de contornos COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H de LT7.



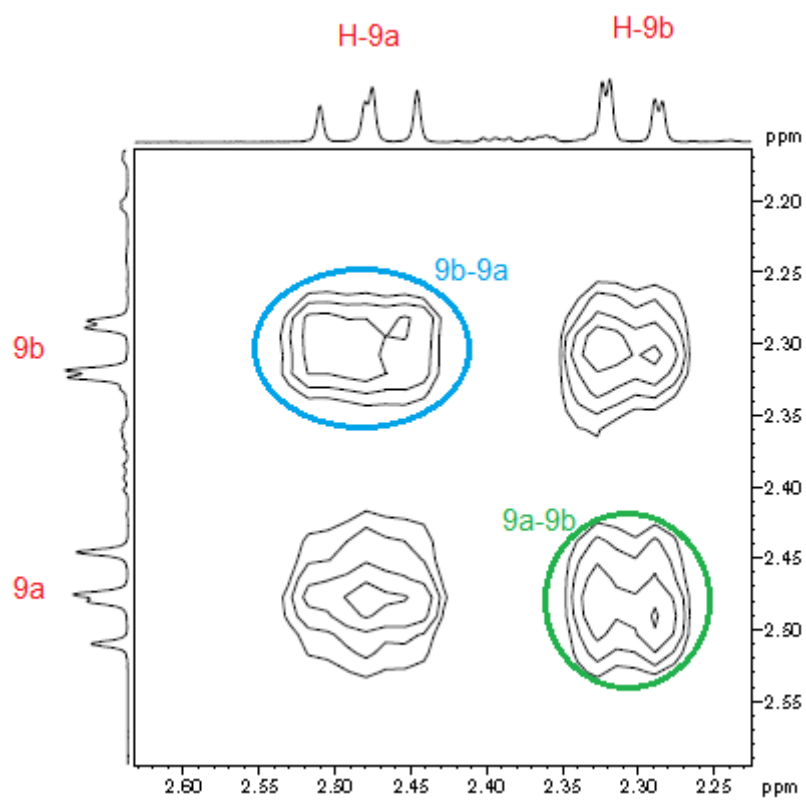
**Figura 15.** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  com expansão na região  $\delta$  1,5-6,4 x  $\delta$  5,01-6,27.



**Figura 16.** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  com expansão na região  $\delta$  4,22-4,74 x  $\delta$  1,8-4,8.



**Figura 17.** Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  com expansão na região  $\delta$  3,91-3,44 x  $\delta$  3,5-6,5.



**Figura 18.** Mapa de contornos COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H com expansão na região δ 2,63-2,23 x δ 2,17-2,59.



**Tabela 6.** Dados de  $\delta$  (ppm) do RMN de  $^{13}\text{C}$  de licnofolida a 100 MHz em  $\text{CDCl}_3$  (VICHNEWISK et al., 1989), e LT7 a 100 MHz em  $\text{CDCl}_3$ .

<b>Cn</b>	<b>Licnofolida</b>	<b>LT7</b>
<b>C1</b>	204,71	204,91
<b>C2</b>	104,69	104,75
<b>C3</b>	186,83	186,95
<b>C4</b>	130,44	130,33
<b>C5</b>	135,12	135,03
<b>C6</b>	81,61	81,72
<b>C7</b>	51,23	51,16
<b>C8</b>	73,00	72,99
<b>C9</b>	44,04	44,03
<b>C10</b>	89,64	89,72
<b>C11</b>	133,84	133,70
<b>C12</b>	168,02	168,96
<b>C13</b>	124,10	124,32
<b>C14</b>	20,65	20,70
<b>C15</b>	20,22	20,36
<b>C1'</b>	167,00	167,09
<b>C2'</b>	126,51	126,38
<b>C3'</b>	140,54	140,83
<b>C4'</b>	19,93	20,05
<b>C5'</b>	15,61	15,73

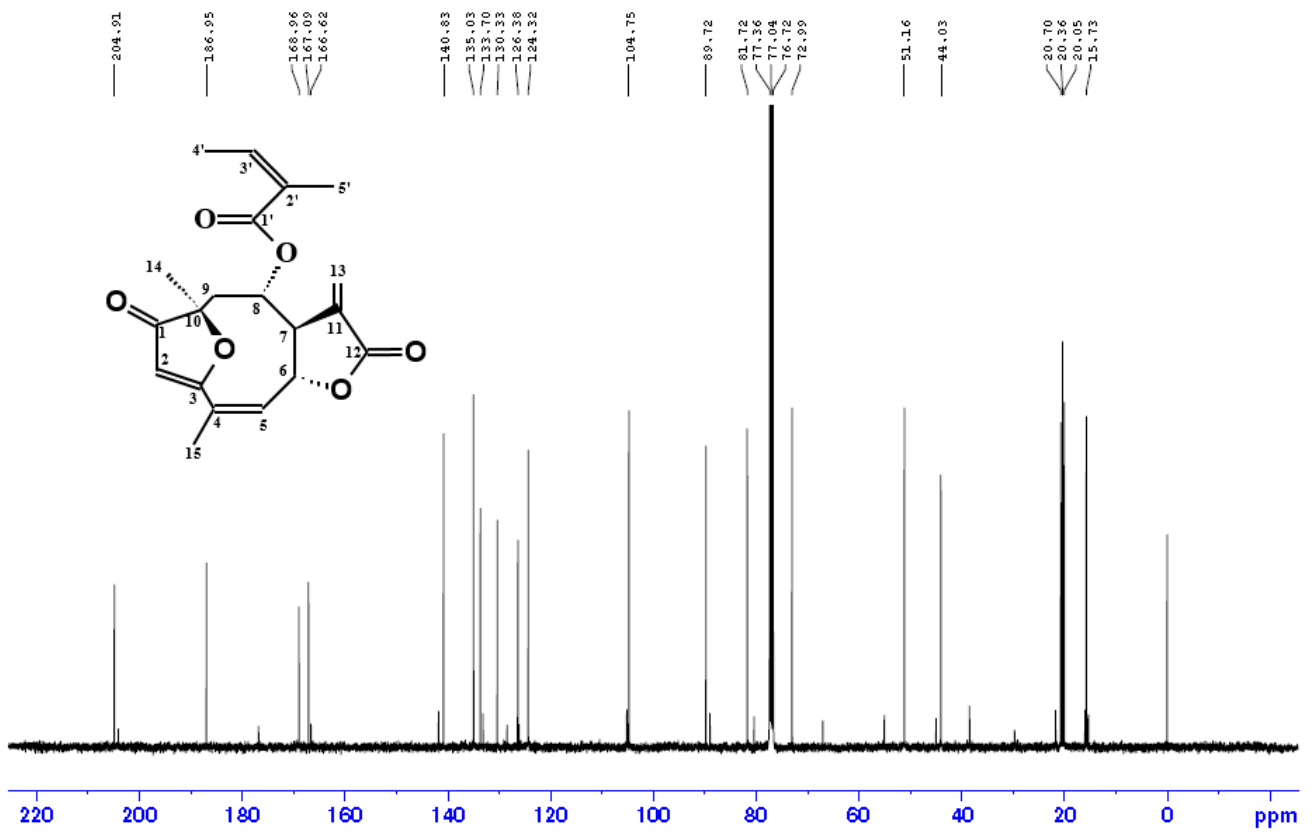


Figura 19. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de LT7 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).

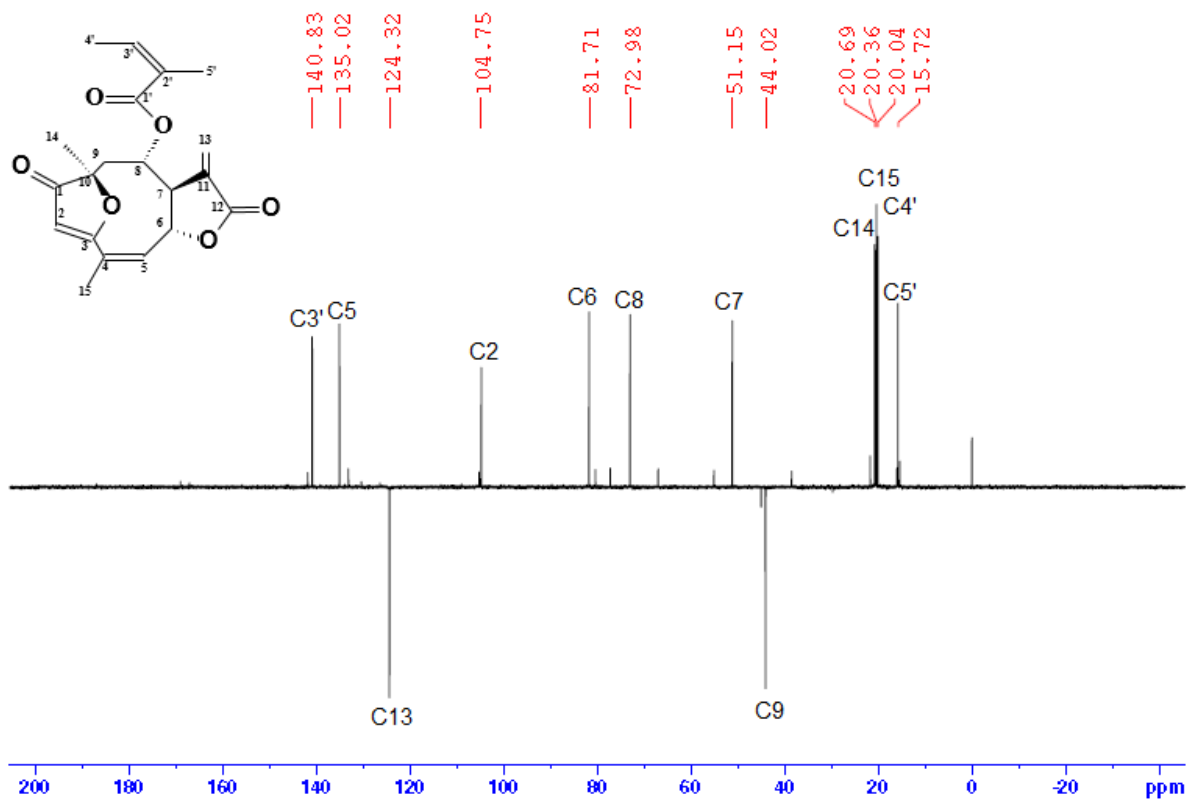


Figura 20. Subespectro DEPT de LT7.

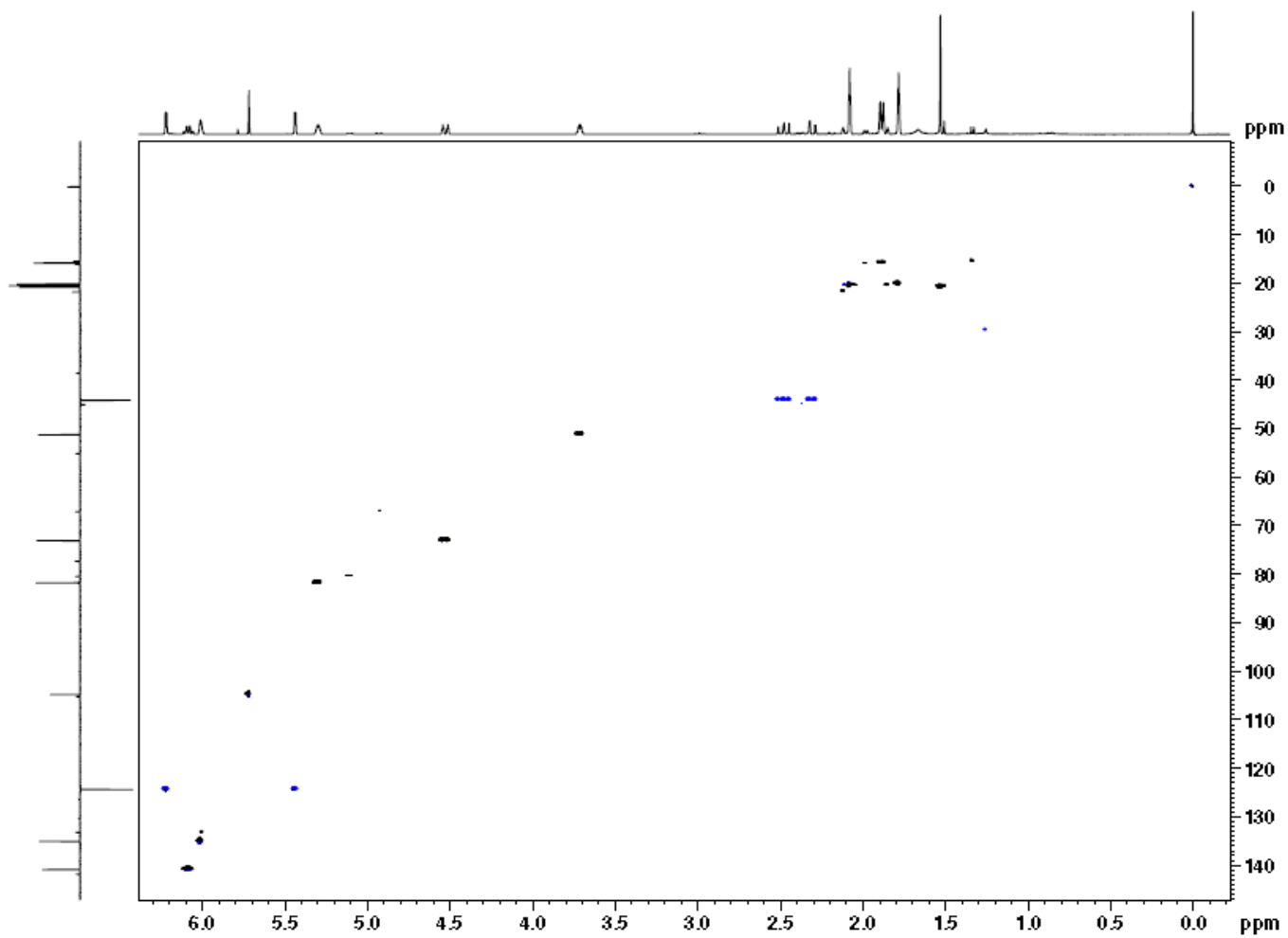
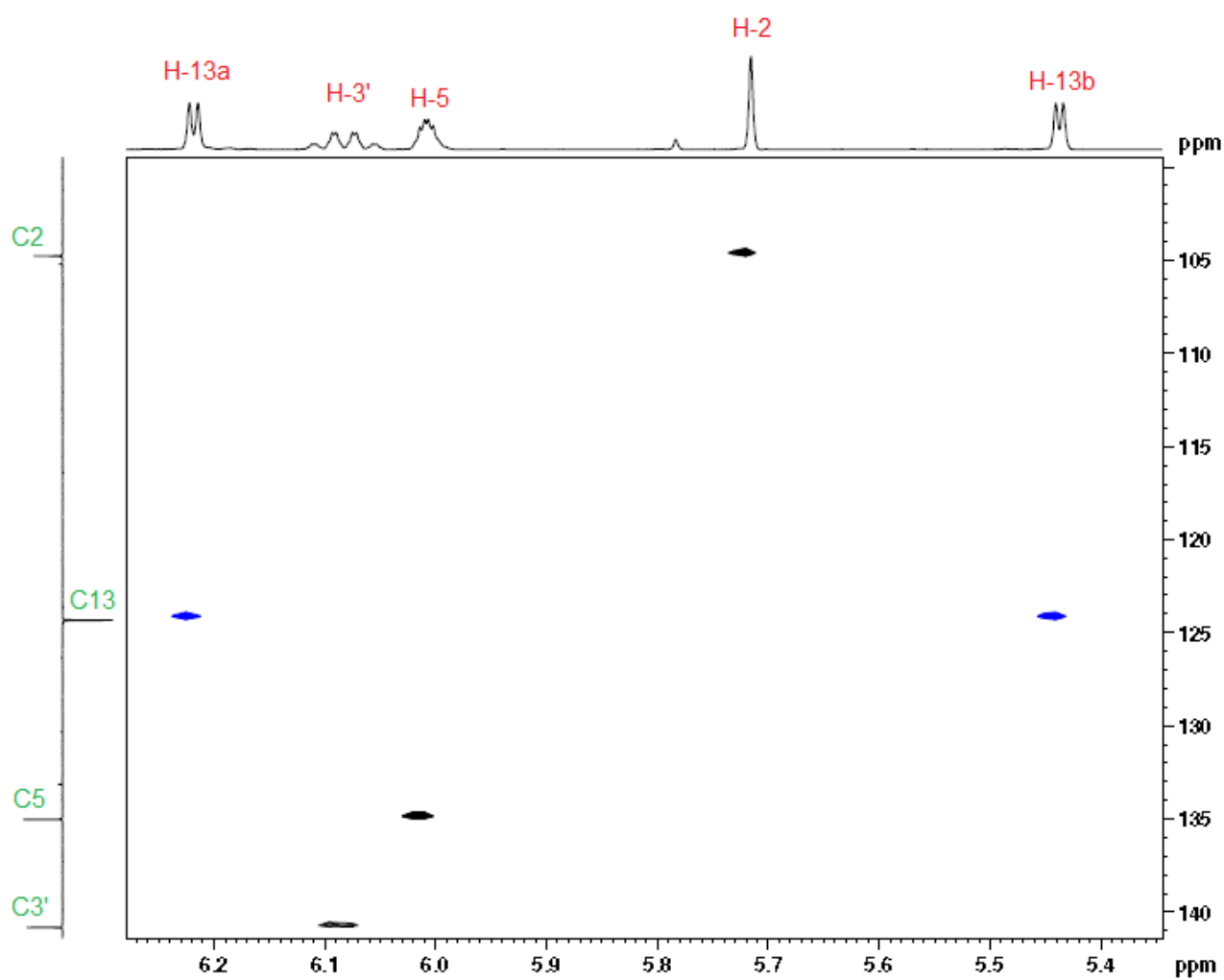
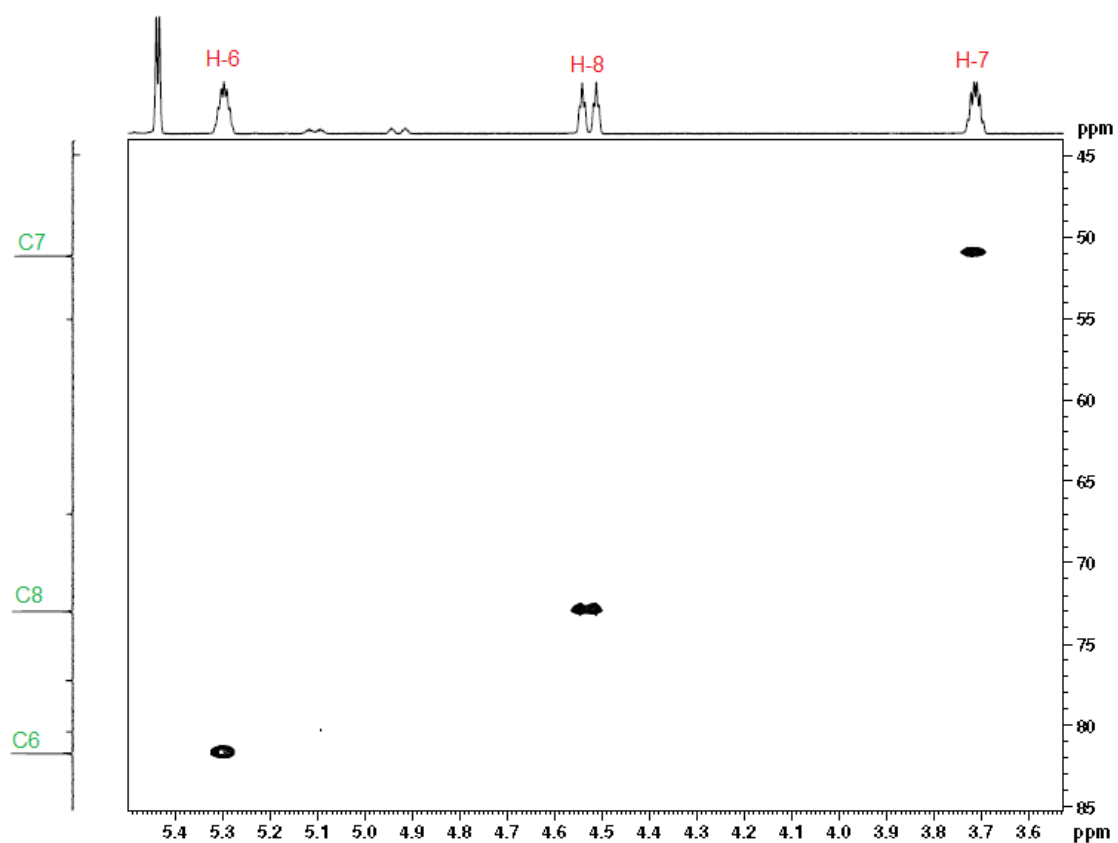


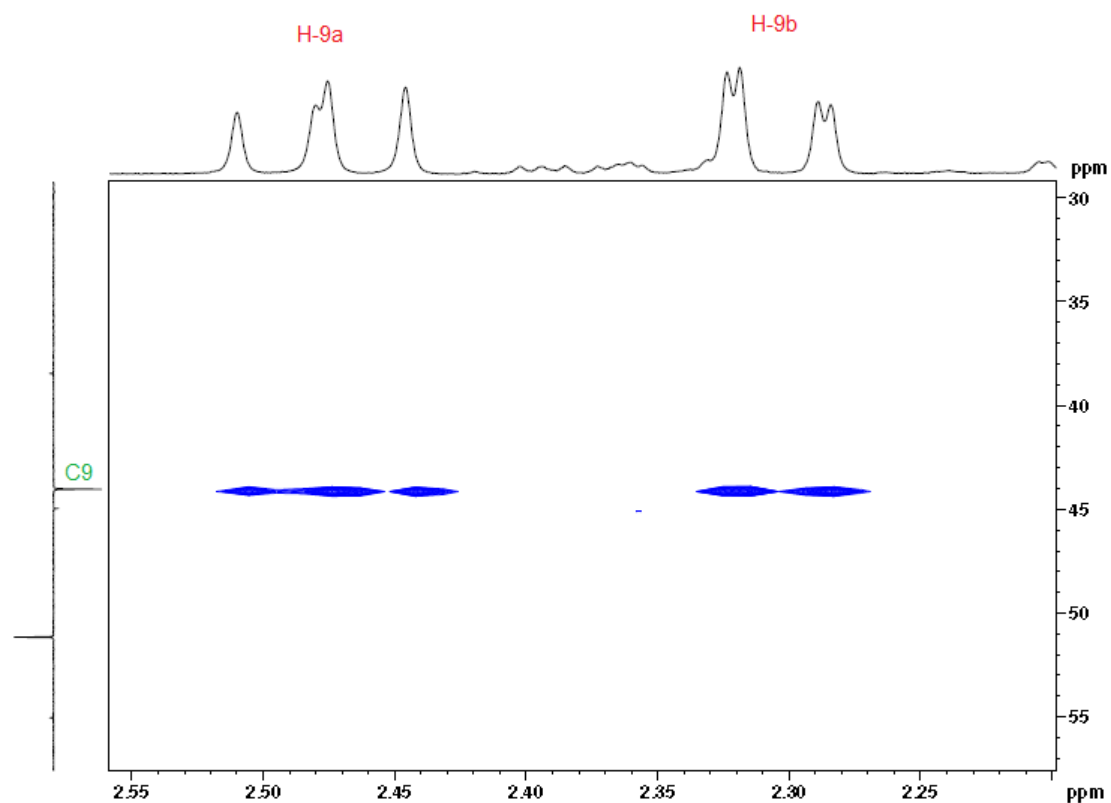
Figura 21. Mapa de contornos HSQC de LT7.



