



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA**



AURELIANA DE FÁTIMA DOS REIS MENEZES

**EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *Casearia sylvestris*
SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO MODELO DE ARTRITE GOTOSA**

**OURO PRETO-MG
2024**

AURELIANA DE FÁTIMA DOS REIS MENEZES

**EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *Casearia sylvestris*
SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO MODELO DE ARTRITE GOTOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde
Guimarães

Co-orientadora: Andressa Magalhães Barbosa

**OURO PRETO-MG
2024**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M543e Menezes, Aureliana de Fatima dos Reis.

Efeitos do extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* sobre a migração de neutrófilos no modelo de artrite gotosa. [manuscrito] / Aureliana de Fatima dos Reis Menezes. - 2024.

46 f.: il.: color., gráf..

Orientadora: Profa. Dra. Dênia Saúde Antunes Guimarães.

Coorientadora: Ma. Andressa Magalhães Barbosa.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Plantas medicinais. 2. Gôta (Doença). 3. Inflamação. 4. Neutrófilos. I. Guimarães, Dênia Saúde Antunes. II. Barbosa, Andressa Magalhães. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.32

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Aureliana de Fátima dos Reis Menezes

Efeitos do extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* sobre a migração de neutrófilos no modelo de artrite gotosa

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 26 de fevereiro de 2024

Membros da banca

Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Zilma Schimith Ferraz Filha - (Instituto Federal de Minas Gerais - Ouro Preto)
Dra. Rafaela Cunha Matosinhos - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dênia Antunes Saúde Guimarães, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 25/07/2024



Documento assinado eletronicamente por **Denia Antunes Saude Guimaraes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/08/2024, às 20:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0769353** e o código CRC **341795D7**.

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

Laboratório de Plantas Medicinais

(LAPLAMED)

Este trabalho foi financiado por:

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto



AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força e vitória, por ser tão bondoso e compassivo. Por estar sempre ao meu lado, me dando forças, me iluminando e me guiando. “O Senhor é o meu pastor e nada me faltará.”

A meus pais, José Aleluia e Maria do Rosário, por serem os melhores do mundo. Por serem meu suporte e porto seguro. Por todo apoio e incentivo. Pelo amor infinito.

Aos meus irmãos, meus mais confidentes amigos, por toda união, ajuda, força e amor.

Aos meus sobrinhos e sobrinha por me ensinarem o que é amar.

Aos meus cunhados por todo carinho e apoio.

Às minhas amigas de trabalho por toda ajuda e força.

Aos amigos da UFOP. Que nossa amizade persista além do convívio no Campus.

Ao grupo Farmagatas, por todos os trabalhos e momentos compartilhados juntas.

À minha orientadora Dênia Antunes Saúde Guimarães, pelos conselhos, incentivo, pela orientação e amizade. Por toda a inspiração.

À minha co-orientadora Andressa Magalhães, por todos os ensinamentos, paciência amizade e apoio.

À equipe do LAPLAMED: Izabela, Maria Gabriele, Ana Tereza, Ana Clara, Ana Carolina e Daniele, por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

Ao professor Wander Jeremias pela orientação no TCC 1 e aprendizado.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da UFOP, pela disponibilização dos animais.

À técnica Quênia Tomaz, por todo o auxílio no cuidado com os animais.

Aos funcionários e técnicos da Escola de Farmácia, por todo auxílio e companheirismo.

À UFOP, à FAPEMIG e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e que, assim, se tornaram parte da minha história, minha eterna e sincera GRATIDÃO.

RESUMO

A gota é uma artrite inflamatória aguda decorrente da deposição de cristais de urato monossódico nas articulações e tecidos. A elevação dos níveis séricos de ácido úrico no sangue pode ocasionar a precipitação em forma de cristais de urato monossódico e desencadear processos inflamatórios resultando em quadros de artrite e gota aguda. Esta artrite inflamatória apresenta uma prevalência estimada de 1 a 4% na população adulta dos países desenvolvidos, comprometendo a atividade laboral do indivíduo afetado e sobrecarregando o sistema de saúde. O tratamento das crises inflamatórias agudas envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais ou colchicina ou corticoides. Porém, esses fármacos possuem vários efeitos adversos indesejáveis, entre eles, gastrointestinais, cardiovasculares, renais e articulares. Assim, agentes eficazes e bem tolerados são necessários. A inflamação aguda é definida por um recrutamento inicial de neutrófilos que promovem o reconhecimento inicial do agente inflamatório e leva à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios. As pesquisas utilizando plantas medicinais encontram-se em amplo desenvolvimento, devido aos diversos constituintes químicos nelas presentes os quais apresentam variada atividade biológica. A *Casearia sylvestris* é uma planta brasileira popularmente conhecida como guaçatonga, que possui ampla utilização na medicina popular devido à sua atividade anti-inflamatória. Devido às diversas ações terapêuticas que apresenta, ela consta na RENISUS, fato que estimulou o estudo e conhecimentos de suas propriedades biológicas como forma de assegurar suas aplicações terapêuticas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas da *C. sylvestris* sobre a migração de neutrófilos no modelo de artrite gotosa induzida na articulação fêmur-tibial de camundongos C57BL/6 por cristais de urato monossódico. O tratamento dos animais com o extrato etanólico da *C. sylvestris* inibiu a migração de neutrófilos para a articulação fêmur-tibial em todas as doses avaliadas, resultando no efeito anti-inflamatório. Esses resultados sugerem que o extrato etanólico da *C. sylvestris* é um candidato promissor para o desenvolvimento de um novo insumo farmacêutico ativo vegetal e também pode ser fonte de novos fármacos para o tratamento da inflamação e da gota aguda.

Palavras chaves: *Casearia sylvestris*, guaçatonga, inflamação, neutrófilos, gota aguda.

ABSTRACT

Gout is an acute inflammatory arthritis resulting from the deposition of monosodium urate crystals in joints and tissues. Elevated serum levels of uric acid in the blood can cause precipitation in the form of monosodium urate crystals and trigger inflammatory processes resulting in arthritis and acute gout. This inflammatory arthritis has an estimated prevalence of 1 to 4% in the adult population of developed countries, compromising the affected individual's work activity and overloading the healthcare system. Treatment of acute inflammatory crisis involves the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs or colchicine or corticosteroids. However, these drugs have several undesirable adverse effects as gastrointestinal, cardiovascular, renal and joint. Therefore, effective and well-tolerated agents are needed. Acute inflammation is defined by an initial recruitment of neutrophils that promote the initial recognition of the inflammatory agent and leads to the production of a variety of inflammatory mediators. Research using medicinal plants is undergoing extensive development, due to the different chemical constituents present in them, which have varied biological activity. *Casearia sylvestris* is a Brazilian plant popularly known as guaçatonga, which is widely used in popular medicine due to its anti-inflammatory activity. Due to the diverse therapeutic actions it presents, it is included in the RENISUS list of plants, a fact that encourages the study and knowledge of its biological properties as a way of ensuring its therapeutic applications. The present work aimed to evaluate the anti-inflammatory effect of the ethanolic extract of *C. sylvestris* leaves on the migration of neutrophils in the model of gouty arthritis induced in the femur-tibial joint of C57BL/6 mice by monosodium urate crystals. Treatment of animals with the ethanolic extract of *C. sylvestris* inhibited the migration of neutrophils to the femur-tibial joint at all doses evaluated, resulting in an anti-inflammatory effect. These results suggest that the ethanolic extract of *C. sylvestris* is a promising candidate for the development of a new active plant pharmaceutical ingredient and can also be a source of new drugs for the treatment of inflammation and acute gout.