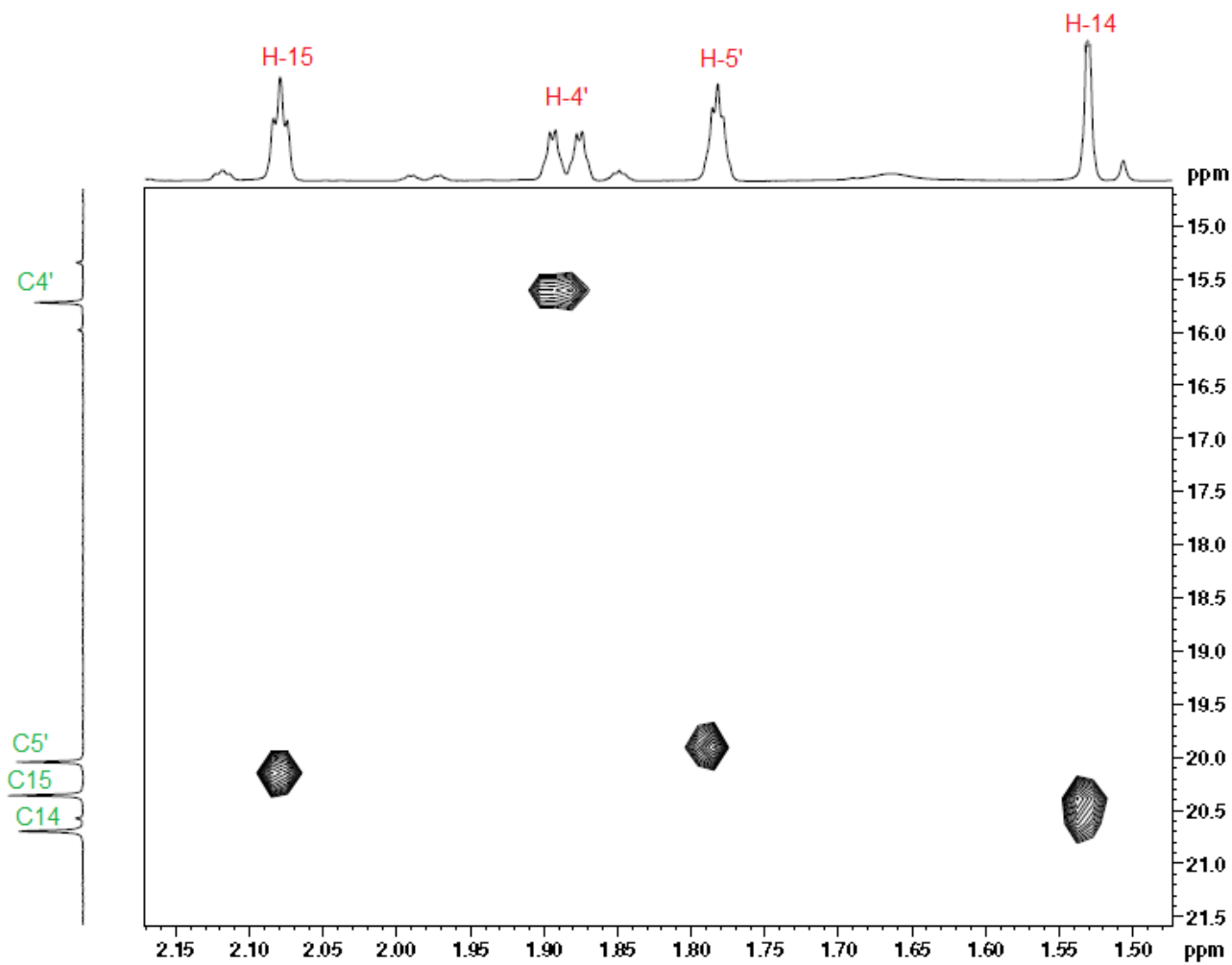
**Figura 22.** Expansão entre as regiões  $\delta$  5,35-6,27 (RMN  $^1\text{H}$ ) e  $\delta$  100-141 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.



**Figura 23.** Expansão entre as regiões  $\delta$  3,63-5,49 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  45-85 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.



**Figura 24.** Expansão entre as regiões  $\delta$  2,20-2,55 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  30-57 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.



**Figura 25.** Expansão entre as regiões  $\delta$  1,48-2,17 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  14,7-21,5 (DEPT) do mapa de contornos HSQC.

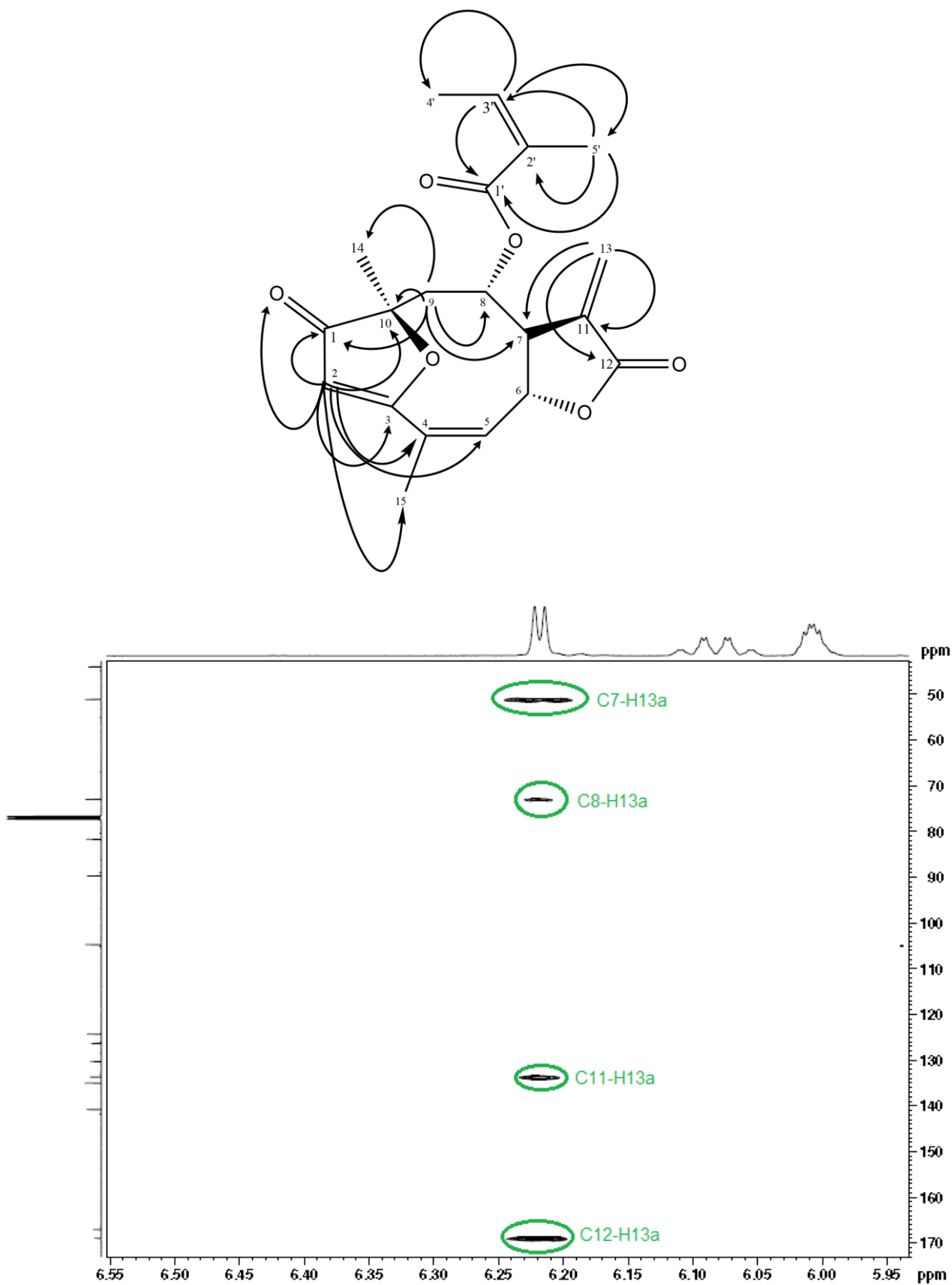
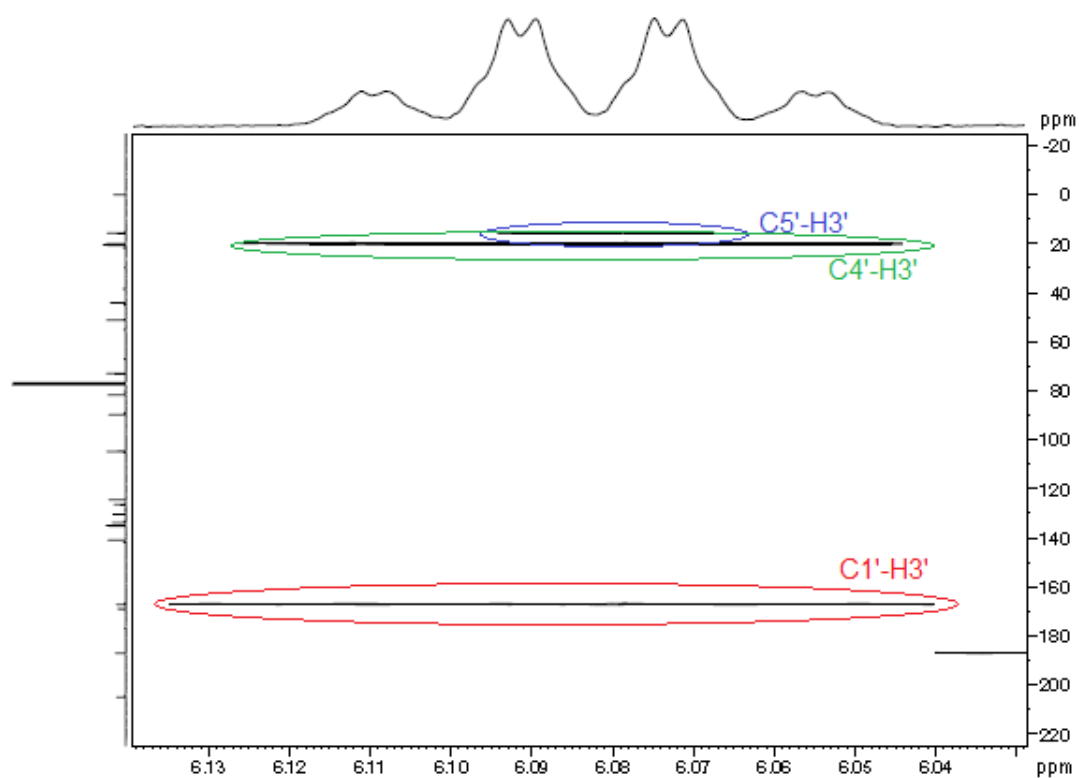
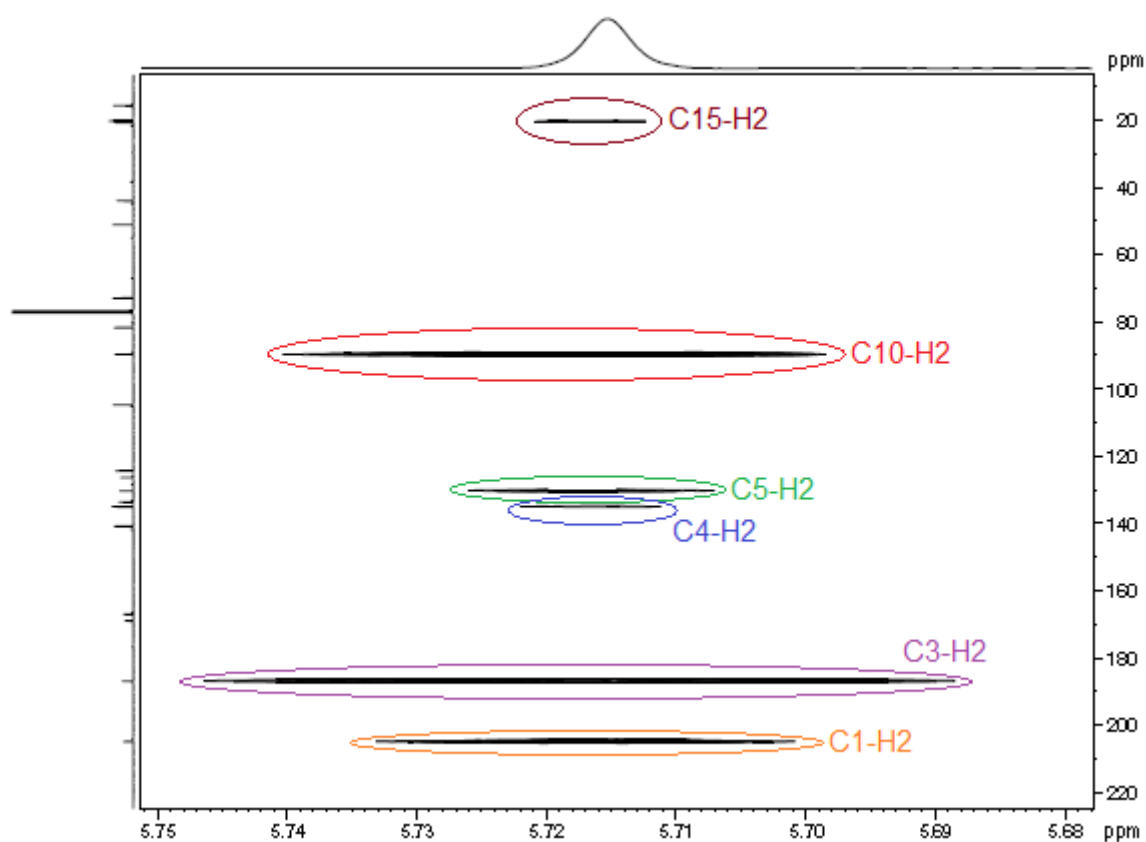


Figura 26. HMBC de LT7 com expansão entre as regiões  $\delta$  6,55-5,94 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  42-172 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

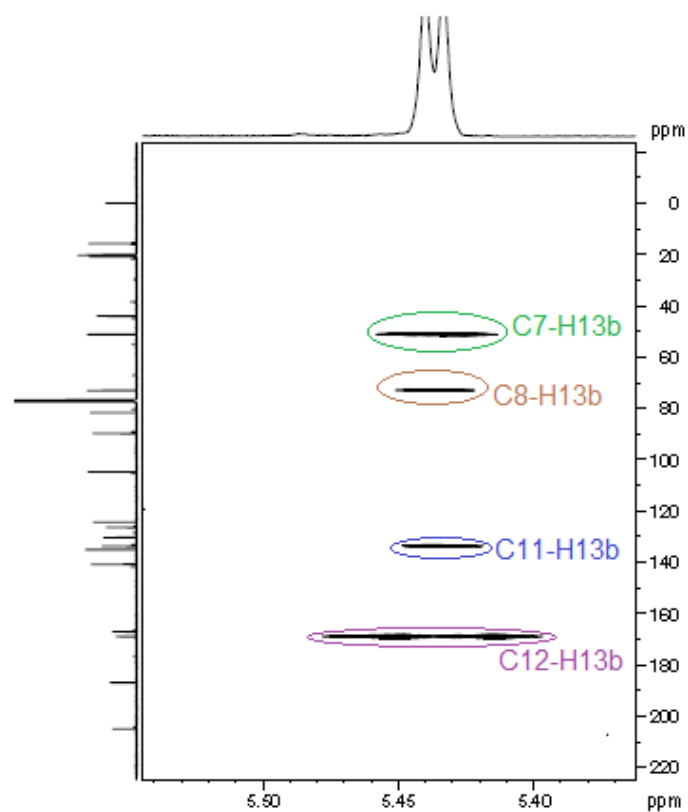


**Figura 27.** HMBC de LT7 com expansão entre as regiões  $\delta$  6,139-6,030 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  0-220 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

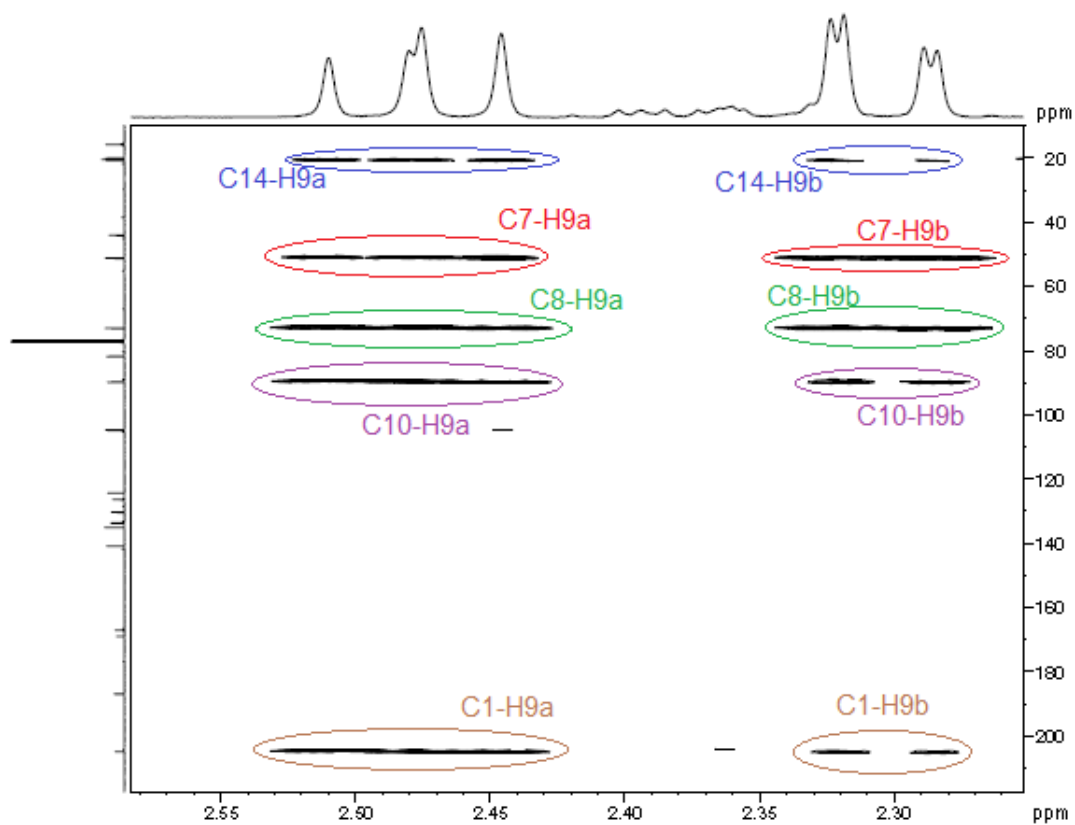


**Figura 28.** HMBC de LT7 com expansão entre as regiões  $\delta$  5,75-5,68 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  0-220 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).





**Figura 29.** HMBC de LT7 com expansão entre as regiões  $\delta$  5,54-5,37 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  0-220 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).



**Figura 30.** HMBC de LT7 com expansão entre as regiões  $\delta$  2,58-2,26 (RMN  $^1\text{H}$ ) x  $\delta$  0-220 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).

## **6. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTI-HIPERURICÊMICA: ATIVIDADE URICOSÚRICA E DE INIBIÇÃO DA XANTINA OXIDASE**

### **6.1. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **6.1.1. Reagentes, solventes, medicamentos e equipamentos**

Os seguintes reagentes e solventes foram usados: oxonato de potássio (Sigma-Aldrich), ácido úrico (Sigma-Aldrich), solução de soro fisiológico 0,9% (salina) (Sequiplex), etanol P. A. (Quemis), tween 80 U.S.P. (Synth), água destilada, DMSO – dimetilsulfóxido (Vetec), ácido clorídrico P.A. (Chomoline), fosfato de potássio monobásico (Vetec), fosfato de sódio dibásico (Vetec), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Vetec), ácido fosfórico 85% P.A. (Vetec), coumassie brilliant blue G-250 (USB). Os medicamentos veterinários ketamina (Dopalen injetável, Ceva Santé Animale) e xilazina (Dopaser injetável, Hertape Calier) e os fármacos benzbromarona (Sigma-Aldrich), probenecida (Sigma-Aldrich) e alopurinol (Sigma-Aldrich).

Para o doseamento do ácido úrico foi usado o kit de ácido úrico monorreagente adquirido pela Bioclin (Brasil). Seringas de 1 mL (BD Plastipak) e agulhas hipodérmicas (BD Precision Glide) foram usadas para administração das soluções, tratamentos e anestesia aos ratos. O espectrofotômetro UV-visível Cary 50 Bio *Varian* – Austrália – e cubetas de quartzo (10x10 mm, 3500 µL; 10x10 mm, 600 µL) empregados nas leituras das absorbâncias. Utilizou-se também a centrífuga Sigma Laboratory Centrifuges 3K30 – Alemanha, e a centrífuga Microcen 16 da Herolab. Os materiais biológicos coletados foram armazenados no freezer Brastemp Flex a -20°C e no freezer a -80°C. Foram utilizados também lavadora ultra-sônica Unique, balanças Shimadzu e Quimis, vórtex Motion II (Logen Scientific) e pHmetro Digimed DM20.

### **6.2. Preparo das soluções**

#### **6.2.1. Solução de oxonato de potássio**

A suspensão de oxonato de potássio foi preparada (200 mg/kg) no dia do uso, diluída em 0,5 mL de salina para cada animal e homogeneizada com auxílio do aparelho vórtex.

#### **6.2.2. Solução de ácido úrico**

A suspensão de ácido úrico (1 g/kg) foi preparada no dia do uso e diluída em 1 mL de água destilada para cada animal, sendo homogeneizada com auxílio do aparelho de vórtex.

### **6.2.3. Benzbromarona, Probenecida e Alopurinol**

As soluções dos fármacos benzbromarona (10 mg/kg), probenecida (50 mg/kg) e alopurinol (10 mg/kg), usados nos grupos controle positivo foram diluídos no veículo Etanol:Tween 80:Água destilada (10:20:70) e homogeneizados com auxílio do aparelho de vórtex.

### **6.2.4. Licnofolida, Eremantolida C e Goiazensolida**

As lactonas sesquiterpênicas foram preparadas nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg, diluídas no veículo DMSO:Tween 80:Água destilada (10:10:80), homogeneizadas com auxílio do aparelho de vórtex.

### **6.2.5. Tampão Fosfato 50 mM**

As seguintes soluções foram preparadas:

- Solução A: 27,8 g de fosfato de sódio monobásico foram diluídos em 1 L de água destilada.
- Solução B: 53,65 g de fosfato de sódio dibásico heptahidratado foram diluídos em 1 L de água destilada.

Posteriormente, 95 mL da solução A foram vertidos em 405 mL da solução B em balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada. O pH 7,4 aferido por pHmetro.

### **6.2.6. Reagente de Bradford**

Foram pesados 100 mg de Coumassie Blue G-250, vertido para balão volumétrico de 1000 mL, diluído em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%. O volume do balão foi aferido com água destilada, obtendo-se o reagente na concentração final de 0,01% p/v de Coumassie Blue G-250, 4,7% p/v de etanol de 8,5% p/v de ácido fosfórico.

### **6.2.7. Solução de oxonato de potássio 1 mM**

100 mg de oxonato de potássio foram adicionados a 500 mL do tampão fosfato 50 mM, obtendo a concentração final de 1 mM de oxonato de potássio.

### **6.2.8. Solução de xantina 250 µM**

4 mg de xantina foram adicionados a 100 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, obtendo a concentração final de 250 µM de xantina.

### **6.2.9. HCl 0,6 M**

49,73 mL de ácido clorídrico (P.M. 36,5, pureza 37%, densidade 1,19 g/mL) foram adicionados a um balão volumétrico de 1000 mL e o volume aferido com água destilada, obtendo a concentração final de HCl 0,6 M.

## **6.3. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos em idade adulta pesando entre 180-280 gramas, provenientes do Biotério Central da UFOP. Os animais foram mantidos no biotério durante os experimentos, respeitando o ciclo 12/12h claro/escuro. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da UFOP (CEUA-UFOP) – protocolo 2016/54.

## **6.4. Avaliação da atividade anti-hiperuricêmica**

Para avaliar a atividade anti-hiperuricêmica (uricosúrica e de inibição da xantina oxidase) de licnofolida, eremantolida C e goiazensolida, foi empregado o modelo animal de hiperuricemia induzida pelo inibidor da uricase, oxonato de potássio e ácido úrico, descrito por Murugaiyah e Chan (2009) (**Figura 31**, página 41). Os animais foram privados de água e alimento durante a noite anterior ao experimento. No dia do experimento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de oxonato de potássio (0,5 mL), na dose de 200 mg/kg e o ácido úrico (1 mL) por gavagem (i.g.), na dose de 1 g/kg, promovendo assim a hiperuricemia. Os animais do grupo 1, controle normal, receberam apenas salina i.p. e

água por gavagem. 30 minutos após, os animais receberam os tratamentos (0,2 mL), de acordo com a seguinte divisão dos grupos, de 6 animais cada.

Tratamentos:

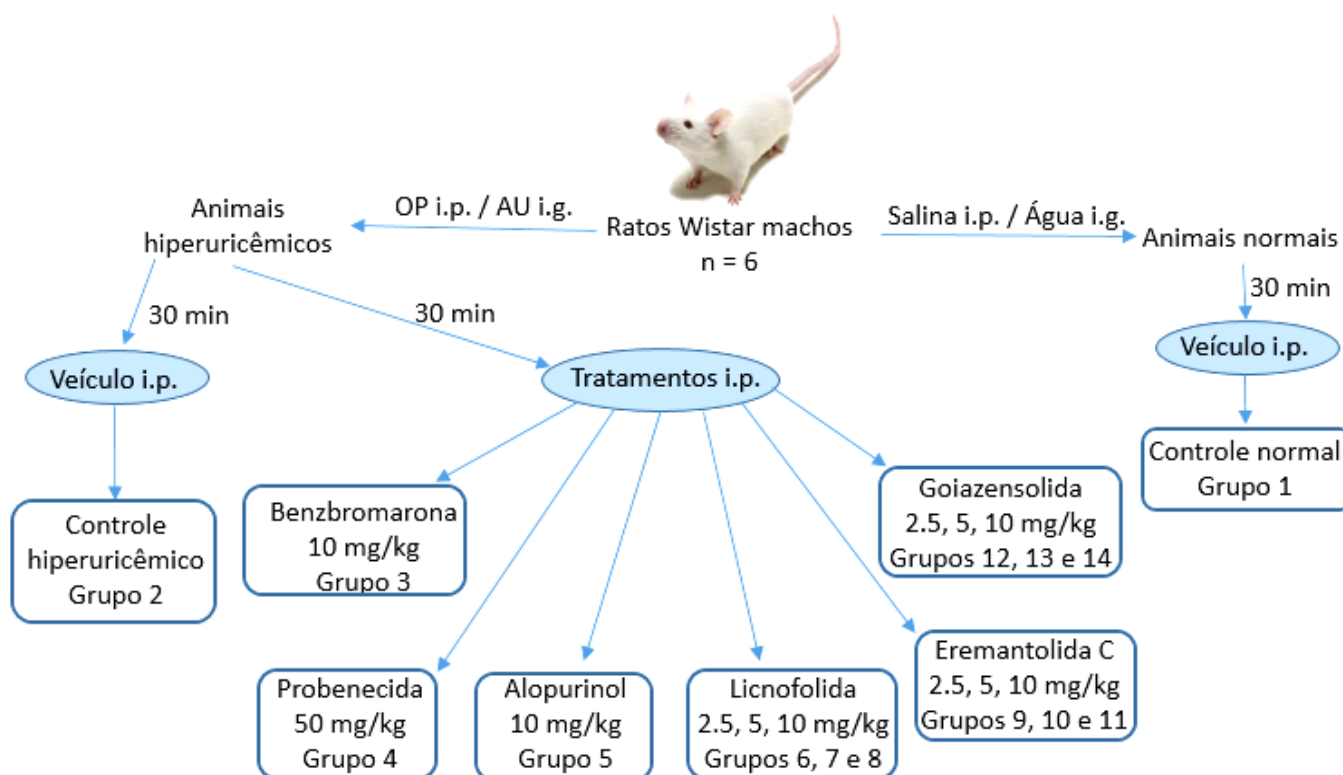
- Grupo 1: Controle normal: veículo [DMSO:Tween 80:Água destilada (10:10:80)].
- Grupo 2: Controle hiperuricêmico: veículo [DMSO:Tween 80:Água destilada (10:10:80)].
- Grupo 3: Controle positivo: benzbromarona 10 mg/kg.
- Grupo 4: Controle positivo: probenecida 50 mg/kg.
- Grupo 5: Controle positivo: alopurinol 10 mg/kg.
- Grupo 6: Licnofolida 2,5 mg/kg.
- Grupo 7: Licnofolida 5 mg/kg.
- Grupo 8: Licnofolida 10 mg/kg.
- Grupo 9: Eremantolida C 2,5 mg/kg.
- Grupo 10: Eremantolida C 5 mg/kg.
- Grupo 11: Eremantolida C 10 mg/kg.
- Grupo 12: Goiazensolida 2,5 mg/kg.
- Grupo 13: Goiazensolida 5 mg/kg.
- Grupo 14: Goiazensolida 10 mg/kg.

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e foram fornecidos 100 mL de água. Após 5 horas na gaiola metabólica, a urina foi coletada em tubos graduados para medida do volume urinário e dosagem do ácido úrico. A urina foi armazenada a - 20°C até a realização das análises. A ingestão de água pelos animais também foi medida durante o tempo permanecido nas gaiolas metabólicas.

Os ratos foram então anestesiados com uma associação de ketamina e xilazina em dose letal (240 e 60 mg/kg, respectivamente), administrada por via intraperitoneal. Após a eutanásia dos animais por superdosagem de anestésicos, amostras de sangue foram coletadas pela aorta abdominal, mantidas a temperatura ambiente até a centrifugação a 30000 xg por 15 minutos, sendo descartado o precipitado. O sobrenadante foi centrifugado mais uma vez a 30000 xg por 15 minutos e o precipitado novamente descartado. Os soros foram armazenados a -20°C para posterior análise. Uma parte dos fígados (3,0 g) foi então removida, pesada e armazenada a -80°C separadamente em tubos de ensaio. A partir das amostras de soro foi realizada a determinação dos níveis séricos de ácido úrico utilizando o kit Bioclin, seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de ácido úrico excretados na urina também foram dosados utilizando o mesmo kit da Bioclin.

## 6.5. Avaliação da atividade de inibição da xantina oxidase

Os fígados foram descongelados, homogeneizados com o homogeneizador de órgãos, misturados com 5 mL da solução tampão fosfato 50 mM e centrifugados por 10 minutos a 3000 xg, a 4°C. As camadas lipídicas sobrenadantes foram descartadas e os sobrenadantes intermediários foram centrifugados por uma hora a 10000 xg, a 4°C. As camadas lipídicas foram novamente retiradas e o intermediário pipetado obtendo assim os homogenatos dos fígados. Os homogenatos foram utilizados para a quantificação das proteínas totais e para avaliar a atividade residual da xantina oxidase hepática.



Após, os animais de todos os grupos foram colocados em gaiolas metabólicas.

Depois de 5 horas:

- Coleta da urina e sangue da aorta abdominal -> dosagem de ácido úrico
- Coleta do fígado -> dosagem da atividade de XOD residual

**Figura 31.** Esquema da avaliação da atividade anti-hiperuricêmica, uricosúrica e de inibição da xantina oxidase hepática (XOD) das lactonas sesquiterpênicas.

OP = Oxonato de potássio; AU = Ácido úrico; i.p. = intraperitoneal; i.g. = intragástrica

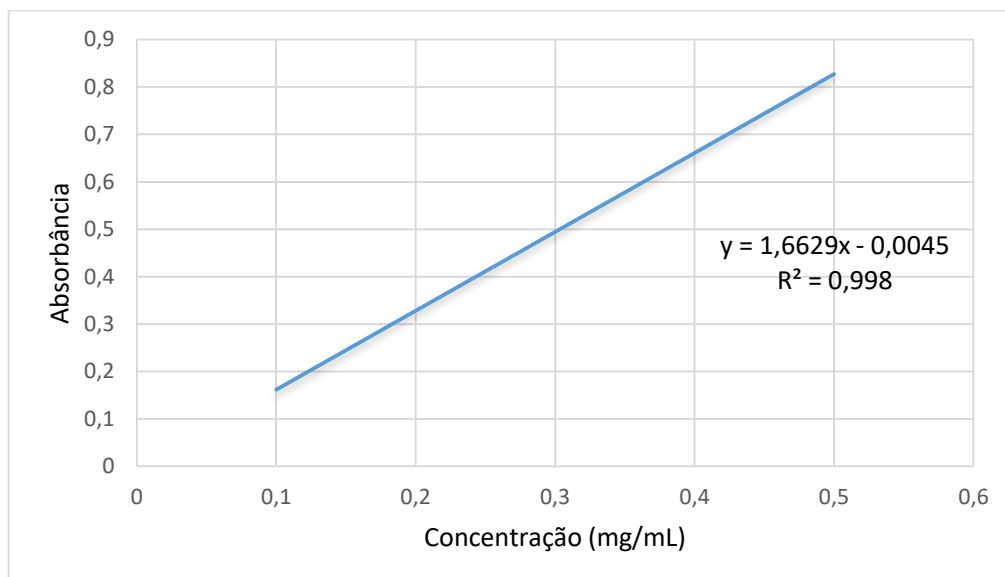
### 6.5.1. Dosagem de proteínas totais

O doseamento das proteínas totais de cada amostra foi feito de acordo com o método de Bradford (1976). O espectrofotômetro foi ajustado para realizar a leitura a 595 nm e o tampão fosfato 50 mM foi usado para zerar o equipamento. O branco foi preparado com 5 mL do reagente de Bradford adicionados a 100 µL de tampão fosfato 50 mM, homogeneizados em aparelho de vórtex. As amostras foram preparadas com 5 mL do reagente de Bradford adicionados a 100 µL do homogenato, homogeneizados em aparelho de vórtex. A leitura das absorvâncias foi feita no espectrofotômetro após 2 minutos.

### 6.5.2. Avaliação da atividade residual da xantina oxidase hepática

A atividade residual da xantina oxidase hepática foi determinada espectrofotometricamente, monitorando a síntese de ácido úrico a partir da xantina, de acordo com o método descrito por Hall e colaboradores (1990), por Zhu e colaboradores (2004) e por Ferrari e colaboradores (2016). 100 µL de cada homogenato dos fígados foram adicionados a tubos de ensaio com 5,4 mL da solução de oxonato de potássio 1 mM, para impedir a reação de conversão do ácido úrico a alantoína. A solução foi pré-incubada a 37°C por 15 minutos. Após este período, adicionou-se 1,2 mL da solução de xantina (250 mM) e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Nos tempos 0 e 30 minutos após o início da reação, adicionou-se 0,5 mL de HCl 0,6 M a fim de cessar a reação. Após interromper a reação, as soluções foram centrifugadas a 3000 xg por 5 minutos e os sobrenadantes coletados para leitura da absorvância no espectrofotômetro a 295 nm. O espectrofotômetro foi zerado com a solução de oxonato de potássio 1 mM. A quantificação do ácido úrico formado foi feita pela diferença entre os valores das absorvâncias nos tempos 0 e 30 minutos que foi comparada com a curva de calibração (Equação da reta:  $y = 1,6629x - 0,0045$ ;  $R^2 = 0,998$ ) (**Figura 32**, página 43).

Com os valores das proteínas totais, foi possível expressar a atividade residual da xantina oxidase como nanomoles de ácido úrico formados por minuto por miligrama de proteína.



**Figura 32.** Curva de calibração do ácido úrico.

## 6.6. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01 (EUA). A análise da variância foi determinada pela análise One-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett e teste T de Student. Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

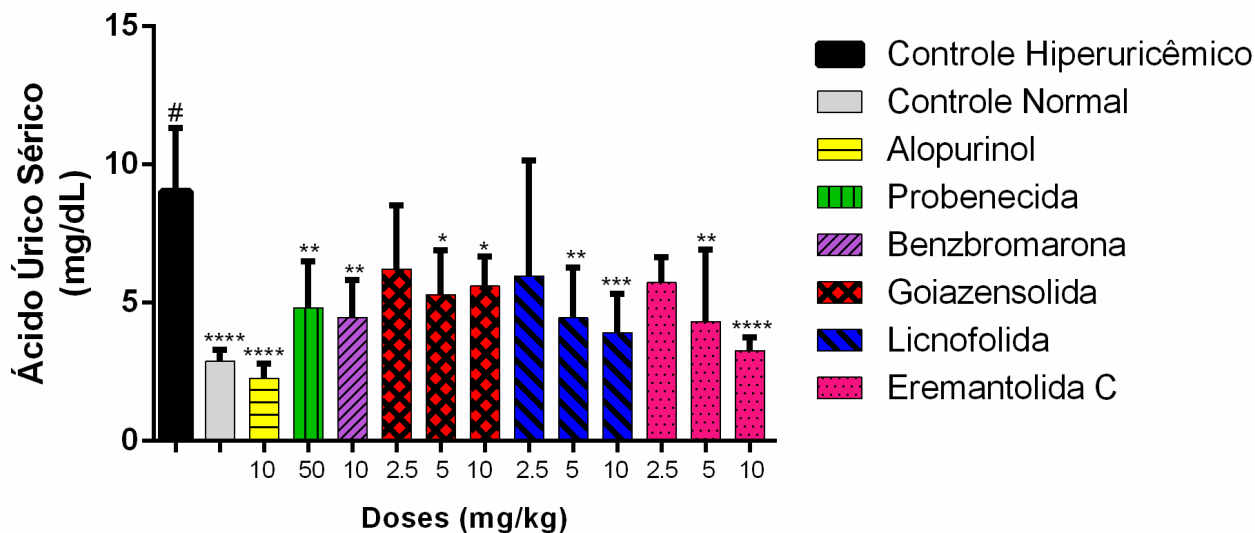
## 6.7. Resultados

### 6.7.1. Dosagem do ácido úrico sérico

A concentração de ácido úrico do grupo controle hiperuricêmico foi de 8,85 mg/dL, significativamente maior que a dosagem no grupo normal (2,87 mg/dL), provando que o modelo foi eficaz no aumento dos níveis de ácido úrico no sangue. O alopurinol, inibidor da xantina oxidase, foi administrado ao grupo controle positivo e promoveu a redução dos níveis séricos de ácido úrico para 2,27 (mg/dL). Os animais tratados com a benzbromarona apresentaram concentração de ácido úrico de 4,47 mg/dL e o grupo tratado com a probenecida apresentou níveis séricos de ácido úrico de 5,77 mg/dL. Todos os grupos tratados com doses de 5 e 10 mg/kg das lactonas sesquiterpênicas demonstraram uma diminuição nos níveis séricos de ácido úrico, como indicado na **Tabela 7** (página 45) e na **Figura 33** (página 44). Licnofolida, na dose de 5 mg/dL, promoveu a redução nos níveis séricos de ácido úrico para 3,93 mg/dL e na dose de 10 mg/dL reduziu a 3,92 mg/mL.



Eremantolida C, nas doses de 5 e 10 mg/kg, promoveu a redução da concentração do ácido úrico no sangue a 3,82 e 3,27 mg/dL, respectivamente. A goiazensolida nas doses de 5 e 10 mg/kg reduziu os níveis para 5,29 e 5,95 mg/dL, respectivamente.



**Figura 33.** Concentrações séricas de ácido úrico em ratos hiperuricêmicos após os tratamentos com as lactonas sesquiterpênicas, alopurinol, probenecida e benzbromarona. #  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal; \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle hiperuricêmico; \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo controle hiperuricêmico; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. grupo controle hiperuricêmico; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vs. grupo controle hiperuricêmico. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet).

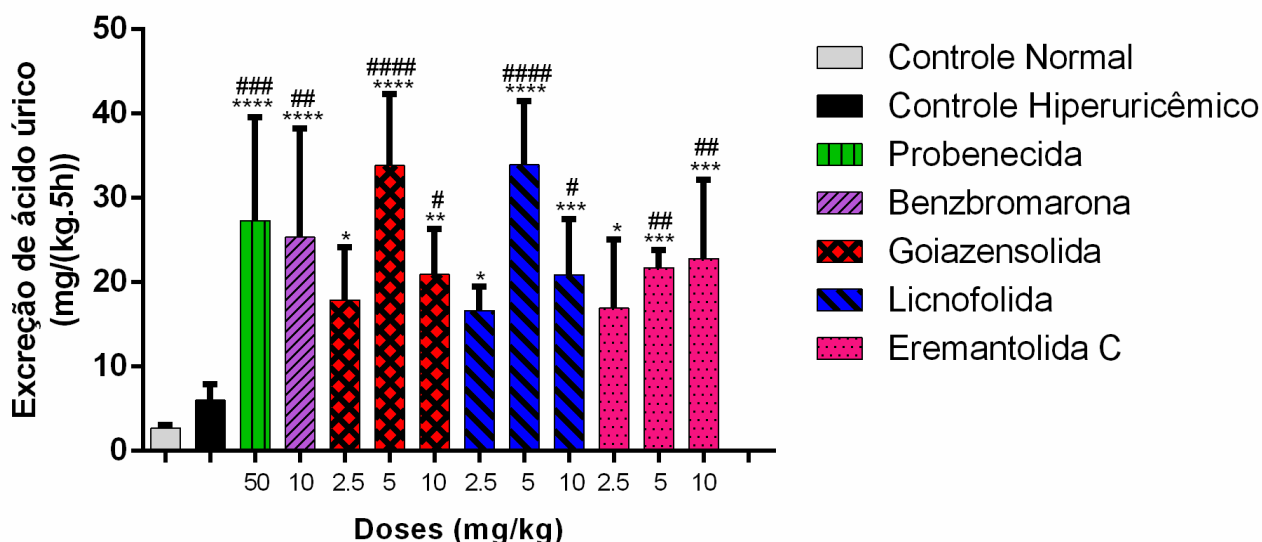
### 6.7.2. Excreção de ácido úrico

A excreção de ácido úrico foi expressa em mg/kg em 5 horas (**Figura 34**, página 46). A excreção nos animais dos grupos controle positivo tratados com os fármacos uricosúricos benzbromarona e probenecida foi de 22,93 mg/kg e 24,59 mg/kg, respectivamente. Licnofolida e goiazensolida, na dose de 5 mg/kg, promoveram aumento na excreção do ácido úrico (**Tabela 7**, página 45). Na dose de 5 mg/kg, eremantolida C elevou a excreção de ácido úrico para 21,72 mg/kg. Na dose de 10 mg/kg, goiazensolida, licnofolida e eremantolida C induziram a excreção de ácido úrico de, respectivamente, 20,93; 20,89 e 22,79 mg/kg. Não houve aumento de excreção de ácido úrico nos ratos tratados com as lactonas sesquiterpênicas na dose de 2,5 mg/kg em relação ao grupo hiperuricêmico.

**Tabela 7.** Efeitos das lactonas sesquiterpênicas e dos controles positivos: benzbromarona, probenecida e alopurinol na ingestão de água, excreção de urina, excreção de ácido úrico e concentração sérica de ácido úrico em ratos hiperuricêmicos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Ingestão de água (mL ± e.p.m.)	Volume de urina (mL ± e.p.m.)	Excreção de ácido úrico (mg/(kg 5h) ± e.p.m.)	Ácido úrico sérico (mg/dL ± e.p.m.)
Controle normal	-	5,7 ± 2,473	5,62 ± 1,550	2,68 ± 0,416	2,87 ± 0,376 <sup>h</sup>
Controle hiperuricêmico	-	6,83 ± 0,830	7,58 ± 0,398	6,03 ± 1,849	8,85 ± 2,281 <sup>d</sup>
Benzbromarona	10	6,10 ± 1,194	6,16 ± 1,042	25,33 ± 12,917 <sup>d,f</sup>	4,47 ± 1,350 <sup>f</sup>
Probenecida	50	6,00 ± 1,527	7,50 ± 2,588	27,29 ± 12,310 <sup>d,g</sup>	5,77 ± 1,509 <sup>f</sup>
Alopurinol	10	4,82 ± 3,021	8,60 ± 0,894	17,22 ± 6,269 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,513 <sup>h</sup>
Goiazensolida	2,5	6,83 ± 1,213	5,57 ± 2,491	17,06 ± 6,104 <sup>a</sup>	6,22 ± 2,067
Goiazensolida	5	3,37 ± 2,310	7,50 ± 2,363	33,86 ± 8,454 <sup>d,h</sup>	5,29 ± 1,455 <sup>e</sup>
Goiazensolida	10	6,33 ± 2,478	4,33 ± 2,640	20,93 ± 5,367 <sup>b,e</sup>	5,61 ± 0,962 <sup>e</sup>
Licnofolida	2,5	4,92 ± 1,426	5,33 ± 1,599	16,66 ± 2,856 <sup>a</sup>	5,97 ± 3,744
Licnofolida	5	3,67 ± 2,285	9,67 ± 3,350	33,93 ± 7,578 <sup>d,h</sup>	3,93 ± 1,911 <sup>f</sup>
Licnofolida	10	5,50 ± 3,819	4,83 ± 2,034	20,89 ± 6,589 <sup>c,e</sup>	3,92 ± 1,276 <sup>g</sup>
Eremantolida C	2,5	6,50 ± 2,500	6,67 ± 3,197	16,93 ± 8,171 <sup>a</sup>	5,73 ± 0,808
Eremantolida C	5	3,33 ± 1,886	6,17 ± 0,898	21,72 ± 2,153 <sup>c,e</sup>	3,82 ± 2,410 <sup>f</sup>
Eremantolida C	10	3,95 ± 0,883	6,00 ± 1,155	22,79 ± 9,352 <sup>c,f</sup>	3,27 ± 0,432 <sup>h</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  vs. Grupo controle normal; <sup>b</sup>  $P < 0,01$  vs. Grupo controle normal; <sup>c</sup>  $P < 0,001$  vs. Grupo controle normal; <sup>d</sup>  $P < 0,0001$  vs. Grupo controle normal, <sup>e</sup>  $P < 0,05$  vs. Grupo controle hiperuricêmico; <sup>f</sup>  $P < 0,01$  vs. Grupo controle hiperuricêmico; <sup>g</sup>  $P < 0,001$  vs. Grupo controle hiperuricêmico; <sup>h</sup>  $P < 0,0001$  vs. Grupo controle hiperuricêmico. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet).



**Figura 34.** Excreção de ácido úrico após o tratamento de ratos hiperuricêmicos com as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses e com os controles positivos usados clinicamente, probenecida e benzbromarona. \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle normal; \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo controle normal; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. grupo controle normal; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal; #  $P < 0,05$  vs. grupo controle hiperuricêmico; ##  $P < 0,01$  vs. grupo controle hiperuricêmico; ###  $P < 0,001$  vs. grupo controle hiperuricêmico; ####  $P < 0,0001$  vs. grupo controle hiperuricêmico. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet).