Keywords: *Casearia sylvestris*, guaçatonga, inflammation, neutrophils, acute gout.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BSA	Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido diamino tetracético
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
USM	Urato monossódico
NK	Natural <i>killer</i>
NO	Óxido nítrico
OAT	Transportador de ânions orgânicos
PBS	Tampão fosfato-salino
Sw	Swartz
TGI	Trato gastrintestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	Receptores <i>Toll Like</i>
URAT	Trocador de ânion urato renal
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ácido úrico e íon urato.....	11
Figura 2: Gota tofácea crônica.....	12
Figura 3: Catabolismo das purinas.....	13
Figura 4: Mecanismos da resposta inflamatória aos cristais de urato.....	16
Figura 5: Alguns diterpenos clerodânicos isolados da <i>Casearia sylvestris</i>	22
Figura 6: a) Folhas da <i>Casearia sylvestris</i> , b) Árvore da <i>Casearia sylvestris</i> , c) Arbusto da <i>Casearia sylvestris</i>	27
Figura 7: Exsicata da <i>Casearia sylvestris</i>	28
Figura 8: Esquema da avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da <i>Casearia sylvestris</i>	31
Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas da <i>Casearia sylvestris</i> Swartz e espectros no UV para os picos 1, 2, 3 e 4.	33
Figura 10: A) Histograma do branco (pool) sem o marcador de neutrófilos B) Histograma das análises de uma amostra contendo o marcador de neutrófilos, obtidos das análises do software FlowJow Diagnostic tool v.10.8.1.	34
Figura 11: Histogramas dos grupos (a) Controle normal; (b) Controle UMS ou controle negativo; (c) Grupo indometacina ou controle positivo; (d-h) histogramas dos tratamentos com extrato etanólico da <i>Casearia sylvestris</i> Swartz nas diferentes doses avaliadas: (d) 15 mg/kg; (e) 30 mg/kg; (f) 60 mg/kg; (g) 120 mg/kg; (h) 240 mg/kg.	36
Figura 12: Efeitos do extrato etanólico da <i>Casearia sylvestris</i> (EECS) em diferentes doses sobre a migração de neutrófilos em camundongos C57BL/6 com inflamação induzida por cristais de urato monossódico (UMS) em comparação ao controle negativo (DMSO: Tween 80: água destilada (1:1:8). Controle indometacina (fármaco padrão). * P < 0,0001 vs. controle negativo; # P < 0,0001 vs. controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).	37

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 Fisiopatologia da gota	10
2.2 Reação inflamatória e migração de neutrófilos	14
2.3 Tratamento da hiperuricemia	16
2.4 <i>Casearia sylvestris</i>	20
2.4.1 Metabólitos secundários	22
2.4.2 Atividades biológicas	23
2.4.3 Toxicidade	24
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2 Objetivos específicos	26
5 METODOLOGIA	26
5.1 Reagentes, solventes, material e equipamentos	26
5.2 Coleta da espécie vegetal	27
5.3 Identificação do material vegetal	28
5.4 Estabilização do material vegetal	28
5.5 Obtenção do extrato etanólico da <i>Casearia sylvestris</i>	28
5.6 Obtenção dos perfis cromatográficos	29
5.7 Animais	29
5.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa	30
5.9 Contagem de neutrófilos	31
5.10 Análise estatística	32
6 RESULTADOS	32
6.1 Rendimento dos extratos	32
A partir de 1000 g de planta seca e pulverizada da <i>Casearia sylvestris</i> foram obtidos 144,5 g do extrato etanólico que apresentou rendimento de 14,45%	32
6.2 Perfis cromatográficos dos extratos	32
6.3 Atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa	33
7 DISCUSSÃO	37
8 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com propriedades medicinais é uma atividade que remonta desde a antiguidade, sendo este hábito passado de geração para geração. Desse modo, pode-se dizer que dois terços da população do planeta fazem uso de plantas muitas vezes como o único recurso terapêutico. Neste contexto, existem diversas pesquisas sobre os componentes presentes nestas plantas associados à cura de diversas patologias (ARGENTA *et al.*, 2011).

A *Casearia sylvestris* é uma planta pertencente à família Salicaceae e é encontrada em regiões tanto tropicais como subtropicais do Brasil, tendo seu uso muito difundido na medicina popular em decorrência de suas propriedades terapêuticas, incluindo a gota. Na literatura, já foram comprovados diversos efeitos terapêuticos para a *Casearia sylvestris*, os quais se enquadram: anti-inflamatórios, antiespasmódicos e anti úlcera (ARGENTA *et al.*, 2011; FRANCESE, 2020).

A gota é um distúrbio metabólico caracterizado por elevadas concentrações de ácido úrico no sangue, sendo esta condição designada hiperuricemia. A hiperuricemia pode causar depósito de cristais de urato monossódico nos tecidos, principalmente no tecido sinovial das articulações, nos ossos, nos rins e na pele, independentemente da presença ou ausência de manifestações clínicas (AZEVEDO *et al.*, 2017). A hiperuricemia nem sempre leva à gota, mas a gota sempre é precedida pela hiperuricemia. (WHALEN *et al.*, 2016).

A reação inflamatória nas articulações resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios, dentre eles os neutrófilos. Os neutrófilos são os granulócitos de defesa mais abundantes e, em geral, são as primeiras células que chegam ao local da lesão. (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018). Eles são especializados em fagocitar e destruir os patógenos.

As intervenções terapêuticas agudas visam ao tratamento sintomático das crises de gota por meio do uso de agentes anti-inflamatórios, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), colchicina e corticosteroides, para inibirem a ativação de neutrófilos e monócitos.

Os tratamentos para a gota crônica envolvem o uso de fármacos como alopurinol e febuxostate para diminuir os níveis plasmáticos de urato ao restabelecerem o equilíbrio entre síntese e excreção de urato. No Brasil, apenas o alopurinol é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o

tratamento da gota crônica. Ainda, existem os agentes uricosúricos como a probenecida, a benzbromarona e a sulfimpirazona que aumentam a excreção renal de urato (GOLAN *et al.*, 2014). Entretanto, existem poucos fármacos disponíveis para tratamento da hiperuricemia, além deles possuírem diversos efeitos colaterais dentre eles, reações gastrintestinais (diarreias, úlceras no intestino) e, ainda, cefaleia frontal, tonturas e delírios (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

Os derivados de fontes naturais podem ser obtidos de extratos vegetais (SILVA *et al.*, 2021). Neste contexto e tendo em vista os possíveis problemas que os anti-inflamatórios podem provocar, cresce o interesse em encontrar novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios de fonte natural.

Justifica-se, assim, a importância do estudo e da pesquisa sobre plantas medicinais a fim de que se obtenha novos Insumos Farmacêuticos Ativos Vegetais (IFAVs) para a elaboração de medicamentos fitoterápicos e novos fármacos que apresentem maior eficácia, segurança e menos efeitos adversos no tratamento da gota.