### 6.7.3. Inibição da xantina oxidase

Alopurinol, inibidor de xantina oxidase hepática utilizado clinicamente, promoveu uma inibição da xantina oxidase de 72,81% em relação ao grupo controle hiperuricêmico. Goiazensolida e licnofolida promoveram a inibição da xantina oxidase hepática de 36,26% e 28,31%, respectivamente, apenas na dose de 10 mg/kg. Nas doses de 5 e 10 mg/kg, eremantolida C foi capaz de inibir a atividade da xantina oxidase hepática em 29,56 e 31,95%, respectivamente. Nenhuma das lactonas sesquiterpênicas promoveu a inibição da XOD na dose de 2,5 mg/kg. Na dose de 5 mg/kg, goiazensolida e licnofolida não foram capazes de inibir a XOD (**Tabela 8**, página 47).

**Tabela 8.** Efeitos das lactonas sesquiterpênicas e do alopurinol sobre a atividade da xantina oxidase hepática em ratos hiperuricêmicos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Atividade da xantina oxidase (nmol/min/mg proteína $\pm$ e.p.m.)	Inibição (%)
Controle normal	-	10,89 $\pm$ 1,033	-
Controle hiperuricêmico	-	18,97 $\pm$ 2,696	-
Alopurinol	10	5,16 $\pm$ 1,002 <sup>c</sup>	72,81
Goiazensolida	2,5	21,95 $\pm$ 3,438	-
Goiazensolida	5	19,67 $\pm$ 1,909	-
Goiazensolida	10	12,09 $\pm$ 2,174 <sup>b</sup>	36,26
Licnofolida	2,5	22,03 $\pm$ 2,146	-
Licnofolida	5	20,36 $\pm$ 2,559	-
Licnofolida	10	13,60 $\pm$ 2,748 <sup>a</sup>	28,31
Eremantolida C	2,5	19,56 $\pm$ 2,922	-
Eremantolida C	5	13,36 $\pm$ 2,230 <sup>a</sup>	29,56
Eremantolida C	10	12,91 $\pm$ 2,016 <sup>a</sup>	31,95

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  vs. grupo controle hiperuricêmico; <sup>b</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle hiperuricêmico; <sup>c</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle hiperuricêmico. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnet).

## 6.8. Discussão

Espécies no gênero *Lychnophora*, conhecidas como arnica brasileira, são utilizadas pela população no tratamento de inflamações, dor, feridas e reumatismo (SAÚDE et al., 1998). Além disso, diversas atividades farmacológicas de compostos isolados destas plantas já foram relatadas. O estudo realizado por De Souza e colaboradores (2012), demonstrou a atividade anti-hiperuricêmica das lactonas sesquiterpênicas eremantolida C e licnofolida, isoladas de *Lychnophora trichocarpa*. Estas mesmas lactonas também apresentaram atividade anti-inflamatória (FERRARI et al., 2013), antitumoral (SAÚDE-GUIMARÃES et al., 2014) e antibacteriana (SAÚDE et al., 2002). Ugoline e colaboradores demonstraram que a goiazensolida, isolada de *L. passerina*, apresentou atividade anti-inflamatória e anti-hiperuricêmica pela inibição da xantina oxidase hepática. Entretanto, o mecanismo da atividade anti-hiperuricêmica destas lactonas não foi totalmente elucidado

nestes estudos, tendo em vista que há dois possíveis mecanismos para tal ação: inibição da xantina oxidase e aumento da excreção de ácido úrico. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de licnofolida, eremantolida C e goiazensolida sobre a hiperuricemia, em doses menores em relação aos estudos realizados anteriormente, e elucidar os mecanismos de ação hiporuricêmico: inibição da síntese e/ou aumento na excreção do ácido úrico.

A busca por novos medicamentos para o tratamento da hiperuricemia e da gota é constante. Atualmente, os AINES são usados para o tratamento da inflamação causada pelo depósito do ácido úrico nas articulações (BILLY et al., 2018). Inibidores de xantina oxidase (alopurinol e febuxostat) e agentes uricosúricos (benzbromarona e probenecida) são usados como anti-hiperuricêmicos principalmente na fase crônica, a fim de evitar as crises agudas e outras complicações (KYDD et al., 2013). Nenhum dos medicamentos disponíveis no mercado trata a hiperuricemia e a inflamação concomitantemente, além de apresentarem efeitos adversos severos (KONG et al., 2000; AHMED et al., 2016).

Produtos naturais são uma alternativa para o tratamento de diversas doenças, incluindo a gota. As lactonas sesquiterpênicas avaliadas no presente estudo foram capazes de diminuir os níveis séricos de ácido úrico em ratos hiperuricêmicos, quando usadas nas doses de 5 e 10 mg/kg.

No estudo previamente realizado por De Souza e colaboradores (2012), licnofolida e eremantolida C foram avaliadas em modelo animal de hiperuricemia induzida por oxonato de potássio em camundongos Swiss, na dose de 25 mg/kg, e promoveram a diminuição significativa nos níveis séricos de ácido úrico. Porém, não demonstraram atividade sobre a inibição da xantina oxidase hepática e o efeito uricosúrico não foi avaliado. No presente estudo, os tratamentos com licnofolida e eremantolida C na dose de 10 mg/kg foram capazes de reduzir os níveis séricos de ácido úrico em ratos Wistar hiperuricêmicos, de inibir efetivamente a atividade da xantina oxidase hepática, além de promover expressiva ação uricosúrica, evidenciando que nesta dose, ambas as lactonas sesquiterpênicas exerceram o efeito anti-hiperuricêmico pelos dois mecanismos de ação. Além disso, na dose de 5 mg/kg, eremantolida C apresentou resposta uricosúrica e de inibição da xantina oxidase hepática sem diferença significativa de quando administrada na dose de 10 mg/kg (teste t de Student). Licnofolida, na dose de 5 mg/kg, não inibiu a xantina oxidase hepática, porém sua ação uricosúrica nessa dose foi ainda maior que a apresentada pelos fármacos de referência benzbromarona e probenecida. A excreção de ácido úrico promovida pela licnofolida foi significativamente maior na dose de 5 mg/kg quando comparada à dose de 10 mg/kg ( $P < 0,01$ ; teste t de Student). Licnofolida e eremantolida C promoveram a redução

dos níveis de ácido úrico sanguíneo a níveis semelhantes ao grupo controle normal, fato importante de ser notado pois a redução excessiva desses níveis pode causar efeitos indesejáveis, já que o ácido úrico é responsável por exercer atividade antioxidante e proteger o DNA de danos causados por radicais livres (MURAOKA e MIURA, 2003).

Ugoline e colaboradores (2017) mostraram que a goiazensolida administrada a camundongos Swiss hiperuricêmicos, na dose de 10 mg/kg, possui ação anti-hiperuricêmica pela inibição da xantina oxidase hepática (63,83%). Neste estudo, a goiazendolida nas doses de 5 e 10 mg/kg também promoveu a diminuição dos níveis séricos de ácido úrico em ratos hiperuricêmicos. Na dose de 5 mg/kg não houve inibição da xantina oxidase hepática, mas houve expressiva ação uricosúrica. Nesta dose, goiazensolida foi mais eficaz que os fármacos usados clinicamente, benzbromarona e probenecida. Na dose de 10 mg/kg, a goiazensolida foi capaz de inibir a xantina oxidase hepática em 36,26% e também obteve efeito uricosúrico, porém a excreção de ácido úrico foi significativamente maior na dose de 5 mg/kg em comparação com a dose de 10 mg/kg ( $P < 0,05$ ; teste t de Student). A inibição da xantina oxidase no presente estudo - 36,26% - foi menor que o resultado obtido por Ugoline e colaboradores (2017) - 63,83% - que pode ser explicado devido ao modelo experimental, no qual foram usados ratos Wistar e no estudo anterior foram utilizados camundongos Swiss. Os resultados obtidos dos tratamentos com a goiazensolida demonstram que na dose de 5 mg/kg, o mecanismo uricosúrico é o responsável pela diminuição dos níveis de ácido úrico sanguíneo, e na dose de 10 mg/kg, a redução ocorreu por ambos os mecanismos, inibição da xantina oxidase hepática e ação uricosúrica.

## **7. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-ARTRITE GOTOSA**

### **7.1. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **7.1.1. Reagentes, solventes, material e equipamentos**

Os seguintes reagentes e solventes foram usados: cloreto de sódio (CAAL), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Vetec), fosfato de sódio monobásico (Synth), DMSO – dimetilsulfóxido (Vetec), tween 80 U.S.P. (Synth), água destilada, fosfato de potássio monobásico (Synth). Os medicamentos veterinários ketamina (Dopalen injetável, Ceva

Santé Animale) e xilazina (Dopaser injetável, Hertape Calier) e os fármacos indometacina (Sigma) e vitamina C (Sigma).

Seringas de 1 mL (BD Plastipak) e agulhas hipodérmicas (BD Precision Glide) foram usadas para administração das soluções, tratamentos e anestesia aos ratos. O espectrofotômetro UV-visível Cary 50 Bio *Varian* – Austrália – e cubetas de quartzo (10x10 mm, 3500 µL; 10x10 mm, 600 µL) empregados nas leituras das absorbâncias. Foi usado o anestesiômetro Insight Equipamentos (São Paulo, Brasil), o analisador hematológico veterinário Mindray BC-2800 Vet e o citômetro de fluxo BD FACSCalibur. Utilizou-se também a centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810 R, lavadora ultra-sônica Unique, balanças Shimadzu e Quimis, vórtex Motion II (Logen Scientific) e pHmetro Digimed DM20.

### **7.1.2. Preparo das soluções**

#### **7.1.2.1. Solução tampão PBS 10x pH 7,2**

Cloreto de sódio (82,0 g), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (19,83 g) e fosfato de sódio monobásico (3,55 g) foram adicionados a um balão volumétrico de 1 L e o volume foi aferido com água destilada. O pH 7,2 foi aferido em pHmetro. A solução foi armazenada em geladeira.

#### **7.1.2.2. Solução tampão PBS 1x**

Uma solução tampão PBS 10x (100 mL) em temperatura ambiente foi adicionada a balão volumétrico de 1L e o volume foi completado com água destilada. A solução foi preparada no dia do uso.

#### **7.1.2.3. Solução de albumina bovina (BSA) 3% em PBS 1x**

Três gramas de albumina bovina foram adicionados a balão de 100 mL e o volume aferido com a solução tampão de PBS 1x.

#### **7.1.2.4. Indometacina e vitamina C**

A solução do fármaco indometacina foi preparada, na dose de 3 mg/kg, diluída em 5% de Tween 80 e água destilada. Esta solução foi utilizada como controle positivo para a

avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. A vitamina C, utilizada como controle positivo para a avaliação da atividade antioxidante, foi preparada na dose de 250 mg/kg por diluição em água destilada.

#### **7.1.2.5. Licnofolida, eremantolida C e goiazensolida**

As lactonas sesquiterpênicas foram preparadas nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg por diluição no veículo DMSO:Tween 80:Água destilada (10:10:80) e homogeneizadas com auxílio do aparelho de vórtex.

### **7.2. Animais**

Para os experimentos foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos em idade adulta pesando entre 20-25 gramas, provenientes do Biotério Central da UFOP. Os animais foram mantidos no laboratório multiusuário *in vivo* do PPG CiPharma durante os experimentos, respeitando o ciclo 12/12h claro/escuro. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da UFOP (CEUA-UFOP) – protocolo 2016/54.

### **7.3. Avaliação da atividade antinociceptiva: teste de pressão crescente na pata de camundongos (filamentos de von Frey)**

A dor é uma experiência que envolve a resposta do sistema nociceptivo induzida por estímulos mecânicos, térmicos, químicos, elétricos ou fisiopatológicos. A resposta pode ser neurodegenerativa e/ou comportamental, servindo como um alerta na tentativa de proteger o organismo contra ameaças, a fim de limitar as potenciais consequências. A dor é uma sensação subjetiva e individual, sendo assim, a hipernocicepção pode ser avaliada em animais por estímulos intensos que ativam fibras neuronais gerando respostas comportamentais (SHERRINGTON, 1910; LE BARS et al., 2001).

Para avaliar a resposta de hipernocicepção dos camundongos frente ao estímulo nocivo, foi seguido o método descrito por Möller e colaboradores (1998) e por Cunha e colaboradores (2004). Visa avaliar a sensibilidade ao estímulo mecânico realizado por meio do analgesímetro eletrônico von Frey, que é um transdutor de pressão acoplado a um contador digital de força representada em gramas. Uma ponteira de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro foi adaptada à ponta do filamento do aparelho para o contato com o animal.



A força máxima que o aparelho é capaz de registrar é de 150,0 g, com precisão de 0,1 g até a força de 80,0 g. Os animais foram pesados e divididos em grupos de 6 animais cada.

Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados nas caixas de acrílico com divisórias individuais, com assoalho de rede feita de arame não maleável, por tempo necessário à adaptação do animal (15-30 minutos) (**Figura 35**, página 53). A pressão na pata dos animais foi medida no tempo 0 h (antes da indução da inflamação), aplicando-se por entre as malhas da rede, uma pressão crescente no centro da pata do animal até que o mesmo produzisse a resposta de sacudida (“*flinch*”) (**Figura 36**, página 53). Estes estímulos foram repetidos por até 6 vezes (por animal) até se obter a média de 3 medidas similares da resposta “*flinch*”.

Os animais receberam 0,2 mL dos tratamentos como descrito abaixo, por via intragástrica (i.g.):

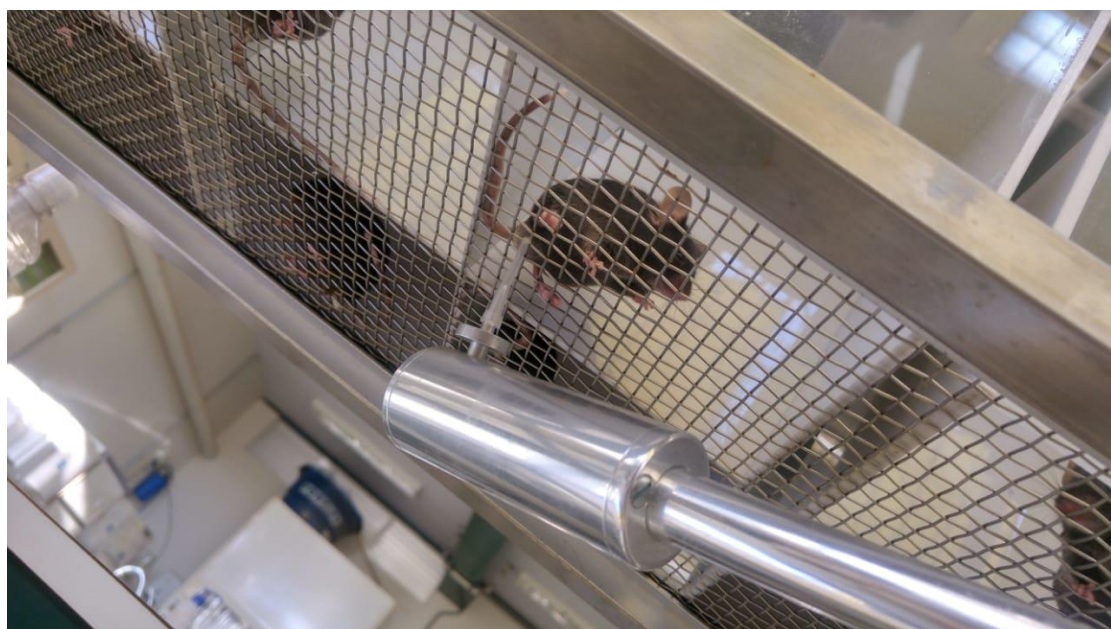
- Grupo 1: Controle normal: recebeu apenas o veículo.
- Grupo 2: Controle negativo: recebeu apenas o veículo.
- Grupo 3: Controle positivo: recebeu indometacina 3 mg/kg.
- Grupo 4: recebeu Licnofolida 2,5 mg/kg.
- Grupo 5: recebeu Licnofolida 5 mg/kg.
- Grupo 6: recebeu Licnofolida 10 mg/kg.
- Grupo 7: recebeu Eremantolida C 2,5 mg/kg.
- Grupo 8: recebeu Eremantolida C 5 mg/kg.
- Grupo 9: recebeu Eremantolida C 10 mg/kg.
- Grupo 10: recebeu Goiazensolida 2,5 mg/kg.
- Grupo 11: recebeu Goiazensolida 5 mg/kg.
- Grupo 12: recebeu Goiazensolida 10 mg/kg.

Após 1 hora da administração dos tratamentos, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com a associação dos anestésicos ketamina/xilazina (150/10 mg/kg). Na mesma perna que foi medida a pressão na pata, foi aplicada uma injeção intra-articular (articulação tibiofemoral) de cristais de urato monossódico (MSU) suspensos em tampão PBS 1x (100 µg em 10 µL) nos animais dos grupos teste e grupo controle positivo. Os animais dos grupos controle negativo e controle normal receberam a injeção intra-articular de 10 µL de tampão PBS 1x. Depois de 6 horas da aplicação das injeções intra-articulares, os animais foram colocados novamente nas caixas de acrílico para a medida da pressão na pata no tempo 6h.



**Figura 35.** Animais posicionados nas caixas de acrílico para o teste de pressão crescente na pata.

Fonte: própria.



**Figura 36.** Teste de pressão crescente na pata de camundongos (von Frey).

Fonte: própria.

## **7.4. Avaliação da atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa**

A artrite gotosa foi induzida pela injeção intra-articular de MSU, segundo o modelo descrito por Amaral e colaboradores (2012). Após 6 horas da indução da inflamação e após a medida da hipernocicepção do tempo 6h, os animais foram eutanasiados pela injeção i.p. da associação de ketamina/xilazina (450/30 mg/kg). A cavidade articular de cada animal foi lavada duas vezes com 5  $\mu$ L da solução de PBS 1x – 3% de BSA, adicionados a eppendorfs contendo 90  $\mu$ L da solução de PBS 1x – 3%, totalizando 100  $\mu$ L de lavado intra-articular. O tecido periarticular foi removido e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. Com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória na artrite aguda, a migração de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) foram avaliadas.

### **7.4.1. Contagem de neutrófilos**

Os eppendorfs contendo os lavados intra-articulares foram homogeneizados (vórtex) e foi feita a contagem total de leucócitos utilizando o analisador hematológico veterinário (Mindray BC-2800 Vet). Utilizou-se de cerca de 10  $\mu$ L de cada lavado para a realização da contagem total de leucócitos. O restante do lavado foi pipetado para tubos de ensaio separadamente, e usados para a dosagem de neutrófilos no citômetro de fluxo. O marcador de neutrófilos (1  $\mu$ L) foi diluído em 499  $\mu$ L de PBS 1x com 10% de soro fetal bovino e 10% de soro de rato). Após, foi adicionado 10  $\mu$ L do marcador diluído a cada tubo de ensaio contendo o lavado articular. As soluções nos tubos de ensaio foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a temperatura ambiente no escuro por 20 minutos. Foi adicionado 1 mL de PBS 1x a cada tubo de ensaio e foram então centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes descartados, sendo a camada líquida inferior mantida (aproximadamente 100  $\mu$ L). As amostras foram então analisadas por citômetro de fluxo para obtenção da porcentagem de neutrófilos presentes em cada amostra.

### **7.4.2. Dosagem da citocina IL-1 $\beta$**

Homogenatos foram preparados com os tecidos periarticulares em 1 mL de tampão PBS 1x. A dosagem da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  foi feita com o kit ELISA ABTS padrão

murino IL-1 $\beta$  (Peprotech), seguindo as orientações do fabricante. Foram preparadas e filtradas a solução de lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS 1x), solução de bloqueio (1% de BSA em PBS 1x), diluente (0,05% de Tween 20, 0,1% de BSA em PBS 1x), e solução líquida do substrato ABTS (200  $\mu$ L da solução de ABTS 15 mg/mL e 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% em 10 mL de tampão citrato pH 4,0). O anticorpo de captura foi diluído em PBS 1x para uma concentração de 2,0  $\mu$ g/mL, sendo imediatamente adicionados 100  $\mu$ L a cada poço da placa de ELISA de 96 poços. A placa foi então incubada a 25°C durante a noite (máximo de 18 horas de incubação). Os poços foram lavados com a solução de lavagem (4 x 300  $\mu$ L), adicionados de 300  $\mu$ L da solução de bloqueio por poço e incubados a 25°C por 1 hora. O procedimento se repetiu por 4 vezes. O padrão de IL-1 $\beta$  foi diluído gradualmente no diluente de 4000 pg/mL a zero. A cada poço, em duplicata, foram adicionados imediatamente 100  $\mu$ L do padrão e da amostra (homogenato do tecido periarticular). A placa de ELISA foi incubada a 25°C por 2 horas e após, lavada 4 vezes com a solução de lavagem. O conjugado avidin-HRP foi diluído a 1:2000 em diluente e 100  $\mu$ L foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada por 30 min a 25°C e após, os poços lavados novamente. 100  $\mu$ L da solução ABTS foram adicionados a cada poço para iniciar a reação, sendo o desenvolvimento da coloração monitorado por 50 minutos no leitor de ELISA a 405 nm. A reação foi parada com 50  $\mu$ L de solução 1% SDS em água milli-Q.

#### **7.4.3. Dosagem da citocina TNF- $\alpha$**

A dosagem da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  foi realizada utilizando o kit ELISA ABTS padrão murino TNF- $\alpha$  (Peprotech), seguindo as orientações do fabricante. Utilizou-se as mesmas soluções descritas para a dosagem da IL-1 $\beta$ . O anticorpo de captura foi diluído em PBS 1x para uma concentração de 2,0  $\mu$ g/mL, sendo imediatamente adicionados 100  $\mu$ L a cada poço da placa de ELISA de 96 poços. A placa foi então incubada a 25°C durante a noite (máximo de 18 horas de incubação). Os poços foram lavados com a solução de lavagem (4 x 300  $\mu$ L), adicionados de 300  $\mu$ L da solução de bloqueio por poço e incubados a 25°C por 1 hora. Este procedimento foi realizado por 4 vezes. O padrão de TNF- $\alpha$  foi diluído gradualmente no diluente de 1000 pg/mL a zero. 100  $\mu$ L do padrão e da amostra (homogenato do tecido periarticular) foram adicionados imediatamente a cada poço, em duplicata. A placa de ELISA foi incubada a 25°C por 2 horas e após, lavada 4 vezes com a solução de lavagem. O conjugado avidin-HRP foi diluído a 1:2000 em diluente e 100  $\mu$ L foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada por 30 min a 25°C e após,

os poços foram novamente lavados. Para iniciar a reação, 100 µL da solução de ABTS foram adicionados a cada poço. O desenvolvimento da coloração foi monitorado por 25 minutos no leitor de ELISA a 405 nm. A reação foi parada com 50 µL de solução 1% SDS em água milli-Q.

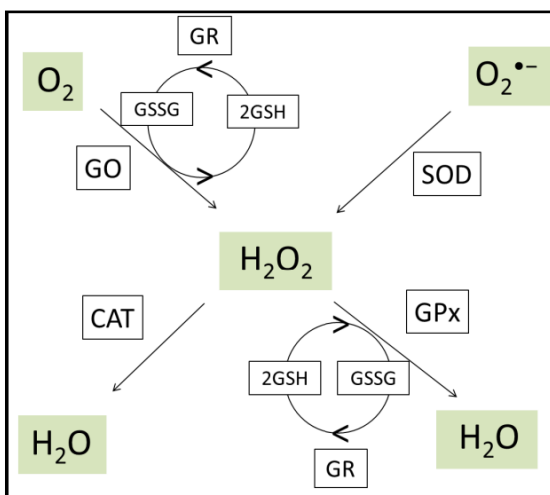
### 7.5. Avaliação das defesas antioxidantes

O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos (agentes oxidantes) e sua eliminação pelos antioxidantes leva ao chamado estresse oxidativo, que pode levar à lesão de importantes células e moléculas do organismo (REUTER et al., 2010). O sistema de defesa antioxidante é capaz de se adaptar ao aumento dos níveis de oxidantes visando manter o equilíbrio oxidante-antioxidante. Este sistema é composto por enzimas como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, além de outras moléculas não-enzimáticas como albumina, bilirrubina e glutathione. O desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes no organismo pode gerar o estresse oxidativo, que está diretamente relacionado a doenças inflamatórias já que o mesmo pode causar a inflamação, que por sua vez, induz o estresse oxidativo (SITI et al., 2015). No processo inflamatório, mastócitos e leucócitos são recrutados ocasionando um aumento da respiração celular, devido ao aumento da absorção de oxigênio, levando a liberação e ao acúmulo de ERO no local. Outros mediadores são produzidos, tais como metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e quimiocinas, que recrutam células inflamatórias levando a produção de mais ERO (REUTER et al., 2010). A vitamina E, a glutathione reduzida (GSH) e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) participam na linha de defesa de proteção aos agentes oxidantes. Como uma segunda via de proteção, visando reparar os danos causados, está o ácido ascórbico, a glutathione reductase (GR) e a GPx (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A enzima SOD pode ser encontrada em três formas, sendo que todas catalisam a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado pode então ser convertido a água, reação catalisada pela CAT e pela GPx. A afinidade do peróxido de hidrogênio é maior pela GPx que pela CAT, portanto, quanto maior a concentração intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, maior será a atividade da catalase (NAUDI et al 2011).

A **Figura 37** (página 57) mostra a reação de conversão do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio, catalisada pela SOD e a conversão de oxigênio em peróxido de hidrogênio por ação da glutathione oxidase (GO). Além disso, mostra também a

neutralização do peróxido de hidrogênio convertido a água pela ação da CAT ou da GPx. As reações catalisadas por GPX e GO oxidam a glutathiona reduzida (GSH) à sua forma oxidada (GSSG). Ocorre também a redução de GSSH a GSH, reação catalisada pela glutathiona redutase (GR) (RABELO, 2017).



**Figura 37.** Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes. GR = Glutathiona redutase; GO = Glutathiona oxidase; GSSG = Glutathiona oxidada; GSH = Glutathiona reduzida; SOD = superóxido dismutase; GPx = Glutathiona peroxidase; CAT = catalase.

Fonte: Rabelo, 2017.

Considerando a relação entre o estresse oxidativo e o processo inflamatório, foram feitas as dosagens das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

### 7.5.1. Preparo dos homogenatos

O tecido foi descongelado até atingir temperatura ambiente e triturado com auxílio do homogeneizador de órgãos em 500  $\mu$ L de PBS 1x.

### 7.5.2. Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada segundo o método de Lowry (1951). Para isso, foram preparadas as seguintes soluções:

#### i. Solução A

30 gramas de carbonato de sódio e 4 gramas de hidróxido de sódio foram adicionados a um balão volumétrico de 1 L. Este foi aferido com água destilada.

## **ii. Solução B**

Uma solução de sulfato de cobre 2% foi preparada em balão volumétrico de 10 mL com 0,2 g de sulfato de cobre e água destilada.

## **iii. Solução C**

Uma solução de tartarato de sódio e potássio 4% foi preparada em um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 0,4 g de tartarato de Na e K e o volume foi aferido com água destilada.

## **iv. Solução ABC**

Em erlenmeyer foram homogeneizados 1 mL da solução B, 1 mL da solução C e 100 mL da solução A.

## **v. Solução de Folin**

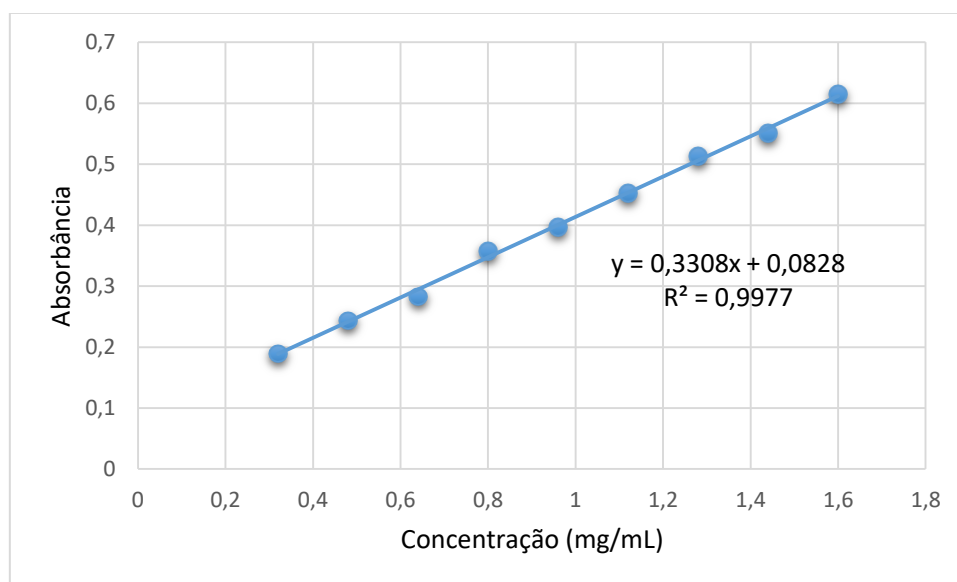
No momento da dosagem das proteínas totais, foi homogeneizado 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em 2 mL de água destilada, mantido em erlenmeyer protegido da luz.

### **• Procedimento**

Para um eppendorf foram pipetados 25  $\mu$ L do homogenatos e 475  $\mu$ L de água destilada. Estes foram homogeneizados em aparelho de vórtex. Em ambiente escuro, 40  $\mu$ L do homogenato diluído foram pipetados para tubo de ensaio e acrescidos de 400  $\mu$ L da solução ABC. A solução ficou encubada no escuro por 10 minutos a temperatura ambiente. Os tubos de ensaio contendo a solução anterior receberam 40  $\mu$ L da solução de Folin. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 700 nm. As dosagens foram feitas em triplicata.

- **Curva padrão**

Para obter os valores da concentração de proteínas totais, foi feita uma curva padrão utilizando-se proteína albumina do soro bovino (BSA) nas concentrações de 0,32; 0,48; 0,64; 0,8; 0,96; 1,12; 1,28; 1,44 e 1,6 mg/mL. Obteve-se a curva e equação da reta ilustradas na **Figura 38**.



**Figura 38.** Curva padrão de proteínas totais.

### 7.5.3. Dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase é uma enzima chave na defesa antioxidante, catalisando a reação de dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A dosagem da SOD foi feita como descrito por Dieterich e colaboradores (2000) e; Marklund e Marklund (1974), com adaptações. O pirogalol auto-oxida facilmente em meio básico formando o radical superóxido, responsável pela redução do MTT à cristais de formazana (MTT reduzido). O método para avaliação da atividade de SOD baseia-se na capacidade desta enzima em competir pelo radical superóxido. A concentração da SOD é então quantificada em unidades relativas, que é a quantidade de enzima capaz de inibir a redução do MTT em 50% (MARKLUND e MARKLUND, 1974).

As seguintes soluções foram preparadas no dia do uso:

- Solução de MTT: 22 mg de MTT adicionados a 4 mL de PBS 1x.
- Solução de pirogalol: 2 mg de pirogalol adicionados a 160 mL de PBS 1x.



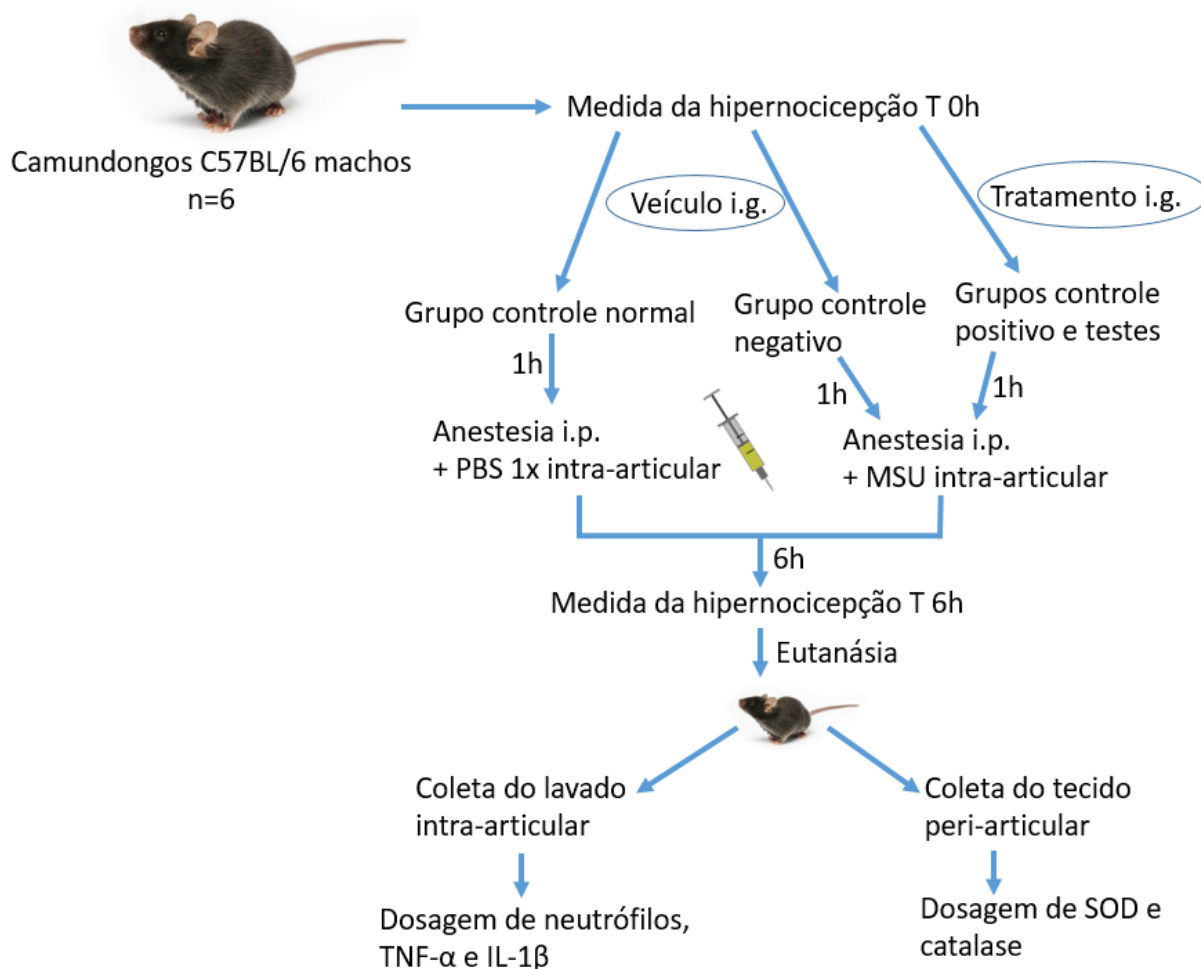
- **Procedimento**

30  $\mu\text{L}$  do homogenato foram pipetados, em triplicata, para uma placa de ELISA de 96 poços, exceto para os poços do branco que receberam 45  $\mu\text{L}$  de PBS 1x. Os poços referentes ao padrão receberam 30  $\mu\text{L}$  de PBS 1x. A todos os poços foram adicionados 99  $\mu\text{L}$  de PBS 1x e 6  $\mu\text{L}$  da solução de MTT. Após, 15  $\mu\text{L}$  da solução de pirogalol foram adicionados a todos os poços, exceto aos do branco. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 5 minutos e a reação foi parada com 150  $\mu\text{L}$  de DMSO, adicionados a cada poço. A leitura da absorbância foi feita a 570 nm no leitor de ELISA.

#### **7.5.4. Dosagem da enzima catalase (CAT)**

A quantificação da enzima catalase foi realizada de acordo com o método proposto por Aebi (1984), com modificações. A catalase é uma hidroperoxidase, enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. Sendo assim, a atividade da enzima é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio que possui coloração detectável no espectrofotômetro a 240 nm. Desta forma, o método baseia-se na capacidade da catalase em decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, diminuindo a coloração da solução. Para iniciar a dosagem, foi preparada uma solução de peróxido de hidrogênio adicionando-se 8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 5 mL de PBS 1x. O espectrofotômetro foi zerado a 240 nm com água destilada e leu-se o branco em triplicata (10  $\mu\text{L}$  de cada homogenato e 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1x). Após, a reação foi iniciada ao adicionar 10  $\mu\text{L}$  de homogenato em uma cubeta contendo 500  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As leituras das absorbâncias foram realizadas a 240 nm, nos tempos de 0 segundos ( $T_0$ ), 30 segundos ( $T_{30}$ ) e 60 segundos ( $T_{60}$ ). As análises foram feitas em triplicata e os procedimentos realizados no escuro. A hidrólise de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto é equivalente a uma unidade (U) de catalase.

Um resumo dos procedimentos para avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-artrite gotosa e antioxidante é mostrado na **Figura 39** (página 61).



**Figura 39.** Esquema da avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-artrite e antioxidante em camundongos C57BL/6.

## 7.6. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01 (EUA). A análise da variância foi determinada pela análise One-way (ANOVA) seguida do teste de Dunnett e teste de Tukey. Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 7.7. Resultados

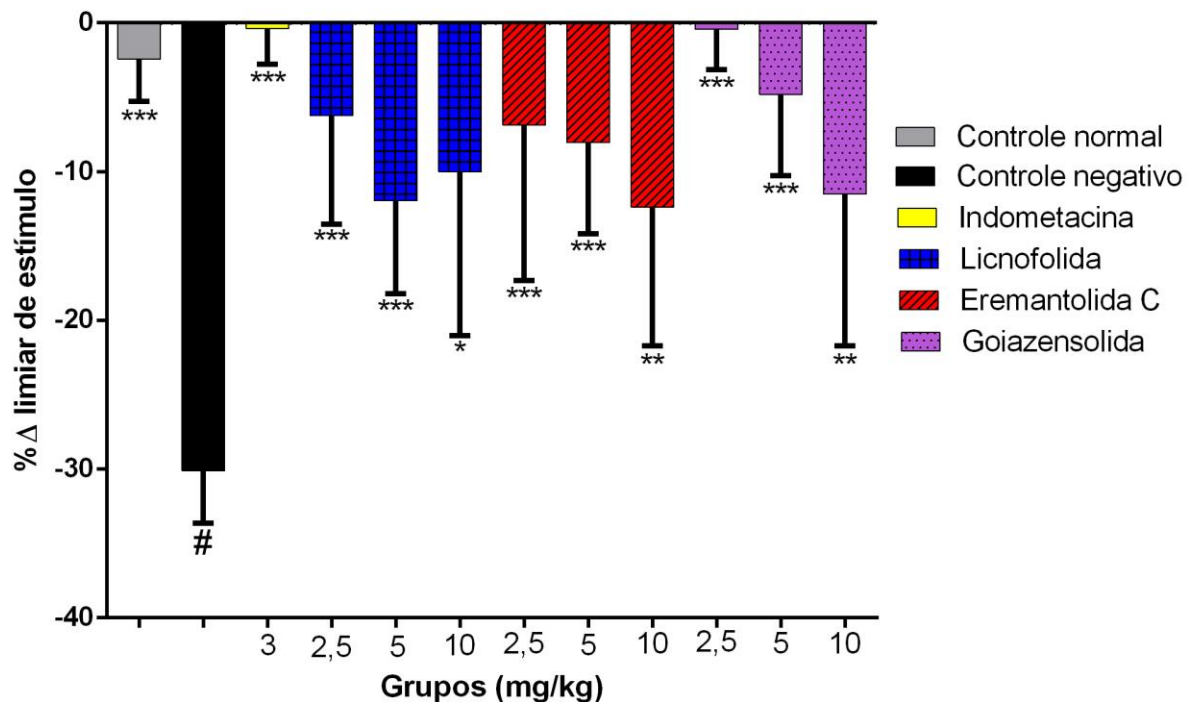
### 7.7.1. Atividade antinociceptiva

Para obter a intensidade da hipernocicepção, calculou-se a variação na pressão obtida entre os tempos 0h e 6h. Estes valores foram calculados em termos de % de variação do limiar de estímulo de cada animal, para que os resultados individuais possam ser nivelados em termos de porcentagem (**Tabela 9**). O gráfico foi plotado com barras correspondentes a cada grupo (**Figura 40**, página 63).

**Tabela 9.** Hipernocicepção dos animais representada pela % de variação da pressão na pata (gramas) do limiar de estímulo entre os tempos 0h e 6h após inflamação induzida por injeção intra-articular de MSU e tratamento com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.

<b>Grupos</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Pressão na pata (g) T0h ± e.p.m.</b>	<b>Pressão na pata (g) T6h ± e.p.m.</b>	<b>% Δ limiar de estímulo ± e.p.m.</b>
<b>Controle normal</b>	-	6,38 ± 0,544	6,22 ± 0,523	-2,42 ± 2,863 <sup>c</sup>
<b>Controle negativo</b>	-	7,56 ± 0,127	5,28 ± 0,216	-30,12 ± 3,527 <sup>d</sup>
<b>Indometacina</b>	3	6,51 ± 0,608	6,48 ± 0,596	-0,36 ± 2,423 <sup>c</sup>
<b>Licnofolida</b>	2,5	6,86 ± 0,938	6,38 ± 0,559	-6,23 ± 7,291 <sup>c</sup>
<b>Licnofolida</b>	5	6,67 ± 0,415	5,86 ± 0,479	-11,96 ± 6,262 <sup>c</sup>
<b>Licnofolida</b>	10	6,79 ± 0,880	6,08 ± 0,926	-10,00 ± 11,016 <sup>a</sup>
<b>Eremantolida C</b>	2,5	7,02 ± 0,625	6,49 ± 0,339	-6,85 ± 10,457 <sup>c</sup>
<b>Eremantolida C</b>	5	6,07 ± 0,413	5,59 ± 0,605	-8,04 ± 6,150 <sup>c</sup>
<b>Eremantolida C</b>	10	6,59 ± 0,634	5,74 ± 0,418	-12,38 ± 9,329 <sup>b</sup>
<b>Goiazensolida</b>	2,5	6,66 ± 0,723	6,63 ± 0,762	-0,43 ± 2,703 <sup>c</sup>
<b>Goiazensolida</b>	5	5,97 ± 0,475	5,69 ± 0,609	-4,81 ± 5,475 <sup>c</sup>
<b>Goiazensolida</b>	10	6,62 ± 0,719	5,85 ± 0,879	-11,51 ± 10,208 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; <sup>b</sup>  $P < 0,001$  vs. grupo controle negativo; <sup>c</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo; <sup>d</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).



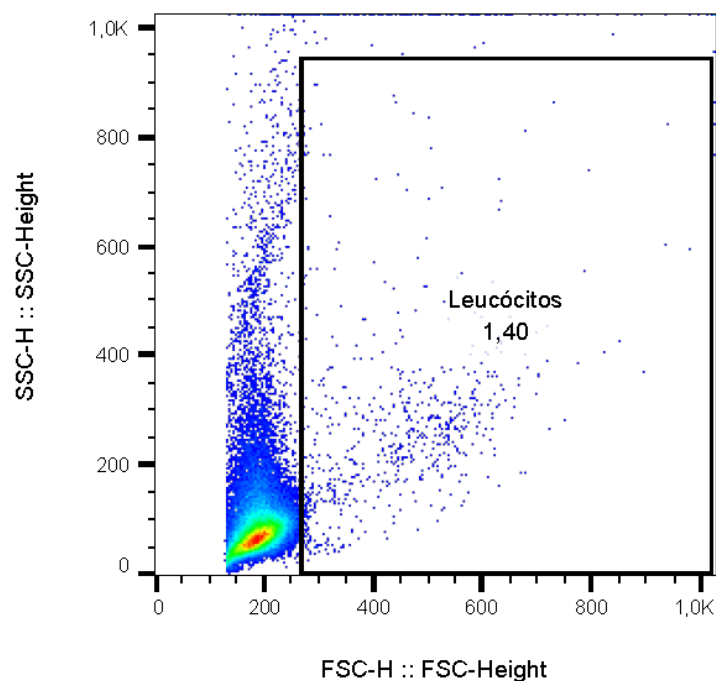
**Figura 40.** Efeitos induzidos pelas lactonas sesquiterpênicas devido ao estímulo no tempo 0h e 6h após inflamação induzida por injeção intra-articular de MSU. \*  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; \*\*  $P < 0,001$  vs. grupo controle negativo; \*\*\*  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo; #  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

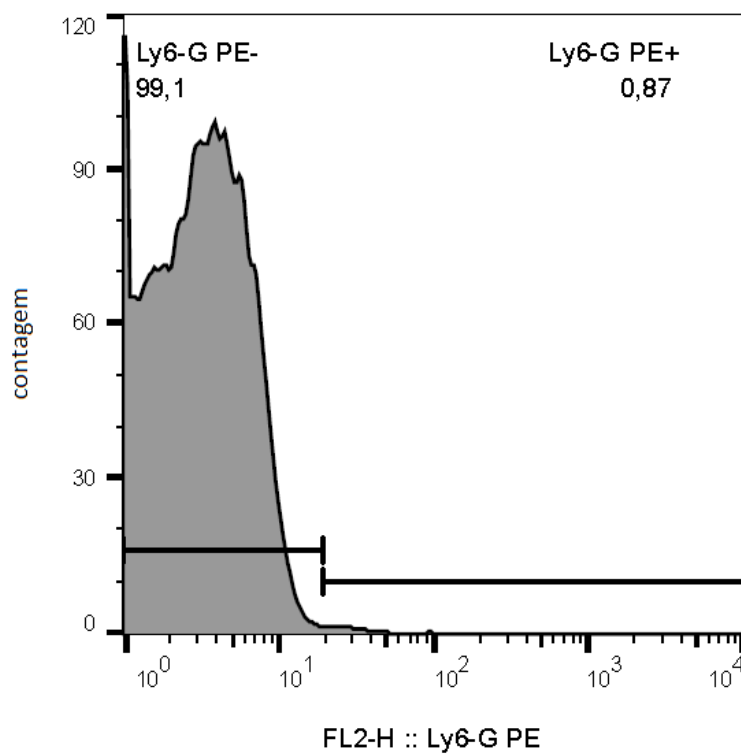
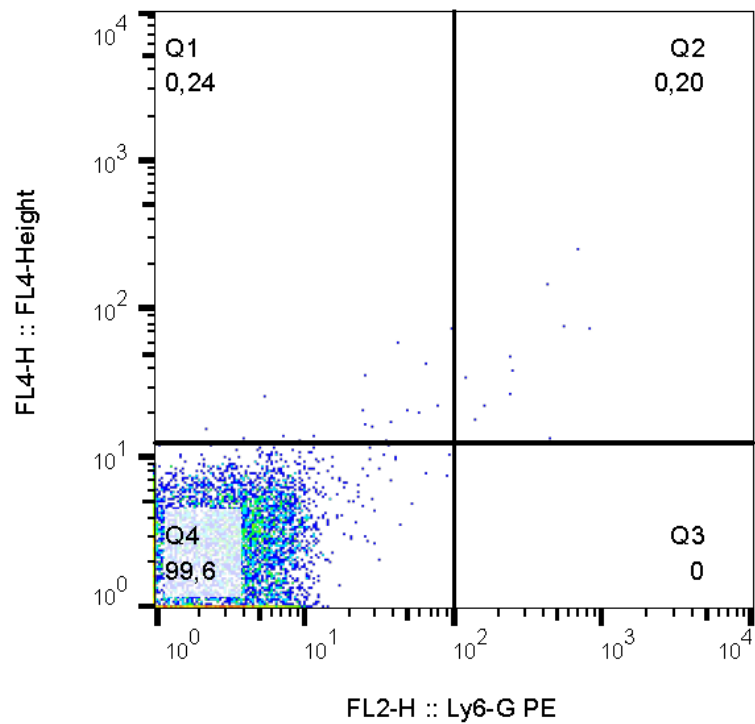
Os animais do grupo controle normal, que receberam apenas o veículo e injeção intra-articular de PBS 1x, apresentaram uma porcentagem de variação do limiar de estímulo de -2,42 %, significativamente menor que do grupo controle negativo (-30,12 %) (teste de Tukey) que recebeu a injeção intra-articular de MSU e como tratamento apenas o veículo. A variação alta do grupo controle negativo demonstrou que a inflamação foi realmente causada e refletiu na hipernocicepção dos camundongos que pôde ser medida, validando o experimento. Além disso, a baixa variação do grupo controle normal mostrou que o PBS usado para veicular o MSU não causou por si só a inflamação. O grupo tratado com a indometacina, anti-inflamatório utilizado como controle positivo, obteve uma porcentagem de variação de -0,36 %, significativamente diferente do grupo controle negativo e sem diferença significativa em relação ao grupo controle normal (teste de Tukey). Todos os grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg, apresentaram porcentagem de variação sem diferença significativa em relação ao grupo

controle normal e ao grupo controle indometacina (teste de Dunnett e teste de Tukey). Os grupos tratados com a licnofolida nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg apresentaram variações de -6,23, -11,96 e -10,00 %, respectivamente. Os grupos tratados com a eremantolida C nas mesmas doses apresentaram variações de -6,85, -8,04 e -12,38 %, respectivamente. E os grupos tratados com a goiazensolida também nas mesmas doses obtiveram variações de -0,43, -4,81 e -11,51 %, respectivamente. Todos os grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas 3 doses avaliadas demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo (teste de Dunnett) e não foram significativamente diferentes ao grupo controle normal (teste de Dunnett) e ao grupo controle positivo (teste de Tukey). Também não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas 3 doses avaliadas (teste de Tukey).