Vale a pena destacar que o Laboratório de Plantas Mediciniais (LAPLAMED) da Universidade Federal de Ouro Preto é pioneiro no Brasil na pesquisa de plantas medicinais para o tratamento da gota.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiopatologia da gota

A gota é um distúrbio metabólico caracterizado por concentrações elevadas de ácido úrico no sangue (6mg/dl em mulheres e 7mg/dl em homens), condição conhecida como hiperuricemia. A elevação dos níveis de ácido úrico sérico, é fator de risco para diversas doenças, dentre elas a artrite gotosa, uma patologia decorrente do acúmulo e depósito de urato monossódico nas articulações. Além do tecido sinovial das articulações, o depósito de urato pode ocorrer nos ossos, nos rins e na pele, independentemente da presença ou ausência de manifestações clínicas associadas (AZEVEDO *et al.*, 2017).

A hiperuricemia é causada por um desequilíbrio entre a produção excessiva de ácido úrico devido ao alto índice de metabolismo das purinas e/ou pela incapacidade do paciente de excretar este composto por via renal. O catabolismo das purinas, adenina e guanina, produz ácido úrico (Figura 1, página 11). Em condições fisiológicas, o ácido úrico é majoritariamente ionizado e se apresenta no plasma como

urato de sódio. Uma concentração de urato sérico elevada é conhecida como hiperuricemia.

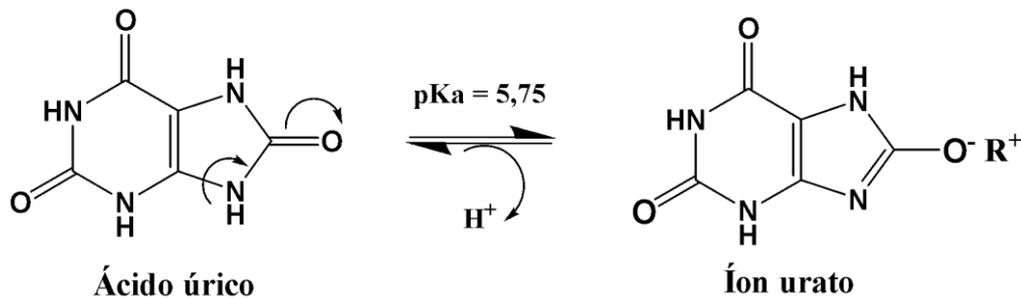


Figura 1: Ácido úrico e íon urato
Fonte: Allan Gaw *et al.* (2015)

Em média é necessário excretar 700 mg ao dia de ácido úrico para que se mantenha a concentração do ácido úrico em níveis que impliquem em risco de levar a deposição (NETO, 2016). Cabe destacar que a hiperuricemia nem sempre leva à gota, mas a gota sempre é precedida pela hiperuricemia (WHALEN, *et al.*, 2016).

A prevalência de hiperuricemia se destaca entre os homens, principalmente em indivíduos com sobrepeso ou obesos, com vida sedentária e que fazem ingestão de alimentos ricos em purinas e de bebidas alcoólicas com frequência, sendo que apresenta 5-28/1000 homens comparado com 1-6/1000 mulheres (SBR, 2022). O predomínio dessa patologia é de 95% em homens, aumentando entre os 40-60 anos e em negros (CARVALHO, 2010). As mulheres raramente desenvolvem gota antes da menopausa e geralmente tem mais de 60 anos de idade quando a desenvolvem (SBR, 2022). A hiperuricemia é alta em pacientes com síndrome metabólica, que é o conjunto de fatores de risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (PUIG e MARTINEZ, 2008; BERNARDES, 2018).

A gota ocorre mais comumente nas articulações periféricas. O urato é menos solúvel em temperaturas mais baixas, o que pode explicar a distribuição periférica dos depósitos de cristais do urato (GOLAN *et al.*, 2014).

Quando o limite fisiológico de solubilidade de urato é alcançado, pode haver a formação e precipitação de cristais de urato de monossódico (UMS) nas articulações, e quando há recorrência de crises agudas de gota podem ocorrer o aparecimento de tofos gotosos (Figura 2, página 12). Os tofos gotosos são nódulos cutâneos, eventualmente associados a crises de gota recidivantes que podem levar à destruição articular. Eles são visíveis, palpáveis e indolores, podendo estar presentes em superfícies digitais e nas orelhas, com coloração amarelada quando superficialmente

sob a pele. (DOS SANTOS, 2021). No entanto, eles se localizam preferencialmente sobre joelhos, cotovelos, dedos e pavilhão auricular (NETO, 2016).



Figura 2: Gota tofácea crônica
Fonte: Dos Santos (2021)

Ressalta-se, ainda, que vários fatores podem contribuir para a formação de cristais de ácido úrico nos rins, nos ureteres ou na própria bexiga, quando a pessoa ingere alimentos com alta concentração de purinas, como, por exemplo, carnes, frutos do mar e vísceras; alto consumo de bebidas alcoólicas; ingestão de líquidos insuficientes para que a urina possa dissolver todo o ácido úrico; e anormalidades metabólicas, como, por exemplo, a incapacidade do organismo de tornar a urina menos ácida (SBR, 2022).

O metabolismo do ácido úrico é desencadeado de forma irreversível pela xantina oxidase. Esta enzima catalisa a reação de síntese de ácido úrico a partir de hipoxantina e xantina, nas últimas etapas do metabolismo de purinas. Nesse sentido, as purinas monofosfato de adenosina (AMP) e monofosfato de guanosina (GMP) são metabolizadas em hipoxantina e xantina, respectivamente. A hipoxantina formada se transforma em xantina pela ação da xantina oxidase. A xantina, por sua vez, sofre uma ação irreversível da enzima xantina oxidase se transformando em ácido úrico e, finalmente, em urato de sódio (Figura 3, página 13) (DOS SANTOS, 2021).