### 7.7.2. Atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa

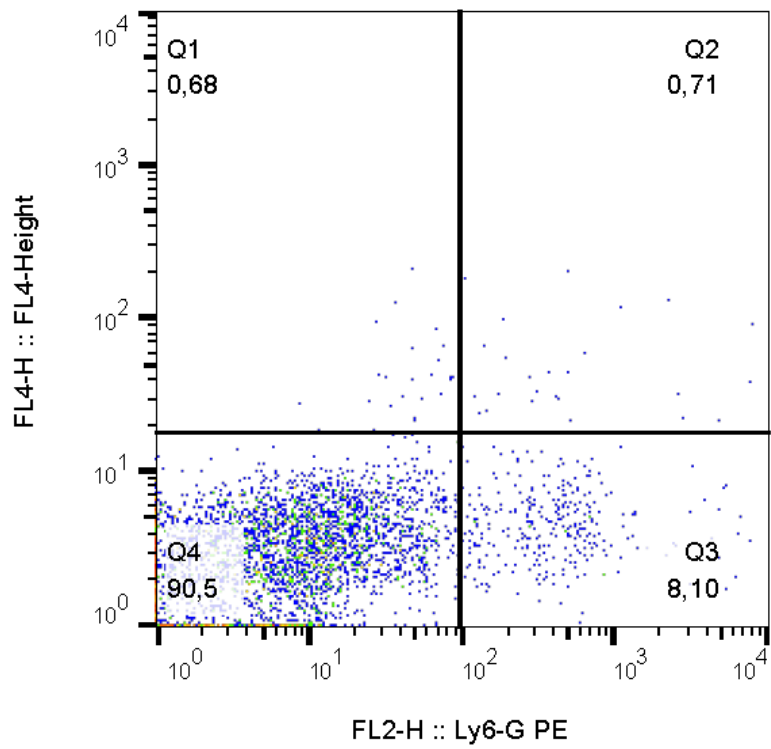
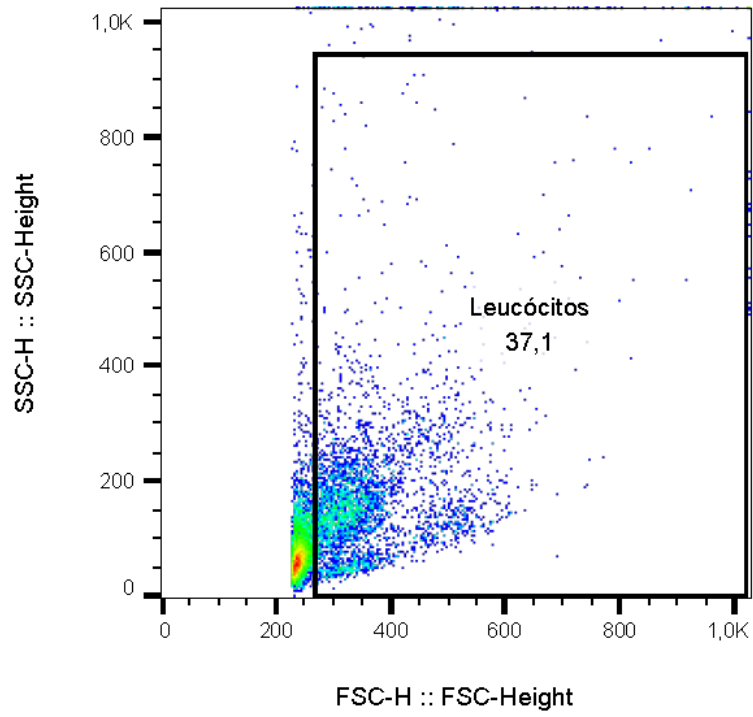
As análises dos dados obtidos a partir do citômetro de fluxo foram realizadas por meio do software FlowJow Diagnostic tool v10.0.7. Um pool de amostras sem o marcador de neutrófilos foi analisado no citômetro com o objetivo de obter o branco. Sendo assim, foi definido o quadrante Q3 sem nenhuma célula para que fosse possível, a partir dele, fazer a contagem de neutrófilos no quadrante Q3 das outras amostras contendo o marcador (Figura 41).

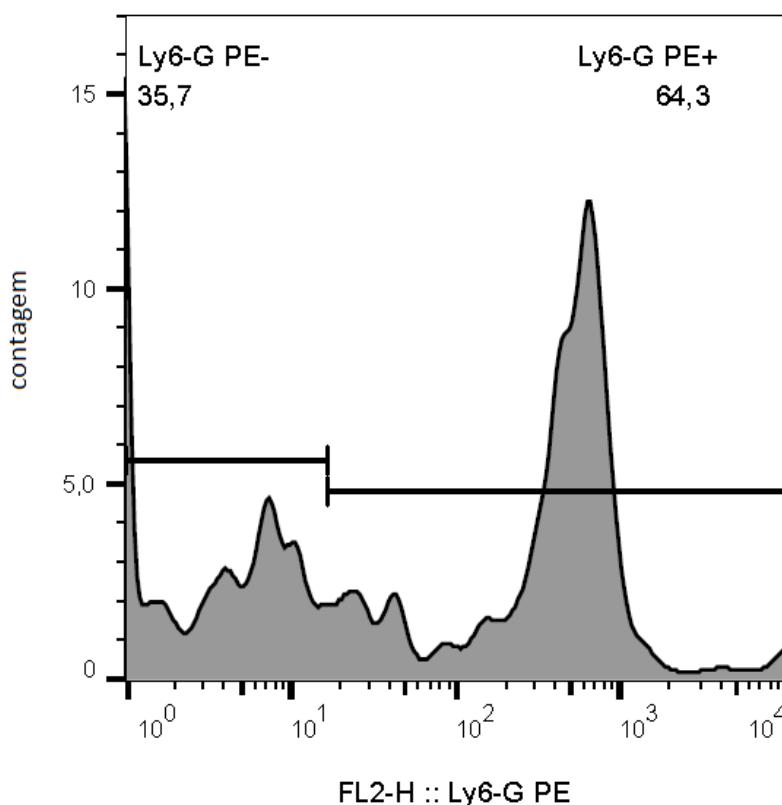




**Figura 41.** Gráficos obtidos por análises utilizando o software FlowJo com a amostra sem o marcador para a definição do branco.

Após definir o branco, procedeu-se com as análises individuais das amostras contendo o marcador, como mostrado na **Figura 42**.





**Figura 42.** Gráficos obtidos por análises utilizando o software FlowJo com uma amostra contendo o marcador para neutrófilos (Ly6-G).

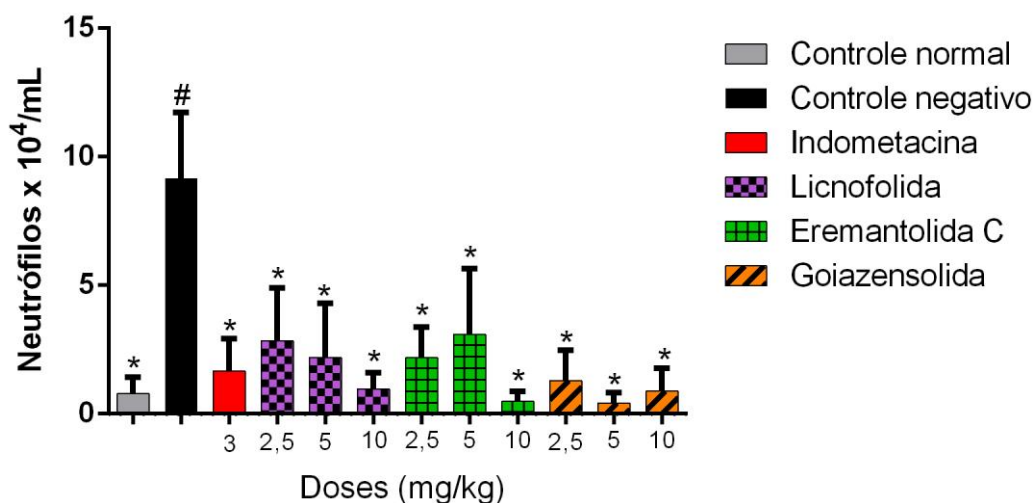
As análises de cada amostra prosseguiram como exemplificado nos gráficos (**Figura 42**, página 67), e a partir daí foi possível obter a porcentagem de neutrófilos presentes. Os neutrófilos presentes foram quantificados pela contagem de leucócitos totais, realizadas por meio do contador hematológico veterinário, e pela porcentagem de neutrófilos obtida pelas leituras no citômetro de fluxo (**Tabela 10**, página 68 e **Figura 43**, página 68).



**Tabela 10.** Contagem de leucócitos totais e neutrófilos/mL no lavado articular de animais com inflamação induzida por MSU tratados com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.

Grupo	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais/mL ± e.p.m	% Neutrófilos	Neutrófilos/mL ± e.p.m.
Controle normal	-	0,18 x 10 <sup>6</sup> ± 0,13	6,28	0,78 x 10 <sup>4</sup> ± 0,647 <sup>a</sup>
Controle negativo	-	0,18 x 10 <sup>6</sup> ± 0,045	53,24	9,16 x 10 <sup>4</sup> ± 2,564 <sup>b</sup>
Indometacina	3	0,15 x 10 <sup>6</sup> ± 0,076	10,23	1,67 x 10 <sup>4</sup> ± 1,264 <sup>a</sup>
Licnofolida	2,5	0,12 x 10 <sup>6</sup> ± 0,041	32,94	4,22 x 10 <sup>4</sup> ± 3,857 <sup>a</sup>
Licnofolida	5	0,12 x 10 <sup>6</sup> ± 0,045	12,81	1,39 x 10 <sup>4</sup> ± 0,793 <sup>a</sup>
Licnofolida	10	0,3 x 10 <sup>6</sup> ± 0,21	3,28	0,96 x 10 <sup>4</sup> ± 0,494 <sup>a</sup>
Eremantolida C	2,5	0,17 x 10 <sup>6</sup> ± 0,121	15,15	2,18 x 10 <sup>4</sup> ± 1,197 <sup>a</sup>
Eremantolida C	5	0,22 x 10 <sup>6</sup> ± 0,109	12,06	3,09 x 10 <sup>4</sup> ± 2,561 <sup>a</sup>
Eremantolida C	10	0,14 x 10 <sup>6</sup> ± 0,055	4,37	0,47 x 10 <sup>4</sup> ± 0,405 <sup>a</sup>
Goiazensolida	2,5	0,12 x 10 <sup>6</sup> ± 0,045	9,64	1,30 x 10 <sup>4</sup> ± 1,175 <sup>a</sup>
Goiazensolida	5	0,1 x 10 <sup>6</sup> ± 0	4,2	0,42 x 10 <sup>4</sup> ± 0,401 <sup>a</sup>
Goiazensolida	10	0,1 x 10 <sup>6</sup> ± 0	8,85	0,88 x 10 <sup>4</sup> ± 0,884 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo; <sup>b</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

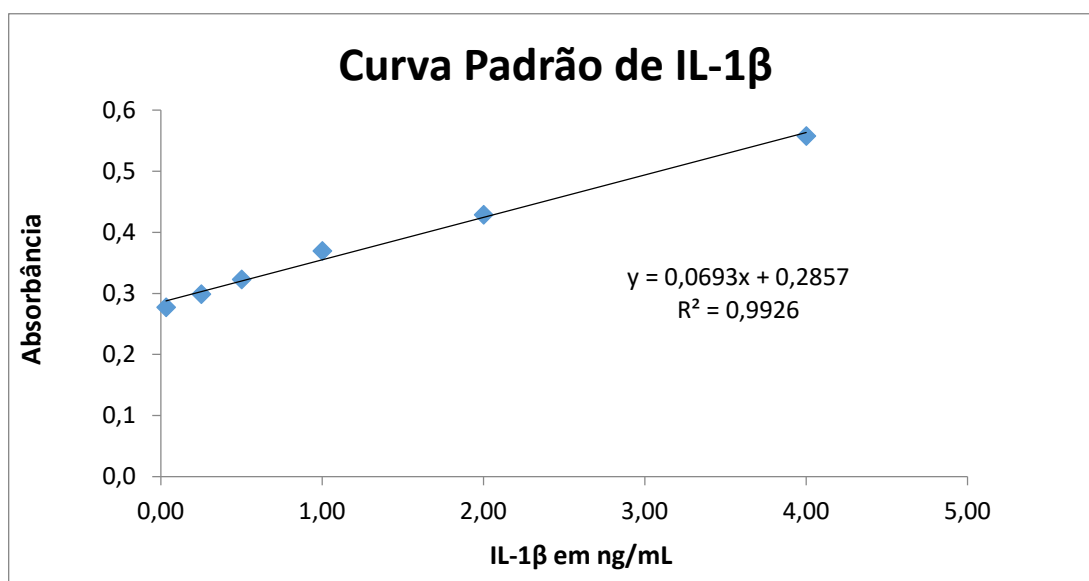


**Figura 43.** Contagem de neutrófilos no lavado intra-articular de camundongos C57BL/6 com inflamação induzida, após o tratamento com a indometacina e as lactonas sesquiterpênicas

em diferentes doses. \*  $P < 0,0001$  vs. controle negativo; #  $P < 0,0001$  vs. controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

A análise estatística mostrou que houve diferença entre o grupo controle normal e o grupo controle negativo, comprovando que a inflamação foi induzida com sucesso pela injeção de MSU intra-articular. Além disso, nos animais do grupo controle normal, que recebeu apenas a injeção intra-articular de tampão (PBS), não houve inflamação, validando o experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas diferentes doses. Além disso, também não houve diferença destes mesmos grupos em relação ao grupo controle normal e em relação ao grupo controle positivo tratado com o AINE (indometacina). Os grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas, nas 3 doses avaliadas, e tratados com a indometacina obtiveram respostas significativamente diferentes do grupo controle negativo.

Em relação a dosagem da citocina IL-1 $\beta$ , obteve-se a curva padrão com a respectiva equação da reta (**Figura 44**, página 69), com a qual foi possível calcular a concentração de IL-1 $\beta$  nas amostras (**Tabela 11**, página 70; **Figura 45**, página 70).

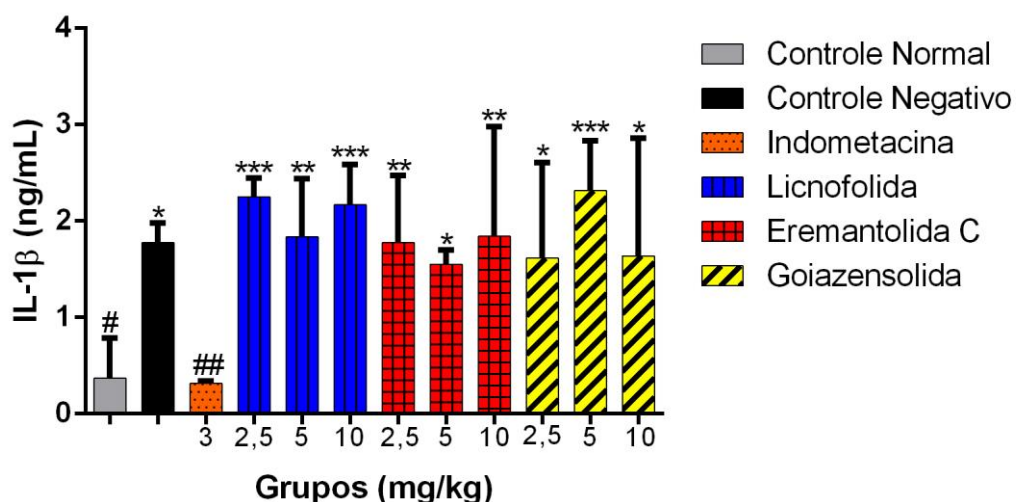


**Figura 44.** Curva padrão de IL-1 $\beta$ .

**Tabela 11.** Concentração de IL-1 $\beta$  no homogenato do tecido periarticular de animais com inflamação induzida por MSU tratados com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.

Grupo	Dose (mg/kg)	IL-1 $\beta$ (ng/mL) $\pm$ e.p.m.
Controle normal	-	0,37 $\pm$ 0,420 <sup>d</sup>
Controle negativo	-	1,77 $\pm$ 0,206 <sup>a</sup>
Indometacina	3	0,43 $\pm$ 0,310 <sup>e</sup>
Licnofolida	2,5	2,25 $\pm$ 0,193 <sup>c</sup>
Licnofolida	5	1,83 $\pm$ 0,605 <sup>b</sup>
Licnofolida	10	2,17 $\pm$ 0,419 <sup>c</sup>
Eremantolida C	2,5	1,77 $\pm$ 0,696 <sup>b</sup>
Eremantolida C	5	1,55 $\pm$ 0,149 <sup>a</sup>
Eremantolida C	10	1,84 $\pm$ 1,140 <sup>b</sup>
Goiazensolida	2,5	1,61 $\pm$ 0,995 <sup>a</sup>
Goiazensolida	5	2,32 $\pm$ 0,520 <sup>c</sup>
Goiazensolida	10	1,64 $\pm$ 1,224 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  vs. grupo controle normal; <sup>b</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle normal; <sup>c</sup>  $P < 0,001$  vs. grupo controle normal; <sup>d</sup>  $P < 0,05$  vs. grupo controle negativo; <sup>e</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).



**Figura 45.** Concentração de IL-1 $\beta$  no homogenato do tecido periarticular de camundongos C57BL/6 com inflamação induzida, após o tratamento com a indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses. \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle normal; \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo controle normal; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. grupo controle normal; #  $P < 0,05$  vs. grupo controle

negativo; ##  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

A equação da reta para calcular a concentração de TNF- $\alpha$  foi obtida a partir da curva padrão (Figura 46, página 71).

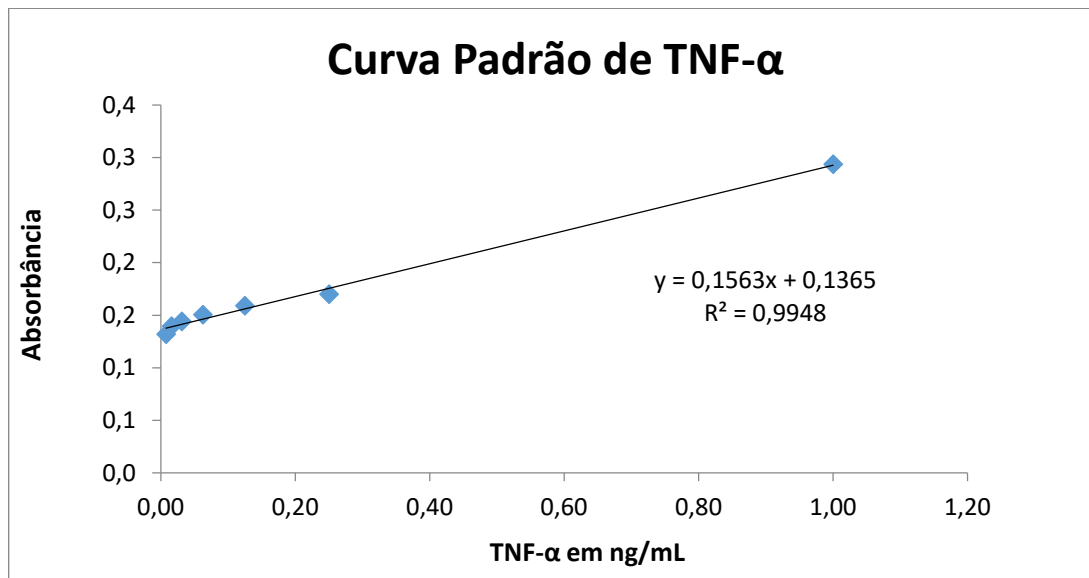
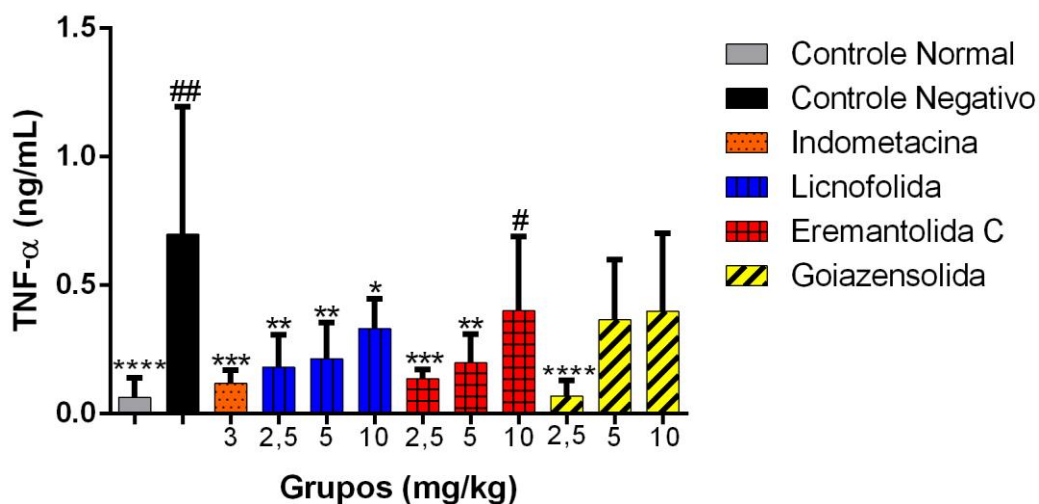


Figura 46. Curva padrão de TNF- $\alpha$ .

**Tabela 12.** Concentração de TNF- $\alpha$  no homogenato do tecido periarticular de animais com inflamação induzida por MSU tratados com indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses.

Grupo	Dose (mg/kg)	TNF- $\alpha$ (ng/mL) $\pm$ e.p.m.
Controle normal	-	0,06 $\pm$ 0,076 <sup>d</sup>
Controle negativo	-	0,70 $\pm$ 0,497 <sup>f</sup>
Indometacina	3	0,12 $\pm$ 0,052 <sup>c</sup>
Licnofolida	2,5	0,18 $\pm$ 0,126 <sup>b</sup>
Licnofolida	5	0,21 $\pm$ 0,142 <sup>b</sup>
Licnofolida	10	0,33 $\pm$ 0,116 <sup>a</sup>
Eremantolida C	2,5	0,14 $\pm$ 0,036 <sup>c</sup>
Eremantolida C	5	0,20 $\pm$ 0,112 <sup>b</sup>
Eremantolida C	10	0,40 $\pm$ 0,291 <sup>e</sup>
Goiazensolida	2,5	0,07 $\pm$ 0,060 <sup>d</sup>
Goiazensolida	5	0,37 $\pm$ 0,234
Goiazensolida	10	0,39 $\pm$ 0,303

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  vs. grupo controle negativo; <sup>b</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; <sup>c</sup>  $P < 0,001$  vs. grupo controle negativo; <sup>d</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo; <sup>e</sup>  $P < 0,05$  vs. grupo controle normal; <sup>f</sup>  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).



**Figura 47.** Concentração de TNF- $\alpha$  no homogenato do tecido periarticular de camundongos C57BL/6 com inflamação induzida, após o tratamento com a indometacina e as lactonas sesquiterpênicas em diferentes doses. \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle negativo; \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. grupo controle negativo; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo; #  $P < 0,05$  vs. grupo controle normal; ##  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

A concentração de citocinas no homogenato do tecido periarticular do grupo controle negativo foi de 1,77 ng/mL (IL-1 $\beta$ ) e 0,70 ng/mL (TNF- $\alpha$ ), significativamente maior que no grupo controle normal, no qual a concentração de IL-1 $\beta$  encontrada foi 0,37 ng/mL (teste de Dunnett,  $P < 0,05$ ) e de TNF- $\alpha$  foi 0,06 ng/mL ( $P < 0,0001$ ). No grupo tratado com o anti-inflamatório indometacina, a concentração de IL-1 $\beta$  foi de 0,43 ng/mL e de TNF- $\alpha$  foi de 0,12 ng/mL, ambos sem diferença significativa em relação ao grupo controle normal. A quantidade de IL-1 $\beta$  encontrada nos homogenatos dos grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg não foi significativamente diferente do grupo controle negativo e foram maiores que do grupo controle normal. As dosagens de IL-1 $\beta$  nos grupos tratados com licnofolida nas 3 doses, eremantolida C nas doses de 2,5 e 10 mg/kg, e goiazensolida na dose de 5 mg/kg, foram maiores que do grupo tratado com a indometacina (0,43 ng/mL) (teste de Tukey). Não houve diferença na dosagem de IL-1 $\beta$

entre os grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas 3 doses e o grupo controle negativo. Os resultados indicaram que os tratamentos com as lactonas sesquiterpênicas, nas três doses avaliadas, não foram capazes de reduzir a produção de IL-1 $\beta$ . O grupo tratado com a indometacina demonstrou conter menor quantidade de TNF- $\alpha$  (0,12 ng/mL) que o grupo não tratado (controle negativo) e semelhante ao grupo controle normal. Os grupos tratados com a licnofolida nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg, eremantolida C nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, e goiazensolida na dose de 2,5 mg/kg obtiveram concentrações menores de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo controle negativo. Além disso, não houve diferença significativa de TNF- $\alpha$  entre os tratamentos com as lactonas sesquiterpênicas, nas 3 diferentes doses, e a indometacina. A dosagem de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com a eremantolida C na dose de 10 mg/kg foi maior que do grupo controle normal (teste de Dunnett,  $P < 0,05$ ). Os tratamentos com as três lactonas sesquiterpênicas com a menor dose (2,5 mg/kg) foram capazes de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  (**Figura 47**, página 72).

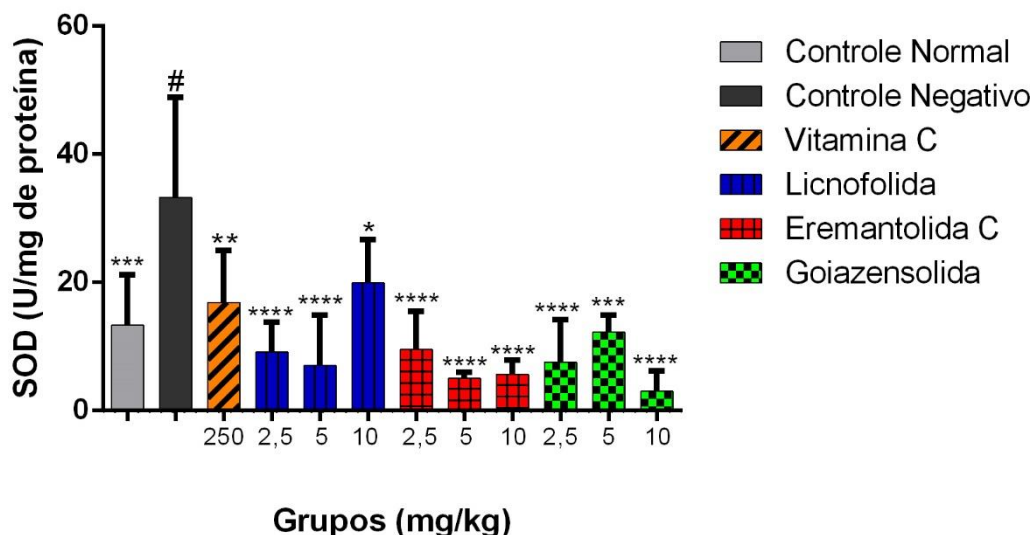
### **7.7.3. Avaliação das defesas antioxidantes**

A defesa antioxidante ao estresse oxidativo foi avaliada a partir da quantificação das enzimas catalase (CAT) superóxido dismutase (SOD) no homogenato obtido do tecido periarticular após indução da inflamação por MSU e tratamento com a vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas licnofolida, eremantolida C e goiazensolida nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg. Os valores de SOD e CAT foram representados por unidades de enzima por miligrama de proteínas totais (U/mg de proteína).

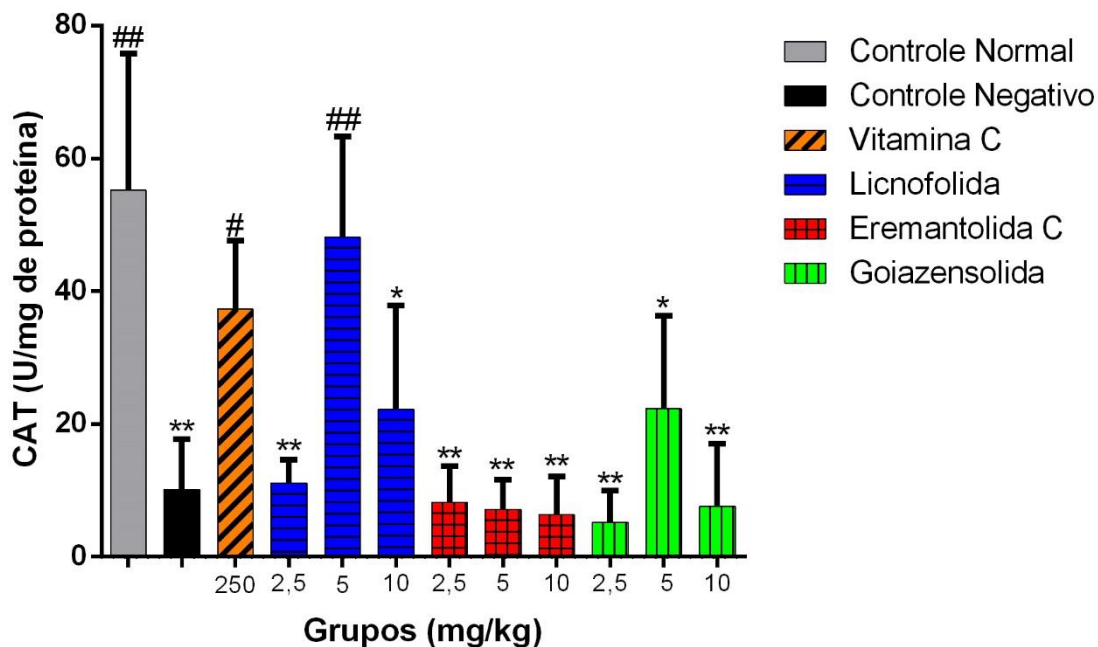
**Tabela 13.** Valores de unidades de SOD por miligrama de proteínas totais e unidades de CAT por miligrama de proteínas totais, além da relação SOD/CAT para avaliação do estresse oxidativo no homogenato de camundongos C57BL/6 com inflamação articular induzida por MSU, tratados com vitamina C e as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses.

<b>Grupos</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>U de SOD/mg de proteína ± e.p.m</b>	<b>U de CAT/mg de proteína ± e.p.m.</b>	<b>SOD/CAT ± e.p.m</b>
<b>Controle normal</b>	-	11,21 ± 7,359	55,18 ± 20,603	0,28 ± 0,181 <sup>b</sup>
<b>Controle negativo</b>	-	33,27 ± 15,656	10,15 ± 7,538	5,08 ± 4,939 <sup>c</sup>
<b>Vitamina C</b>	250	16,88 ± 8,085	37,31 ± 10,339	0,54 ± 0,183 <sup>a</sup>
<b>Licnofolida</b>	2,5	9,13 ± 4,680	11,12 ± 3,485	0,77 ± 0,808 <sup>a</sup>
<b>Licnofolida</b>	5	7,05 ± 7,872	48,14 ± 15,172	0,15 ± 0,173 <sup>b</sup>
<b>Licnofolida</b>	10	19,90 ± 6,823	22,21 ± 15,631	1,58 ± 1,659
<b>Eremantolida C</b>	2,5	9,54 ± 5,973	8,19 ± 5,441	1,39 ± 0,976
<b>Eremantolida C</b>	5	5,01 ± 0,995	7,12 ± 4,538	1,48 ± 1,825
<b>Eremantolida C</b>	10	5,66 ± 2,189	6,29 ± 5,826	1,30 ± 0,964 <sup>a</sup>
<b>Goiazensolida</b>	2,5	7,57 ± 6,089	5,15 ± 4,645	1,91 ± 1,037
<b>Goiazensolida</b>	5	12,23 ± 2,633	22,28 ± 13,980	1,04 ± 1,217 <sup>a</sup>
<b>Goiazensolida</b>	10	3,04 ± 3,195	7,58 ± 9,483	2,51 ± 4,315

<sup>a</sup>  $P < 0,05$  vs. grupo controle negativo; <sup>b</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; <sup>c</sup>  $P < 0,01$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

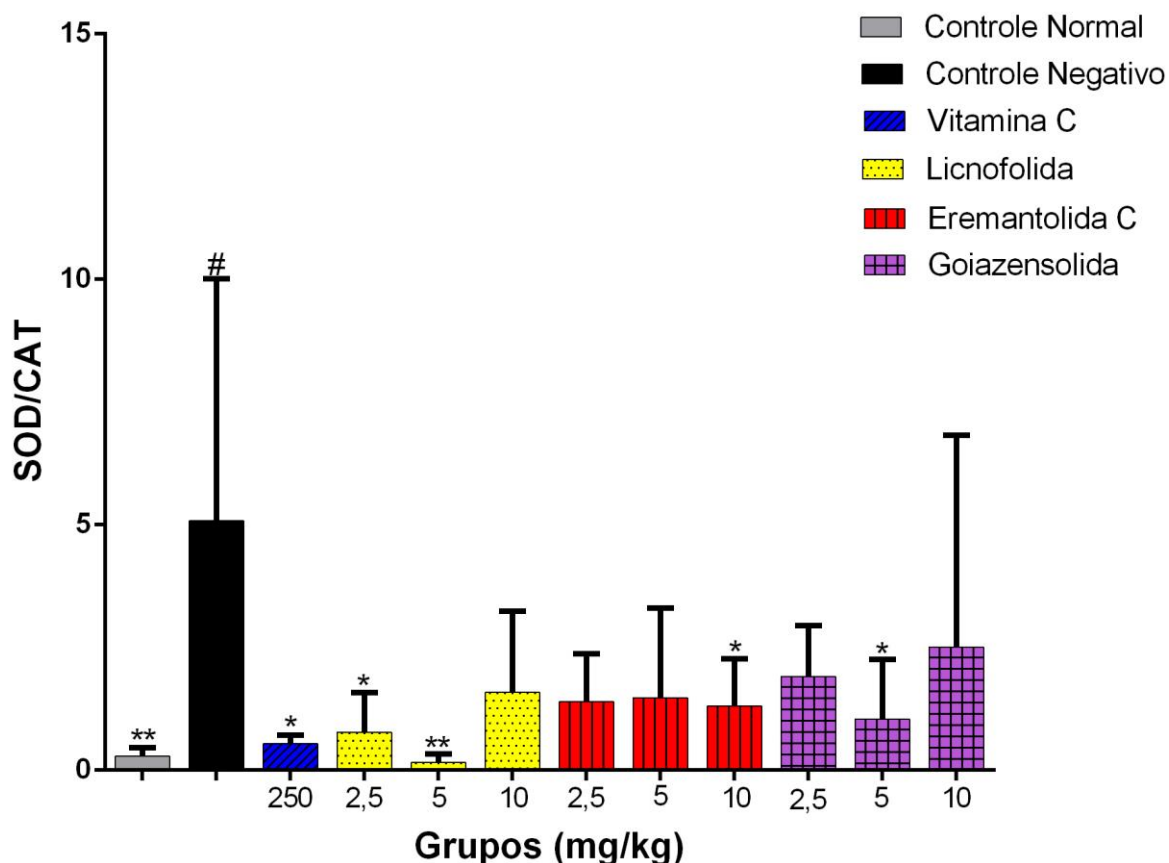


**Figura 48.** Unidades de SOD/miligramas de proteínas totais dos grupos controle normal e com inflamação induzida por MSU, tratados com vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses. \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle negativo; \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. grupo controle negativo; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo; #  $P < 0,001$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).



**Figura 49.** Unidades de CAT/miligramas de proteínas totais dos grupos controle normal e com inflamação induzida por MSU, tratados com vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses. \*  $P < 0,001$  vs. grupo controle normal; \*\*  $P < 0,0001$  vs. grupo controle normal; #  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; ##  $P < 0,0001$  vs. grupo controle negativo. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).





**Figura 50.** Relação SOD/CAT dos grupos controle normal e com inflamação induzida por MSU, tratados com vitamina C e com as lactonas sesquiterpênicas em 3 diferentes doses. \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle negativo; \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo controle negativo; #  $P < 0,01$  vs. grupo controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Houve diferença significativa entre os resultados do grupo controle normal e grupo controle negativo nas dosagens de SOD, CAT e razão SOD/CAT, demonstrando que a inflamação induzida pelo MSU gerou uma resposta ao estresse oxidativo pela via de SOD e CAT, e o PBS injetado no grupo controle normal não causou este mesmo estresse oxidativo. Além disso, houve diferença significativa entre os animais do grupo controle positivo, que receberam o medicamento antioxidante vitamina C, e os animais do grupo controle negativo. Não houve diferença entre o grupo controle normal e o grupo que recebeu o tratamento com vitamina C (**Figuras 48 a 50**, páginas 75 e 76).

A quantidade da enzima SOD obtida nas dosagens dos homogenatos dos tecidos dos grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg não foi significativamente diferente ao grupo controle normal e ao grupo controle positivo (vitamina C). Além disso, os valores de SOD para todos os grupos tratados e controle normal foram diferentes do grupo controle negativo. Não houve diferença significativa entre

os grupos tratados com as lactonas nas 3 diferentes doses, exceto o grupo tratado com a licnofolida C na dose de 10 mg/kg no qual a quantificação de SOD (19,90 U/mg de proteína) foi significativamente maior que o grupo tratado com a eremantolida C na dose de 5 mg/kg (5,01 U/mg de proteína) ( $P < 0,05$ ; teste de Tukey), e que o grupo tratado com a goiazensolida na dose de 10 mg/kg (3,04 U/mg de proteína) ( $P < 0,05$ ; teste de Tukey).

Na dosagem da enzima CAT, observou-se diferença significativa entre o grupo controle normal (55,18 U/mg de proteína) e o grupo controle negativo (10,15 U/mg de proteína) ( $P < 0,0001$ ; teste de Dunnett), além de também haver diferença entre o grupo controle negativo e o grupo controle positivo tratado com a vitamina C (37,31 U/mg de proteína) ( $P < 0,01$ ; teste de Dunnett). Entre os grupos teste, tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas diferentes doses, apenas o grupo tratado com a licnofolida na dose de 5 mg/kg (48,14 U de CAT/mg de proteína) não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo controle normal. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com a vitamina C e com a licnofolida nas doses de 5 e 10 mg/kg (48,14 e 22,21 U de CAT/mg de proteína). Também não houve diferença entre o grupo controle positivo e o grupo tratado com goiazensolida na dose de 5 mg/kg (22,28 U de CAT/mg de proteína). Licnofolida na dose de 5 mg/kg obteve os resultados de dosagem de CAT significativamente diferentes em relação a todos os outros grupos teste (teste de Tukey). Os demais grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas 3 diferentes doses não obtiveram resultados diferentes entre si.

O equilíbrio entre SOD e CAT é de extrema importância na avaliação da oxidação no meio, já que estas enzimas estão diretamente relacionadas. A razão SOD/CAT entre o grupo controle normal (0,28) e o grupo controle negativo (5,08) foi significativamente distinta ( $P < 0,01$ ; teste de Dunnett). O grupo tratado com a vitamina C obteve o valor de SOD/CAT em 0,54, sem diferença significativa ao grupo controle normal e diferente do grupo controle negativo ( $P < 0,05$ ; teste de Dunnett). Os grupos tratados com licnofolida nas doses de 2,5 e 5 mg/kg demonstraram diferença significativa em relação ao grupo controle negativo, sem diferenças do grupo controle normal. Ainda, os grupos tratados com a eremantolida C na dose de 10 mg/kg e goiazensolida na dose de 5 mg/kg também demonstraram diferença em relação ao grupo controle negativo e nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle normal. Não houve diferença entre os tratamentos com vitamina C e as lactonas sesquiterpênicas nas 3 diferentes doses, nem entre as lactonas entre si (teste de Tukey).

## 7.8. Discussão

A artrite gotosa é causada pela deposição de cristais de MSU nos tecidos articulares e periarticulares. O processo inflamatório causa dor, especialmente nos ataques agudos. A dor inflamatória ativa o sistema imune, como uma resposta ao tecido danificado, liberando mediadores que modulam os nociceptores que percebem a dor. Como resultado, há a hipersecreção da citocina IL-1 $\beta$  como produto da ativação do inflamassoma NLRP3, que tem importante papel na resposta inflamatória (RAMONDA et al., 2015). A síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8), enzimas (COX-2 e iNOS), moléculas de adesão celular (VCAM-1 e ICAM-1), fatores de crescimento hematopoiéticos e proteínas da fase aguda são reguladas pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B (BAEUERLE e HENKEL, 1994). Como consequência da superprodução desses mediadores, principalmente da IL-1 $\beta$ , ocorre a infiltração de neutrófilos (RAMONDA et al., 2015) que, através de sinais quimiotáticos, atraem monócitos e células dendríticas e influenciam na diferenciação de macrófagos (NATHAN, 2006).

As lactonas sesquiterpênicas modulam a produção de moléculas características dos processos inflamatórios agudo e crônico. Várias lactonas sesquiterpênicas atuam pela inibição da via de sinalização do NF- $\kappa$ B (HOHMANN et al., 2016). Ferrari e colaboradores (2013) demonstraram a capacidade da licnofolida de inibir a produção de NO em macrófagos J774A.1 estimulados por LPS, além de aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Neste mesmo estudo, eremantolida C foi capaz de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  e aumentar a produção de IL-10 na mesma linhagem celular de macrófagos (FERRARI et al., 2013).

A indometacina é um anti-inflamatório não-esteroidal, exercendo, portanto, além da ação anti-inflamatória, as ações antipirética e analgésica, sendo aproximadamente 20 vezes mais potente que o ácido acetilsalicílico. É eficaz no alívio da dor, da tumefação e sensibilidade dolorosa articulares (BRUNTON et al., 2010). No presente estudo, foi avaliada a ação antinociceptiva e anti-inflamatória das lactonas sesquiterpênicas licnofolida, eremantolida C e goiazensolida nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg e da indometacina na dose de 3 mg/kg, em camundongos da linhagem C57BL/6 com artrite gotosa induzida pela aplicação local de cristais de MSU na cavidade intra-articular. A nocicepção foi medida antes e após o tratamento e indução da inflamação, sendo calculada a variação do limiar de estímulo (tempo 6h - tempo 0h). Os animais com aparente dor, retiram a pata mais rapidamente, exercendo menos força (g) ao analgesímetro. Sendo assim, a pressão na pata dos animais medida no grupo controle negativo (que receberam a injeção de MSU

porém não receberam tratamento) foi maior no tempo 0h (sem inflamação induzida) em relação ao tempo 6h (com inflamação induzida). A indometacina foi usada como controle positivo, e demonstrou que os animais praticamente não sofreram variação da medida sem a inflamação e depois de haver a indução da inflamação e tratamento. A licnofolida obteve a melhor resposta antinociceptiva na dose de 2,5 mg/kg, sem diferença significativa em relação ao grupo controle normal e ao grupo controle positivo. Além disso, nessa mesma dose, licnofolida reduziu a migração de neutrófilos, sem diferença significativa em relação ao grupo controle normal e ao grupo tratado com indometacina. Houve uma relação dose-dependência na redução de neutrófilos nos grupos tratados com licnofolida, sendo que a maior dose (10 mg/kg) demonstrou o melhor efeito, na menor dose observou-se o menor efeito, todas sem diferenças significativas em relação ao grupo controle normal e grupo controle positivo. Já na avaliação da atividade antinociceptiva, a menor dose obteve os melhores resultados, seguida da maior dose e da dose de 5 mg/kg, sem diferenças dos controles positivo e normal. A licnofolida demonstrou seu potencial anti-inflamatório nas 3 doses avaliadas, sendo que nas doses de 5 e 10 mg/kg, foi ainda mais efetiva que a indometacina na redução da migração de neutrófilos para o local da inflamação, demonstrando maior proximidade aos níveis de normalidade. Em contrapartida, a licnofolida, nas 3 doses testadas, não foi capaz de inibir a produção da citocina IL-1 $\beta$  no tempo de 6 horas após a indução da inflamação, podendo haver uma possível resposta tardia para este mecanismo de ação. Houve uma resposta de inibição de TNF- $\alpha$  inversamente proporcional ao aumento da dose de licnofolida, sendo que a menor dose demonstrou ser mais eficaz que a maior dose. Ferrari e colaboradores (2013) demonstraram que licnofolida não foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$  *in vitro*. É necessário levar em consideração que *in vivo* há muitos outros fatores que possam interferir na resposta do animal à inflamação, podendo assim justificar essa diferença nos resultados dos testes *in vivo* e *in vitro*. Sendo assim, o mecanismo anti-inflamatório da licnofolida foi demonstrado pela inibição da migração de neutrófilos e pela inibição da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .

A eremantolida C também demonstrou maior atividade antinociceptiva na dose de 2,5 mg/kg, sem diferença significativa ao grupo controle normal e grupo controle positivo. Para a ação antinociceptiva dessa lactona sesquiterpênica, houve uma relação dose-dependência inversamente proporcional, sendo a menor dose a mais eficaz, e a maior dose (10 mg/kg) a menos eficaz. Nas 3 doses, não houve diferença em relação ao grupo controle positivo e grupo controle negativo. Eremantolida C foi eficaz no tratamento da artrite gotosa nas 3 doses, demonstrando ação anti-inflamatória na redução da migração de neutrófilos,

sem diferença significativa em relação ao grupo controle normal e ao grupo tratado com a indometacina. Além disso, na dose de 10 mg/kg, a resposta anti-inflamatória foi ainda mais pronunciada que a do grupo tratado com o AINE. Quanto à dosagem de citocinas, eremantolida C demonstrou inibir a síntese de TNF- $\alpha$  nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, sendo mais eficaz na menor dose. Não foi capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  em nenhuma das doses testadas, resultados que corroboram com os testes *in vitro* realizados por Ferrari e colaboradores (2013).

Rüngeler e colaboradores (1999) demonstraram que a goiazensolida é um potente inibidor da ativação do NF- $\kappa$ B, mediador central da resposta imunológica à inflamação, responsável pela regulação da transcrição de citocinas inflamatórias e outros mediadores. A goiazensolida foi capaz de diminuir o edema de pata induzido por carragenina em camundongos swiss, demonstrando efeito anti-inflamatório semelhante à indometacina, em diferentes fases da inflamação (UGOLINE et al, 2017). No presente estudo, goiazensolida, assim como a eremantolida C, demonstrou uma atividade antinociceptiva com a relação dose-resposta indiretamente proporcional. A menor dose da goiazensolida (2,5 mg/kg) obteve uma variação no limiar de estímulo muito pequena entre os tempos 0h e 6h, semelhante à resposta da indometacina, sendo a melhor resposta entre as diferentes doses e lactonas sesquiterpênicas testadas. Com o aumento da dose, a porcentagem de variação aumentou. Ainda assim, demonstraram ter efeitos significativos na nocicepção em todas as doses testadas. Sendo assim, a melhor dose para esta lactona sesquiterpênica obter o efeito antinociceptivo é a de 2,5 mg/kg. A goiazensolida demonstrou ainda seu potencial de inibição da migração de neutrófilos nas 3 doses, sendo ainda mais eficaz que a indometacina. A goiazensolida na dose de 2,5 mg/kg foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$ , obtendo-se concentração semelhante ao grupo controle normal. Nas outras doses também inibiu efetivamente a produção dessa citocina, porém, a dose mais eficaz foi a de 2,5 mg/kg. Em nenhuma das doses testadas houve inibição de IL-1 $\beta$ , podendo-se concluir que o mecanismo da ação anti-inflamatória de goiazensolida, neste modelo experimental de artrite gotosa induzida, é pela inibição da migração de neutrófilos e inibição da produção de TNF- $\alpha$ .

No processo inflamatório, os neutrófilos ao serem ativados liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que são importantes na defesa inflamatória. Porém, podem causar também danos severos aos tecidos não-inflamados. A resposta inflamatória desregulada atinge órgãos e tecidos saudáveis, causando danos ao organismo (HOHMANN et al., 2016).

Espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo normal das células, e são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que leva a sua alta reatividade. A mitocôndria é uma fonte de energia nas células e nela, a cadeia de transporte de elétrons é a principal fonte de ATP. Esses elétrons contribuem para a redução do oxigênio a água, porém, algumas vezes, durante este transporte, ocorre o escape de alguns elétrons, que são adicionados ao oxigênio molecular formando o radical superóxido (VALKO et al., 2007). O radical superóxido pode então ser convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é neutralizado ao ser convertido à água pela ação da enzima catalase (NAUDI et al, 2011).

A capacidade antioxidante das três lactonas sesquiterpênicas foi analisada pela dosagem das enzimas SOD e CAT no tecido periarticular dos camundongos com inflamação induzida por injeção local de MSU. Levando em consideração que a enzima SOD é responsável pela formação de peróxido de hidrogênio e a CAT pela sua degradação, deve-se avaliar a razão SOD/CAT. O grupo controle negativo demonstrou aumento na atividade da enzima SOD, o que pode ser atribuído à uma maior produção de radicais livres, entre eles, o superóxido. A enzima SOD captura os radicais superóxido produzindo o peróxido de hidrogênio. Neste mesmo grupo, foi observado uma baixa atividade da enzima catalase, mostrando que houve um acúmulo do peróxido de hidrogênio, que também é responsável pelo estresse oxidativo. Houve um desequilíbrio na razão SOD/CAT, constatando que o MSU foi capaz de gerar o estresse oxidativo. Foi observado um pequeno aumento na atividade da enzima SOD dos grupos tratados com vitamina C, licnofolida 10 mg/kg e goiazensolida 5 mg/kg, em relação ao grupo controle normal. Isto demonstra que nestes grupos houve uma maior captura do radical superóxido e consequente produção de peróxido de hidrogênio. Porém, estes valores não foram significativamente maiores e, além disso, houve também aumento da atividade da enzima catalase nestes grupos, fazendo com que houvesse um equilíbrio na razão SOD/CAT com a neutralização do peróxido de hidrogênio pela ação da CAT. Nos demais grupos, observou-se certa inibição da enzima SOD em relação ao grupo controle normal, porém estes resultados também não demonstraram diferença estatística. Assim, não houve alterações significativas na atividade da enzima SOD nos grupos tratados com as lactonas sesquiterpênicas nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/kg. A atividade da enzima catalase nos grupos tratados com a vitamina C e licnofolida 5 mg/kg foi semelhante ao grupo controle normal. A licnofolida na dose de 5 mg/kg foi ainda mais eficaz que a vitamina C no estímulo à CAT, demonstrando uma maior neutralização do peróxido de hidrogênio e a razão SOD/CAT com valor muito próximo ao

controle normal. Assim, a licnofolida nesta dose demonstrou ser a melhor opção como antioxidante no tratamento do estresse oxidativo local causado por MSU. Apesar de estimular a atividade de CAT, a licnofolida na dose de 10 mg/kg apresentou um desequilíbrio na razão SOD/CAT, demonstrando que ainda havia liberação de radicais livres nesses animais e que a SOD e a CAT não foram capazes de neutralizá-los. O tratamento com a licnofolida na dose de 2,5 mg/kg inibiu a enzima CAT, porém, a razão SOD/CAT fez com que o sistema entrasse em equilíbrio semelhante ao grupo tratado com a vitamina C. O grupo tratado com a goiazensolida na dose de 5 mg/kg demonstrou uma ação elevada da enzima CAT e razão SOD/CAT sem diferença significativa do controle normal. Nas demais doses (licnofolida 10 mg/kg, eremantolida C 2,5 e 5 mg/kg, goiazensolida 2,5 e 10 mg/kg) não houve equilíbrio na razão SOD/CAT. Portanto, as três lactonas sesquiterpênicas demonstraram ação antioxidante pelo sistema SOD/CAT, porém, em diferentes doses: licnofolida foi eficaz nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, eremantolida C foi eficaz na dose de 10 mg/kg e goiazensolida foi eficaz na dose de 5 mg/kg.

As lactonas sesquiterpênicas demonstraram potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e antioxidante. A melhor escolha para a ação antinociceptiva seria a goiazensolida na dose de 2,5 mg/kg. Todas as lactonas sesquiterpênicas nas 3 doses testadas demonstraram potencial anti-inflamatório, sendo as melhores respostas dos grupos tratados com a goiazensolida na dose de 5 mg/kg e eremantolida C na dose de 10 mg/kg. A licnofolida nas doses de 2,5 e 5 mg/kg foram as que apresentaram as melhores respostas antioxidantes. O experimento permitiu avaliar a ação das lactonas sesquiterpênicas na artrite gotosa induzida, comprovando a eficácia no tratamento da inflamação, dor e estresse oxidativo.

O tratamento da artrite gotosa atualmente consiste em evitar as crises agudas com o uso de medicamentos hipouricêmicos e aliviar os sintomas dessas crises. Apesar da eficácia da indometacina como analgésico e anti-inflamatório na terapêutica da artrite gotosa aguda, pacientes em tratamento com esse AINE comumente apresentam severos efeitos adversos gastrintestinais (diarreias, úlceras no intestino), além de cefaléia frontal, tonturas e delírios (BRUNTON et al., 2010). As lactonas sesquiterpênicas provaram ser eficazes no tratamento da gota, possuindo potencial para se tornarem novas opções terapêuticas para aliviar a dor e os demais sintomas sofridos por milhares de pessoas que convivem com essa doença.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível avaliar e esclarecer os mecanismos envolvidos na ação anti-hiperuricêmica relatada anteriormente para as lactonas sesquiterpênicas licnofolida, eremantolida C e goiazensolida (DE SOUZA et al., 2012; UGOLINE et al., 2017). Pelos resultados pôde-se observar que os efeitos uricosúrico e de inibição da atividade da xantina oxidase hepática dependem da dose administrada. Percebe-se também que, em relação a atividade anti-hiperuricêmica das substâncias avaliadas, nem sempre a maior dose é a mais efetiva. Neste estudo também foi possível determinar a menor dose efetiva para as lactonas sesquiterpênicas exercerem o efeito hipouricêmico, 5 mg/kg.

O mecanismo do efeito anti-inflamatório exercido pelas lactonas sesquiterpênicas foi relacionado à inibição da migração de neutrófilos e inibição da produção de TNF- $\alpha$ . Além disso, estas substâncias demonstraram ser antioxidantes em determinadas doses. Licnofolida, eremantolida C e goiazensolida demonstraram maior efeito antinociceptivo na menor dose avaliada (2,5 mg/kg). O mecanismo de ação farmacológica destas substâncias foi semelhante, o que pode ser justificado pela semelhança estrutural e química das mesmas.

As lactonas sesquiterpênicas demonstraram ser eficazes na diminuição dos níveis séricos de ácido úrico, além de demonstrarem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antinociceptivos, sendo potencial candidatas a fármacos para o tratamento da hiperuricemia, artrite gotosa e doenças relacionadas.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R. D.; BRAND, F. N.; KANNEL, W. B.; CASTELLI, W. P. Gout and coronary heart disease: the Framingham Study. **Journal of clinical epidemiology**, v. 41, n. 3, p. 237-242, 1988.

AEBI, H. [13] Catalase *in vitro*. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 121-126.

AHMED, M.U.; BENNET, D.J.; HSIEH, T.C.; DOONAN, B.B.; AHMED, S.; WU, J.M. Repositioning of drugs using open-access data portal DTome: A test case with probenecid. **International journal of molecular medicine**, v. 37, n. 1, p. 3-10, 2016.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.D.F.A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMARAL, F.A.; COSTA, V.V.; TAVARES, L.D.; SACHS, D.; COELHO, F.M.; FAGUNDES, C.T.; SORIANI, F.M.; SILVEIRA, T.N.; CUNHA; ZAMBONID.S.; QUESNIAUX, V.; PERES, R.S.; CUNHA, T.M.; CUNHA, F.Q.; RYFFEL, B.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M. NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B4 in a murine model of gout. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 2, p. 474-484, 2012.

ARAÚJO, M.C.P.M.; FERRAZ-FILHA, Z.S.; FERRARI, F.C.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. *Campomanesia velutina* leaves extracts exert hypouricemic effects through inhibition of xanthine oxidase and ameliorate inflammatory response triggered by MSU crystals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 720-727, 2016.

BAEUERLE, P.A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, n. 1, p. 141-179, 1994.

BARDIN, T.; RICHELTE, P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 186-191, 2014.

BILLY, C. A.; LIM, R.T.; RUOSPO, M.; PALMER, S. C.; STRIPPOLI, G.F. Corticosteroid or nonsteroidal antiinflammatory drugs for the treatment of acute gout: a systematic review of randomized controlled trials. **The Journal of rheumatology**, v. 45, n. 1, p. 128-136, 2018.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R.M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2381-2385, 1980.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the *Vernoniae* (Compositae). **Research Advances in the Compositae**, p. 3-43, 1990.

BORDIGNON, A.; FRÉDÉRICH, M.; LEDOUX, A.; CAMPOS, P.E.; CLERC, P.; HERMANN, T.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CIECKIEWICZ, E. In vitro antiplasmodial and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from *Vernonia fimbrillifera* Less (Asteraceae). **Natural product research**, v. 32, n. 12, p. 1463-1466, 2018.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Editora Intercept Ltd., 499, 1995.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-10**. AMGH Editora, 2010. p. 605-606.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.

CHAVES, T.L.; RICARDO, L.; PAULA-SOUZA, J.D.; BRANDÃO, M.D.G.L. et al. Useful Brazilian plants under the view of the writer-naturalist João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 437-444, 2015.

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: structural diversity and their biological activities, In-Opportunity, Challenges and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. **Research Signpost, Trivandrum**, p. 313-334, 2011.

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. **Biochemical systematics and ecology**, v. 32, n. 3, p. 239-243, 2004.

CUNHA, T.M.; VERRI JR., W.A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

D'ANGELIS, A.S.R.; NEGRELLE, R.R.B. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, p.607-617, 2014.

DE OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 4, p. 292-295, 1996.

DE SOUZA, M.R.; DE PAULA, C.A.; DE RESENDE, M.L.P.; GRABE-GUIMARÃES, A.; DE SOUZA FILHO, J.D.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 845-850, 2012.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2000.

FERRARI, F.C. Estudo fitoquímico da fração acetato de etila, avaliação da atividade antiinflamatória in vitro e in vivo da toxicidade em camundongos de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto. 2008.

FERRARI, F.C.; FERREIRA, L.C.; SOUZA, M.R.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (Brazilian Arnica). **Phytotherapy research**, v. 27, n. 3, p. 384-389, 2013.

FERRARI, F.C.; LIMA, R.D.C.L.; FERRAZ-FILHA, Z.S.; BARROS, C.H.; ARAÚJO, M.C.D.P.M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* extracts on gout: Anti-inflammatory activity and anti-hyperuricemic effect through xantine oxidase and uricosuric action. **Journal of ethnopharmacology**, v. 180, p. 37-42, 2016.

FERRAZ-FILHA, Z.S.; FERRARI, F.C.; ARAÚJO, M.C.D.P.M, BERNARDES, A.C.F.P.F.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Effects of the Aqueous Extract from *Tabebuia roseoalba* and Phenolic Acids on Hyperuricemia and Inflammation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GHANTOUS, A.; GALI-MUHTASIB, H.; VUORELA, H.; SALIBA, N.A.; DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. **Drug discovery today**, v. 15, n. 15-16, p. 668-678, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

HALL, I.H.; SCOVILLE, J.P.; REYNOLDS, D.J.; SIMLOT, R.; DUNCAN, P. Substituted cyclic imides as potential anti-gout agents. **Life sciences**, v. 46, n. 26, p. 1923-1927, 1990.

HOHMANN, M.S.N.; LONGHI-BALBINOT, D.T.; GUAZELLI, C.F.; NAVARRO, S.A.; ZARPELON, A.C.; CASAGRANDE, R.; ARAKAWA, N.S.; VERRI JR, W.A. Sesquiterpene lactones: structural diversity and perspectives as anti-inflammatory molecules. In: **Studies in natural products chemistry**. Elsevier, 2016. p. 243-264.

JOHNSON, R.J.; KANG, D.H.; FEIG, D.; KIVLIGHN, S.; KANELIS, J.; WATANABE, S.; TUTTLE, K.R.; RODRIGUEZ-ITURBE, B.; HERRERA-ACOSTA, J.; MAZZALI, M. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease?. **Hypertension**, v. 41, n. 6, p. 1183-1190, 2003.

KELES, L.C.; MELO, N.I.D.; AGUIAR, G.D.P.; WAKABAYASHI, K.A.L.; CARVALHO, C.E.D.; CUNHA, W.R.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Lychnophorinae (Asteraceae): a survey of its chemical constituents and biological activities. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2245-2260, 2010.

KHANNA, D.; FITZGERALD, J.D.; KHANNA, P.P.; BAE, S.; SINGH, M.K.; NEOGI, T.; PILLINGER, M.H.; MERILL, J.; LEE, S.; PRAKASH, S.; KALDAS, M.; GOGIA, M.; PEREZ-RUIZ, F.; TAYLOR, W.; LIOTÉ, F.; CHOI, H.; SINGH, J.A.; DALBETH, N.; KAPLAN, S.; NIYYAE, V.; JONES, D.; YAROWS, S.A.; ROESSLER, B.; KERR, G.; KING, C.; LEVY, G.; FURST, D.E.; EDWARDS, N.L.; MANDELL, B.; SCHUMACHER, H.R.; ROBBINS, M.; WENGER, N.; TERKEULTAUB, R. American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 2: therapy and antiinflammatory prophylaxis of acute gouty arthritis. **Arthritis care & research**, v. 64, n. 10, p. 1447-1461, 2012.

KRISHNAN, E. Inflammation, oxidative stress and lipids: the risk triad for atherosclerosis in gout. **Rheumatology**, v. 49, n. 7, p. 1229-1238, 2010.

KONG, L.D.; ZHANG, Y.; PAN, X.; TAN, R.X.; CHENG, C.H.K. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 3, p. 500-505, 2000.

KUO, C.F.; GRAINGE, M.J.; ZHANG, W.; DOHERTY, M. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. **Nature reviews rheumatology**, v. 11, n. 11, p. 649, 2015.

KYDD, A.S.; SETH, R.; BUCHBINDER, R.; EDWARDS, C.J.; BOMBARDIER, C. Uricosuric medications for chronic gout. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 11, 2013.

LAURELLA, L.C.; CERNY, N.; BIVONA, A.E.; ALBERTI, A.S.; GIBERTI, G.; MALCHIODI, E.L.; MARTINO, V.S.; CATALAN, C.A.; ALONSO, M.R.; CAZORLA, S.I.; SÜLSEN, V.P.

Assessment of sesquiterpene lactones isolated from Mikania plants species for their potential efficacy against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n.9, e0005929, 2017.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MCINNES, G. T.; LAWSON, D. H.; JICK, H. Acute adverse reactions attributed to allopurinol in hospitalised patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 40, n. 3, p. 245-249, 1981.

MOHAMMAD, S.; GIATTINO, S. L.; KEENAN, R. T. Current and emerging therapies for gout. **Current Treatment Options in Rheumatology**, v. 1, n. 2, p. 143-155, 2015.

MÖLLER, K.Ä.; JOHANSSON, B. O.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of neuroscience methods**, v. 84, n. 1-2, p. 41-47, 1998.

MÜLLER, C. M. S. Efeitos do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* e de seus constituintes químicos na hiperuricemia e gota. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto. 2017.

MURAOKA, S.; MIURA, T. Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. **Pharmacology and toxicology**, v. 93, n. 6, p. 284-289, 2003.

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

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews immunology**, v. 6, n. 3, p. 173, 2006.

NAUDI, A.; JOVE, M.; AYALA, V.; CASSANYE, A.; SERRANO, J.; GONZALO, H.; BOADA, J.; PRAT, J.; PORTERO-OTIN, M.; PAMPLONA, R. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

NERI, E. **Gota e artrite gotosa**. 2011. Disponível em <<https://ortopediasp.wordpress.com/tag/tofo-gotoso/>>. Acesso em 22/01/2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n.3, p. 629-661, 2016.

PAULA, J.A.M.; SILVA, M.R.R.; COSTA, M.P.; DINIZ, D.G.A.; SÁ, F.A.S.; ALVES, S.F.; COSTA, E.A.; LINO, R.C.; PAULA, J.R. Phytochemical Analysis and Antimicrobial, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.15, 2012.

PUIG, J. G.; MARTÍNEZ, M. A. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. **Current opinion in rheumatology**, v. 20, n. 2, p. 187-191, 2008.

RABELO, A. C. S. *Baccharis trimera* protege contra a hepatotoxicidade induzida pelo etanol em células HepG2 e em ratos. Dissertação de mestrado – NUPEB/UFOP, 2017.

RAMONDA, R.; OLIVIERO, F.; GALOZZI, P.; FRALLONARDO, P.; LORENZIN, M.; ORTOLAN, A.; SCANU, A.; PUNZI, L. Molecular mechanisms of pain in crystal-induced arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 1, p. 98-110, 2015.

REINDERS, M.K.; VAN ROON, E.N.; HOUTMAN, P.M.; BROWERS, J.R.; TIM, L.T.A. Biochemical effectiveness of allopurinol and allopurinol-probenecid in previously

benzbromarone-treated gout patients. **Clinical rheumatology**, v. 26, n. 9, p. 1459-1465, 2007.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1573-1580, 1976.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 7, n. 11, p. 2343-2352, 1999.

SAAG, K.G.; MIKULS, T.R. Recent advances in the epidemiology of gout. **Current rheumatology reports**, v. 7, n. 3, p. 235-241, 2005.

SAÚDE, D.A.; RASLAN, D.S.; DE SOUZA, J.D.; DE OLIVEIRA, A.B. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpha*. **Fitoterapia**, v. 69, p. 90-90, 1998.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; RASLAN, D.S.; DE OLIVEIRA, A.B. In vitro antitumor activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 275-282, 2014.

SAUTIN, Y.Y.; NAKAGAWA, T.; ZHARIKOV, S.; JOHNSON, R.J. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C584-C596, 2007.

SHERRINGTON, C.S. Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. **The Journal of physiology**, v. 40, n. 1-2, p. 28-121, 1910.



SITI, H.N.; KAMISAH, Y.; KAMSI AH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 40-56, 2015.

SMITH, E. U. R.; DIAZ-TOME, C.; PEREZ-RUIZ, F.; MARCH, L.M. Epidemiology of gout: an update. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 811-827, 2010.

SMITH, E.; HOY, D.; CROSS, M.; MERRIMAN, T.R.; VOS, T.; BUCHBINDER, R.; WOOLF, A.; MARCH, L. The global burden of gout: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the rheumatic diseases**, p. annrheumdis-2013-204647, 2014.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: **Biotechnology of isoprenoids**. Springer, Cham, 2015. p. 63-106.

UGOLINE, B.C.A.; DE SOUZA, J.; FERRARI, F.C.; FERRAZ-FILHA, Z.S.; COELHO, G.B.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. The influence of seasonality on the content of goyazensolide and on anti-inflammatory and anti-hyperuricemic effects of the ethanolic extract of *Lychnophora passerina* (Brazilian arnica). **Journal of ethnopharmacology**, v. 198, p. 444-450, 2017.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M. TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

YOSHIOKA, H.; MABRY, T.J.; TIMMERMAN, B.N. Sesquiterpene Lactones: Chemistry, NMR and Plant Distribution. **University of Tokyo Press**, p. 134, 1973.

YU, K.H.; KUO, C.F.; LUO, S.F.; SEE, L.C.; CHOU, I.J.; CHANG, H.C.; CHIOU, M.J. Risk of end-stage renal disease associated with gout: a nationwide population study. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 2, p. R83, 2012.

ZHU, J. X.; WANG, Y.; KONG, L.D.; YANG, C.; ZHANG, X. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-

induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 133-140, 2004.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Certificado de aprovação do protocolo ceua 2016/54



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone: (31) 3559-1300 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@ufop.br](mailto:ceua@ufop.br)



**OFÍCIO CEUA Nº. 054/2017, de 06 de Abril de 2017**

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)**

**Professor(a) Doutor(a) Dênia Antunes Saúde Gulmarães**

**CIPharma**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação a partir do protocolo nº. **2016/54**, intitulado **"Avaliação do efeito de lactonas sesquiterpênicas na excreção do ácido úrico e estresse oxidativo em ratos wistar e na artrite gotosa induzida em camundongos C57BL/6"**.

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

**Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira**  
**Coordenadora da CEUA/UFOP.**