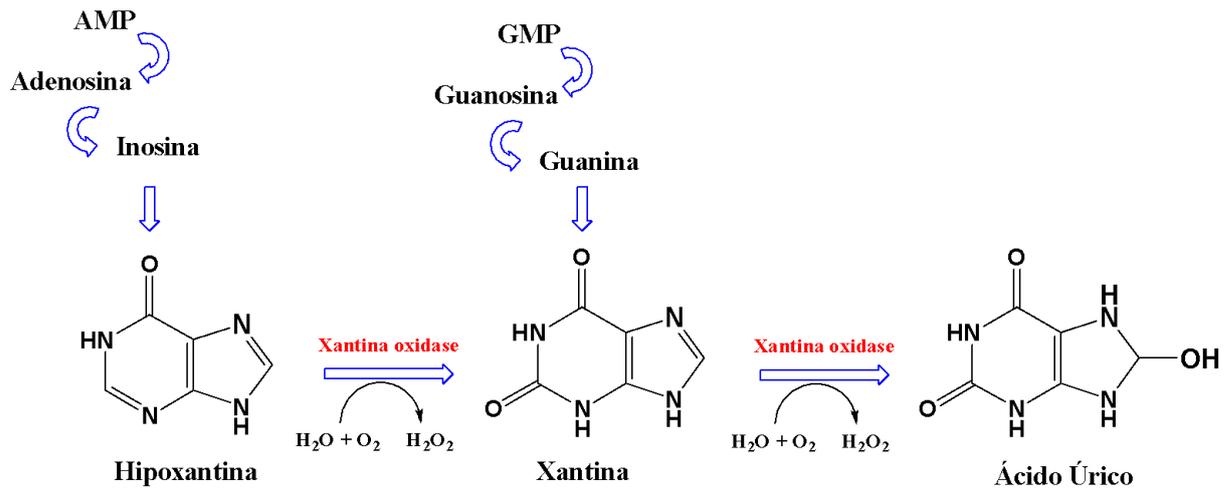


Figura 3: Catabolismo das purinas
Fonte: Adaptado de Lehninger, 2008

Os seres humanos se distinguem de outros mamíferos pela ausência da enzima hepática uricase, responsável por converter o ácido úrico em alantoína que é facilmente excretada na urina. Desse modo, a ausência da uricase junto com a extensa reabsorção de ácido úrico nos túbulos proximais renais resulta em elevados níveis de urato na corrente sanguínea. A uricase não está presente nos humanos devido a inativação do gene responsável pela sua síntese, ocorrida no processo de evolução dos primatas (JOHNSON *et al.*, 2003; BERNARDES, 2018). A maioria dos uratos são produzidos no fígado, sendo provenientes do metabolismo tanto das proteínas endógenas quanto das exógenas (GAW *et al.*, 2015).

Quando um indivíduo apresenta a taxa de ácido úrico acima de 6 mg/dl em mulheres e 7 mg/dl em homens pode-se então afirmar que há hiperuricemia. A terapia farmacológica assim como a não farmacológica é necessária para o controle e prevenção das crises da gota, visando à melhoria geral do estado de saúde e qualidade de vida dos cidadãos (SHEIKH, 2015). Nesse sentido, a maioria das estratégias terapêuticas contra a gota envolve a redução do nível de ácido úrico abaixo do ponto de saturação, prevenindo, dessa maneira, a deposição dos cristais de urato. Este objetivo pode ser alcançado mediante o uso de agentes farmacológicos que interfiram na síntese de ácido úrico ou no aumento da sua excreção (AZEVEDO, *et al.*, 2017).

2.2 Reação inflamatória e migração de neutrófilos

O sistema imunológico consiste em uma rede complexa de órgãos, células e moléculas e sua finalidade é manter a homeostasia do corpo, combatendo as agressões em geral. Dessa forma, a primeira linha de defesa do organismo contra danos nos tecidos é uma resposta inflamatória, um processo biológico complexo que inclui componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis. Além disso, são manifestados sintomas clínicos de vermelhidão característica, calor, edema, dor e perda da função (CRUVINEL *et al.*, 2010).

De acordo com Golan e colaboradores (2014), os mediadores inflamatórios liberados em decorrência da lesão de um tecido dilatam arteríolas e vênulas pós-capilares. Em decorrência da vasodilatação o resultado é o aumento do fluxo sanguíneo para o local da lesão, produzindo os sinais clínicos de vermelhidão e calor. Mediadores inflamatórios também causam contração de células endoteliais vasculares, levando ao aumento da permeabilidade capilar e formação de exsudato, que por sua vez, produz as manifestações clínicas de edema. Já a dor é consequência de aumento de pressão tecidual e ação de vários mediadores inflamatórios.

A imunidade inata é caracterizada como a primeira linha de defesa do organismo e ela funciona em conjunto com a imunidade adaptativa. Ela é caracterizada por uma resposta rápida à agressão a patógenos a qual se torna imediatamente disponível para conter o processo inflamatório ou infeccioso. Seus mecanismos de defesa incluem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis (CRUVINEL *et al.*, 2010). Para que ela aconteça de forma eficaz é preciso que ocorram várias etapas intimamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema. Na primeira fase, o sistema vascular ao redor do local da lesão responde ao recrutamento de células do sistema imunológico. Desse modo, as células imunes circulantes migram desses vasos para o tecido danificado, e os mecanismos de imunidade inata e adaptativa são usados para neutralizar e remover o estímulo desencadeante. Então começa o processo de regeneração e cura dos tecidos e, finalmente, há a interrupção do processo inflamatório agudo. Assim, se a inflamação não for detida e permanecer latente pode ocorrer inflamação crônica (GOLAN *et al.*, 2014).

Os principais tipos de células efetoras do sistema imune inato incluem granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mastocitos, células apresentadoras

de antígeno (GOLAN *et al.*, 2014) e células *Natural Killer* – NK (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Os neutrófilos são os leucócitos granulócitos mais abundantes no sangue periférico (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018). “Granulócito” é termo descritivo, que se baseia no aspecto dos grânulos citoplasmáticos existentes no interior dessas células (GOLAN *et al.*, 2014). Os grânulos citoplasmáticos característicos dessas células contêm substâncias capazes de potencializar a inflamação no local da lesão. Primariamente, essas células envolvem os agentes agressores em vesículas fagocíticas e, logo após, os destroem por meio da utilização de enzimas como a mieloperoxidase no interior dessas próprias vesículas (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

A reação inflamatória nas articulações tem como consequência um estresse oxidativo nas células de defesa, em que são liberados mediadores pró-inflamatórios, que auxiliam no recrutamento dos neutrófilos. Os neutrófilos são os granulócitos de defesa mais abundantes e, em geral, são as primeiras células que chegam ao local da lesão. Eles são responsáveis por fagocitarem os depósitos de cristais de urato (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Na artrite gotosa, a deposição ou a liberação dos cristais pré-formados iniciam uma atividade inflamatória devido a infiltração de neutrófilos, monócitos e macrófagos (DOS SANTOS, 2021). Então, os neutrófilos secretam mediadores inflamatórios que diminuem o pH local e determinam uma precipitação adicional de urato (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

Como mostra a figura 4 (página 16), durante uma crise aguda de gota, o urato monossódico (UMS) liga-se a receptores semelhantes a *toll* (TLR) nos monócitos (1). A ativação dos TLR inicia a fagocitose de cristais de UMS (2), com montagem subsequente de enzimas de resposta inflamatória intracelular designadas como inflamassomo (3). A montagem do NALP-3 inflamassomo ativa a caspase 1, uma enzima que cliva a pró-IL-1 β inativa na citocina ativa, a IL-1 β (4). A IL-1 β é liberada no espaço extracelular, no qual se liga a receptores expressos nas células endoteliais. A ativação subsequente das células endoteliais (5) leva à liberação de fatores quimiotáticos, como a IL-8 (6), que recrutam neutrófilos (7). Os mediadores pró-inflamatórios liberados pelas células endoteliais ativadas e neutrófilos completam uma alça de retroalimentação positiva de liberação adicional de IL-1 β , ativação endotelial e recrutamento de neutrófilos (8) (GOLAN *et al.*, 2014).

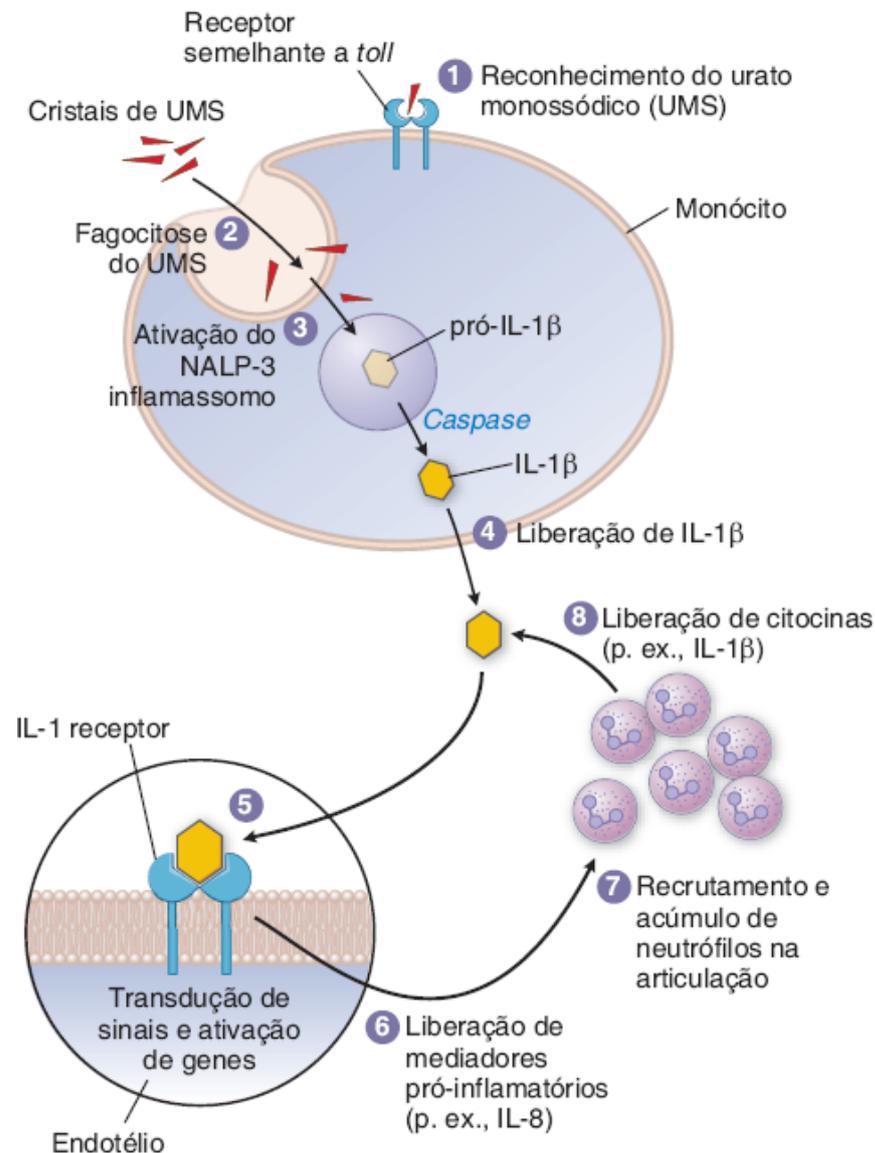


Figura 4: Mecanismos da resposta inflamatória aos cristais de urato
 Fonte: Golan *et al*, 2014

2.3 Tratamento da hiperuricemia

A maioria das estratégias terapêuticas contra a gota está relacionada a redução do nível de ácido úrico abaixo do ponto de saturação (6 mg/dl para mulheres e 7mg/dl para homens), prevenindo, dessa maneira, a deposição dos cristais de urato nos tecidos. Este fato pode ser alcançado por meio do uso de agentes que interfiram na síntese de ácido úrico ou no aumento da sua excreção (AZEVEDO *et al.*, 2017).

Os ataques agudos de gota e a subsequente inflamação podem derivar de várias condições, incluindo consumo excessivo de álcool, dieta rica em purinas e doença renal (WHALEN, 2016). Qualquer variável capaz de diminuir a solubilidade do

urato pode promover o depósito de cristais de urato (GOLAN *et al.*, 2014). Neste contexto, as estratégias para tratar a gota e a hiperuricemia envolvem o uso de agentes farmacológicos e não-farmacológicos para prevenir e tratar as crises agudas de inflamação, a utilização de um inibidor da xantina oxidase para reduzir a produção de urato ou o uso de um agente uricosúrico para aumentar a excreção de ácido úrico (AZEVEDO *et al.*, 2017).

As medidas não farmacológicas são uma forma de prevenir as crises agudas de gota. Dessa maneira, pode-se ter baixa ingestão de bebidas alcoólicas, em especial a cerveja, alimentos ricos em nucleotídeos e ácidos nucleicos, como: carnes, peixes, frutos do mar, fígado ou produtos glandulares. Outra medida se relaciona a substituição de diuréticos tiazídicos por outras medicações anti-hipertensivas, uma vez que os fármacos dessa classe podem precipitar o aumento de ácido úrico no sangue (DOS SANTOS, 2021).

O tratamento da gota aguda tem como objetivo controlar a dor e utiliza fármacos que limitam a inflamação articular. Os fármacos mais utilizados na prática clínica são os AINES, os glicocorticoides e a colchicina (GOLAN *et al.*, 2014).

Os AINES inibem a cicloxigenase (COX) e, portanto, inibem a síntese de prostaglandinas e tromboxano sendo efetivos para a maioria das crises agudas de gota. Na prática clínica, a indometacina é um dos AINES utilizados com maior frequência no tratamento das crises agudas de gota. (GOLAN *et al.*, 2014). No entanto, os AINEs apresentam diversos efeitos adversos que envolvem o trato gastrointestinal (TGI) (gastrite, sangramento, perfuração), os rins (necrose papilar renal, redução da depuração de creatinina), o sistema cardiovascular (elevação da pressão arterial, retenção de sódio e de líquidos) e sistema nervoso central (comprometimento da função cognitiva, tonturas) (FERREIRA, 2017). Os inibidores seletivos da cicloxigenase 2 (COX-2), como exemplo, o celecoxibe, constituem uma subcategoria dos AINES que podem ser mais seguros para o estômago embora a preocupação acerca de seus efeitos adversos cardiovasculares limite seu uso a longo prazo (GOLAN *et al.*, 2014). Entretanto, devido à toxicidade renal e cardiovascular desses medicamentos, seu uso deve ser cuidadosamente analisado e individualizado (AZEVEDO *et al.*, 2017).

A colchicina é um alcaloide natural que inibe a fagocitose de cristais de urato monossódico, e as respostas imunes associadas com a imunidade celular. É eficaz para o tratamento agudo, bem como para a profilaxia ao longo da manutenção da

uricemia (FERREIRA, 2017). Na articulação agudamente inflamada, a colchicina pode alterar a motilidade dos neutrófilos e diminuir a secreção de fatores quimiotáticos e ânions superóxidos pelos neutrófilos ativados (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018). De acordo com Golan *et al.* (2014) os mecanismos de inibição dos neutrófilos pela colchicina incluem: diminuição do tráfego de partículas fagocitadas para os lisossomos; liberação diminuída de fatores quimiotáticos; diminuição de motilidade e adesão dos neutrófilos; e diminuição da fosforilação da tirosina das proteínas dos neutrófilos, com consequente diminuição na síntese de leucotrieno B4. Ferreira (2017) relata que devido a probabilidade de o sucesso diminuir se o tratamento for tardio, a colchicina só deve ser usada dentro de 24 horas após o início da crise. O trato gastrointestinal é particularmente suscetível à toxicidade da colchicina levando ao aparecimento de efeitos adversos como: náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

Os glicocorticoides, por exemplo, a prednisolona, também são utilizados e têm eficácia e tolerância semelhantes aos AINES. Eles exercem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores poderosos ao inibirem numerosas etapas da resposta inflamatória do ataque agudo de gota (GOLAN *et al.*, 2014). Podem ser administrados de forma intramuscular ou intra-articular sendo estas com ação mais rápida e efetiva (FERREIRA, 2017). A administração intra-articular de corticosteroides deve ser feita quando apenas uma ou duas articulações são afetadas e o tratamento sistêmico é indicado para envolvimento articular mais disseminados (WHALEN, 2016). São descritos inúmeros efeitos colaterais sistêmicos dos glicocorticóides, entre eles os principais são osteoporose, fraturas ósseas, fraqueza do músculo esquelético, atrofia muscular principal, miopatia, dislipidemia, hipertensão, resistência periférica à insulina, hiperglicemia, retardo do crescimento em crianças, diminuição da libido, impotência, supressão do eixo HPA, hipocalcemia, irritação gástrica, úlcera péptica, glaucoma, catarata, distúrbios do sono, irritabilidade, depressão e síndrome de Cushing (TORRES *et al.*, 2012).

O tratamento da gota crônica tem por objetivo modificar o metabolismo das purinas para obter concentrações plasmáticas normais de urato. Por conseguinte, os agentes farmacológicos utilizados no tratamento da gota crônica diminuem a produção de urato ou aumentam sua depuração renal (AZEVEDO *et al.*, 2017). A meta da terapia para redução de urato consiste em alcançar e manter um nível sérico de ácido

úrico abaixo de 6 mg/dl e, de preferência inferior a 5 mg/dl se os sinais ou sintomas persistirem (FERREIRA, 2017).

Os fármacos utilizados para inibir a xantina oxidase, a enzima que catalisa a conversão de purinas em ácido úrico são o alopurinol e o febuxostate. No entanto, o febuxostate não teve seu uso aprovado pela ANVISA (AZEVEDO *et al.*, 2017). Quando a xantina-oxidase é inibida, os produtos de excreção do metabolismo das purinas são a xantina e a hipoxantina, que são mais hidrossolúveis que o ácido úrico e apresentam menor probabilidade de formar depósitos de cristais. (AZEVEDO *et al.*, 2017). O alopurinol é a terapia de escolha, uma vez que é eficaz em cerca de 90% dos pacientes, é administrado em dose única uma vez ao dia e possui baixo custo (AZEVEDO *et al.*, 2017). Este fármaco é análogo estrutural da xantina que ao inibir a xantina oxidase diminui a concentração de ácido úrico no sangue. A forma oxidada do alopurinol, conhecida como oxipurinol, inibe a xantina oxidase, impedindo a interconversão do molibdênio no sítio ativo da enzima entre os estados de oxidação +4 e +6, “congelando” essencialmente a enzima (GOLAN *et al.*, 2014). O alopurinol é bem tolerado pela maioria dos pacientes. Os efeitos adversos mais comuns se relacionam a reações de hipersensibilidade, especialmente eritemas cutâneos. O risco é maior naqueles pacientes com função renal diminuída (WHALEN, 2016). Ele não deve ser administrado durante episódio agudo de gota, pois a interrupção da homeostasia do urato pode agravar ou precipitar crises agudas de artrite gotosa. Desse modo, um AINE, colchicina ou corticosteroides são frequentemente coadministrados durante os primeiros 4 a 6 meses de tratamento com alopurinol para reduzir a probabilidade de precipitar ataque agudo de gota (GOLAN *et al.*, 2014).

O febuxostate é um inibidor não purínico da xantina oxidase que diferentemente do alopurinol, que inibe a forma reduzida da xantina oxidase, o febuxostate forma um complexo estável com a enzima tanto reduzida quanto oxidada e inibe a função catalítica em ambos os estados (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018). O perfil de efeitos adversos é similar ao do alopurinol, embora o risco de urticária e de reações de hipersensibilidade seja reduzido. O febuxostate não tem o mesmo grau de eliminação renal do alopurinol e, por isso, requer menor ajuste naqueles pacientes com a função renal diminuída (WHALEN, 2016).

O Lesinurade é um novo medicamento aprovado recentemente pela ANVISA, é uma terapia combinada que age tanto na excreção quanto na produção do ácido úrico, proporcionando uma abordagem de duplo mecanismo que efetivamente reduz

o urato sérico e permite que um número significativamente maior de pacientes atinja e mantenha as metas do tratamento para controle da doença (BRASIL, 2016). Entretanto, ele apresenta uma advertência em tarja preta, devido ao risco de insuficiência renal aguda, que é mais comum quando o fármaco é usado sem inibidor da xantina oxidase. Além disso, possui efeitos adversos quanto a elevações nos níveis sanguíneos de creatinina, aumento no risco de nefrolitíase, cefaleia, sintomas semelhantes aos da gripe e refluxo gastroesofágico (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

Os agentes uricosúricos, probenecida, benzbromarona e sulfimpirazona inibem o transportador de ânions orgânicos 4 (OAT4) e o trocador de ânion urato renal 1 (URAT1), impedindo assim a reabsorção de ácido úrico pelos rins e, em consequência disso, diminuem os níveis de ácido úrico sérico. Desse modo, 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 (KYDD *et al.*, 2013; BERNARDES, 2018). Vale a pena ressaltar que, no Brasil, somente a probenecida e a benzbromarona tem o uso aprovado pela ANVISA e que a sulfimpirazona não está disponível (AZEVEDO *et al.*, 2017).

A pegloticase, que também não está disponível no Brasil, é uma uricase peguilada (urato-oxidase), que catalisa a oxidação enzimática do ácido úrico em alantoína, um metabólito mais solúvel e inativo. Este fármaco é usado no tratamento da gota crônica grave refratária ao tratamento ou quando o uso de outras terapias para reduzir o urato está contraindicado (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018). Pequena porcentagem de pacientes apresenta reações alérgicas à proteína estranha, sendo comum a produção de anticorpos dirigidos contra o fármaco (GOLAN *et al.*, 2014). Além disso, apresenta efeitos adversos relacionados a reações anafiláticas e a hemólise em pacientes com deficiência de G6PD, vômitos, náuseas, dor torácica, constipação intestinal, diarreia, eritema, prurido e urticária (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

2.4 *Casearia sylvestris*

A *Casearia sylvestris* é uma planta que pertence à família Salicaceae, a qual é originária do Brasil e outras espécies do gênero podem ser encontradas em diversos países do mundo. No Brasil ela é encontrada em regiões tropicais e subtropicais

(FRANCESE, 2020) sendo popularmente conhecida e em função da região onde ocorre como “guaçatonga”, “erva-de-lagarto”, “chá-de-bugre” (FERREIRA, 2023), café-bravo, café-do-diabo, cafeeiro-do-mato, erva-de-tiú ou erva-de-lagarto (ARAÚJO *et al.*, 2014).

A espécie é uma árvore, perene, com 4 a 20 m de altura (FERREIRA, 2023) arbustos e subarbustos lenhosos, e o tronco pode apresentar a textura da casca de lisa a fissurada (DA SILVA, 2016) de coloração acinzentada a acastanhada, rugosa e com pequenas fendas superficiais. Suas folhas são alternas, simples, assimétricas, lanceoladas e até ovaladas ou elípticas, ápice agudo, base estreita ou arredondada, de até 14 cm de comprimento x 6 cm de largura, margem serrada, com face superior brilhante e inferior opaca; flores pequenas, numerosas, hermafroditas, branco-esverdeadas ou amareladas, medindo cerca de 0,3 cm de diâmetro, reunidas em inflorescências axilares do tipo umbela, sendo abundante em todos os ramos; fruto tipo cápsula, ovoide-globulosa, pequeno, de até 3,5 mm de diâmetro, vermelho quando maduro, possui de 2 a 6 sementes envoltas em arilo lanoso, amarelo e comestível (FERREIRA, 2023) .

É uma planta que possui ampla utilidade popular devida às suas atividades anti-hiperglicemiante, antibacteriana, antifúngica, anti secretora, (GILBERT e FAVORETO, 2022) antiviral, anti-inflamatória, analgésica, anti-histamínica, gastroprotetora, cicatrizante, hipolipemiante, tônica cardíaca, antiofídica, depurativa, digestiva e diurética (FERREIRA, 2023). Tribos indígenas utilizam a casca macerada da *Casearia sylvestris* para tratar distúrbios gastrointestinais, picadas de cobra e para curas de feridas, enquanto que as folhas são utilizadas como um anti-inflamatório (RIBEIRO *et al.*, 2019). O uso popular da *Casearia sylvestris* é feito especialmente nas formas de infusões, decoctos e tinturas, obtidas, em sua grande maioria, de modo artesanal (ARAÚJO *et al.*, 2014).

O Ministério da Saúde publicou, em 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), uma lista que contém 71 espécies de plantas que apresentam potencial medicinal, sendo estas relevantes para o SUS (ARAÚJO *et al.*, 2014; FRANCESE, 2020). A planta *Casearia sylvestris* está incluída nesta lista, fato que estimula o estudo e conhecimentos de suas propriedades biológicas como forma de assegurar suas aplicações terapêuticas (ARAÚJO *et al.*, 2014).

2.4.1 Metabólitos secundários

As plantas produzem uma imensa quantidade de compostos com estruturas químicas complexas que não possuem funções bem definidas porque não desempenham um papel específico no metabolismo, no crescimento e na divisão celular (SIMÕES, 2017). Estes compostos são designados metabólitos secundários os quais são compostos especializados e altamente específicos que desempenham um papel importante na evolução dos vegetais e na interação com os seres vivos (BORGES, 2020), além de apresentarem potencial relevância terapêutica (SIMÕES, 2017).

É expressamente relevante destacar que os constituintes químicos de uma planta variam de acordo com aspectos ambientais como: solo, os nutrientes disponíveis, clima, regime de ventos, região onde a planta foi coletada, entre outros fatores (SILVA *et al.*, 2021).

Os metabólitos secundários encontrados na *C. sylvestris* são descritos em um estudo realizado por Spósito e colaboradores (2018) no qual foram identificados: monoterpenos, sesquiterpenos, isoprenoides, fenóis, flavonoides, neoligninas e derivados do ácido gálico. O mesmo estudo relatou que dentre os metabólitos secundários presentes os diterpenos clerodânicos (casearinas) merecem destaque especial, uma vez que eles são considerados os marcadores taxonômicos da espécie.

Oda (2021) verificou em seu estudo que dos 42 diterpenos clerodânicos identificados em *C. sylvestris*, 27 são do tipo das casearinas e apresentam a mesma estrutura básica. Foram também identificados no extrato etanólico das folhas da *C. sylvestris* outros tipos de diterpenos clerodânicos, com estruturas menos complexas, como o (-) - ácido hardwickiico e a 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona (Figura 5, página 22), além de diterpenos ent-kauranos.

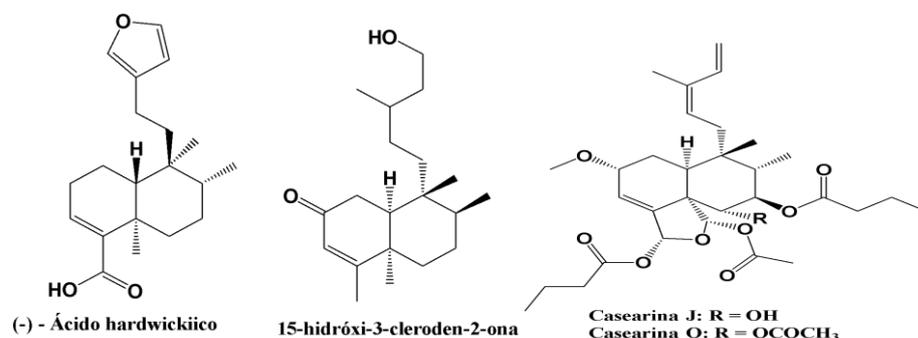


Figura 5: Alguns diterpenos clerodânicos isolados da *Casearia sylvestris*
Fonte: Oda (2021)

No trabalho realizado por Araújo *et al.* (2014), foi constatado nas avaliações fitoquímicas que a maioria das propriedades antiulcerosas, anti-inflamatórias, antiofídica e antimicrobiana são atribuídas a diterpenos clerodânicos presentes em diferentes órgãos da planta, como por exemplo, as casearinas (Figura 5, página 22), casearvestrinas e caseargrevinas.

2.4.2 Atividades biológicas

Vários estudos demonstraram o potencial terapêutico e anti-inflamatório da *Casearia sylvestris*. Spósito e colaboradores (2018) avaliaram a atividade anti *Helicobacter pylori* em estudos *in vivo* e *in vitro* dessa planta por meio do uso de extratos etanólicos adicionados em um sistema lipídico nanoencapsulado. Eles puderam relatar que a análise fitoquímica dos extratos indicou a presença de diterpenos clerodânicos, os quais estão relacionados com a atividade anti *H. pylori*.

Werle *et al.* (2009) avaliaram a atividade do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas da *Casearia sylvestris* sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos Wistar. Eles observaram que os animais que receberam a suspensão de extrato hidroalcoólico apresentaram uma redução significativa nos níveis séricos de triglicerídeos, o que não foi observado nos que receberam a suspensão do extrato aquoso.

Em um outro estudo realizado por Espinosa *et al.* (2015) no qual avaliaram as atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e a toxicidade da planta, foi descrito que o extrato etanólico de suas folhas apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella setubal*. Já o extrato metanólico dos galhos, ramos e folhas da *C. sylvestris* podem atuar contra os fungos *Aspergillus niger* e inibir *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis*.

Silva e colaboradores (2021) demonstraram que a casearina X, obtida da extração etanólica das folhas da *C. sylvestris*, demonstrou efeito citotóxico contra linhagens celulares CEM e HL-60, com valores de IC50 de 0,4µM e 0,5µM, respectivamente. Além disso, foi constatado que as casearinas L e O também demonstraram forte efeito citotóxico frente às células leucêmicas, ao contrário, do (-) - ácido hardwickiico, que não apresentou citotoxicidade. Segundo o estudo, a atividade citotóxica das casearinas é relacionada com a estrutura altamente oxigenada. A casearina X exerce a citotoxicidade através da indução da apoptose, realçando o potencial das casearinas na produção de drogas antitumorais.

Ameni (2015) relatou que não houve alterações macroscópicas e histológicas em ratos Wistar machos e fêmeas pela administração do extrato fluido da *C. sylvestris*. Contudo, em sua pesquisa verificou-se o aumento dos níveis séricos de proteína e albumina, e a diminuição de creatinina, triglicérides e colesterol total, além de hipocloremia ou hiperclorêmia.

Cavalcante *et al.* (2007) relataram que o extrato aquoso das folhas da *C. sylvestris* neutralizou proteases em venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, inibindo suas propriedades hemorrágicas e miotóxicas, prevenindo o bloqueio neuromuscular e prejudicando a integridade da membrana celular. Já no estudo de Araújo e colaboradores (2014) foi possível observar que o extrato hidroalcoólico da planta, apresentou importante atividade antinociceptiva.

Quanto aos prováveis mecanismos da atividade anti-inflamatória da *C. sylvestris*, a literatura é relativamente escassa, mas sugere que pode estar relacionada à redução da produção de prostaglandinas pela inibição da ciclooxigenase ou da fosfolipase A2 secretada. Embora as casearinas J e O e seus produtos de degradação ácida e metabolismo hepático não inibam a liberação de óxido nítrico (NO), o mecanismo anti-inflamatório de outros diterpenos pode estar relacionado ao NO, que é um importante sinal do processo inflamatório. Dessa forma, a quantificação direta ou indireta da atividade dessas enzimas e do NO pode ser proporcionalmente relacionada à resposta inflamatória (ODA, 2021).

Destaca-se que a utilização de diterpenos clerodânicos em distúrbios inflamatórios é de grande valia, pois eles também apresentam atividade antiulcerogênica e não causam gastroenterites (PIERRI *et al.*, 2017), ao contrário dos anti-inflamatórios mais utilizados no tratamento da gota.

2.4.3 Toxicidade

Assim como outros tipos de plantas, a *Casearia sylvestris* pode apresentar efeitos adversos e/ou toxicológicos. Estes efeitos podem variar desde processos alérgicos, sintomas gastrointestinais e até ao risco de óbito. (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado por Yamashita e colaboradores (2006) com três espécies da *Casearia* (*C. decandra*, *C. obliqua* e *C. sylvestris*) foi possível observar a presença de compostos, como: Cromo, Manganês, Escândio, Ferro, Cloro, entre outros elementos químicos. Não foram encontrados elementos tóxicos, como Mercúrio e Antimônio. No entanto, este mesmo estudo relatou a presença de Arsênio e Cádmio

em concentrações baixas. Do ponto de vista farmacológico e toxicológico, a presença desses elementos em baixas concentrações não causa qualquer tipo de efeito (YAMASHITA *et al.*, 2006)

De acordo com Alonso (2007) os extratos da *C. sylvestris* quando empregados nas doses indicadas, geralmente, possuem boa tolerância. A administração em doses elevadas poderá provocar vômitos e diarreia. Neste mesmo estudo foi verificado nos ensaios de toxicidade aguda por via oral, que a casearina U possui bom índice terapêutico em animais, ao se administrar doses de 30 mg/kg, 65 mg/kg e 172 mg/kg, sendo a última dose, cerca de 100 vezes maior do que a dose mínima efetiva 100% (DE100) para a atividade antiulcerogênica.

O uso terapêutico do óleo essencial da planta deve ser realizado com cautela necessitando-se, dessa maneira, do controle da quantidade de óleo essencial que atinge a corrente sanguínea, pois pode haver sensibilidade dos eritrócitos frente aos sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno, gerando toxicidade (DA SILVA, 2008). Neste mesmo trabalho foi relatado que o extrato etanólico nas larvas do microcrustáceo marinho *Artemia salina*, após a eclosão dos ovos da espécie em solução salina, apresentaram atividade tóxica moderada, enquanto que o extrato aquoso não apresentou toxicidade no ensaio.

3 JUSTIFICATIVA

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 40 anos (AZEVEDO *et al.*, 2017). A artrite gotosa está diretamente relacionada a doenças cardiovasculares, renais, diabetes, síndrome metabólica; por maior ingestão de proteínas, bebida alcoólica, bebidas adoçadas e frutose; aumento da expectativa de vida; uso de medicamentos que elevam o ácido úrico no sangue como diuréticos e o ácido acetilsalicílico (AAS) (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2023). O tratamento da gota aguda é comumente realizado por meio do uso de AINEs. No entanto esta classe de fármaco apresenta diversos efeitos adversos que envolvem o trato gastrointestinal (TGI) (gastrite, sangramento, perfuração), os rins (necrose papilar renal, redução da depuração de creatinina), o sistema cardiovascular (elevação da pressão arterial, retenção de sódio e de líquidos) e sistema nervoso central (comprometimento da função cognitiva, tonturas) (FERREIRA, 2017). Deste

modo, existe a necessidade da busca por novas alternativas para tratamento desta doença que propiciem ações terapêuticas favoráveis aos tratamentos da hiperuricemia, inflamação e gota, e com menores efeitos adversos. A *Casearia sylvestris* é uma espécie promissora, pois além de ser de fácil acesso por ter ampla distribuição no Brasil, apresenta diversas propriedades biológicas benéficas como mencionado, além de ser uma planta medicinal de interesse da RENISUS. Tendo em vista que a *Casearia sylvestris* apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade anti-inflamatória, e que não há estudos sobre os seus efeitos sobre a artrite gotosa, é importante investigar as atividades dessa espécie vegetal no tratamento da gota aguda.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar *in vivo* os efeitos do extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* sobre a migração de neutrófilos no modelo de artrite gotosa.

4.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris*;
- Obter os perfis cromatográficos do extrato etanólico da *Casearia sylvestris* por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo fotodiodo (CLAE-DAD) e detectar os constituintes majoritários;
- Avaliar *in vivo* a migração de neutrófilos do lavado intra-articular da região fêmur tibial dos camundongos da linhagem C57BL-6;
- Avaliar *in vivo* a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris*.

5 METODOLOGIA

5.1 Reagentes, solventes, material e equipamentos

- Estufa (Marconi)
- Moínho (Marconi)
- Percolador
- Evaporador rotativo
- Bomba de vácuo
- Clevenger

- Manta aquecedora
- Etanol P.A.
- Água deionizada
- Sulfato de sódio anidro
- Água Milli-Q (Milipore)
- Dimetilsulfóxido P.A. DMSO (Vetec)
- Tween 80 U.S.P. (Synth)
- Cristais de Urato Monossódico – UMS
- Indometacina (Sigma Aldrich)
- Cetamina (Syntec)
- Xilazina (Syntec)
- Albumina de Soro Bovino BSA (Sigma Aldrich)
- EDTA (Bioclin)
- Marcador de neutrófilos – PE Rat Anti Mouse Ly-6G (BD Biociences)
- Citômetro de Fluxo Bd Facscalibur
- Vórtex (Logen Scientific)

5.2 Coleta da espécie vegetal

As partes áreas da *Casearia sylvestris* Sw, foram coletadas no município de São João do Manhuaçu, MG, Brasil, no mês de junho de 2022. (Figura 6, página 27).

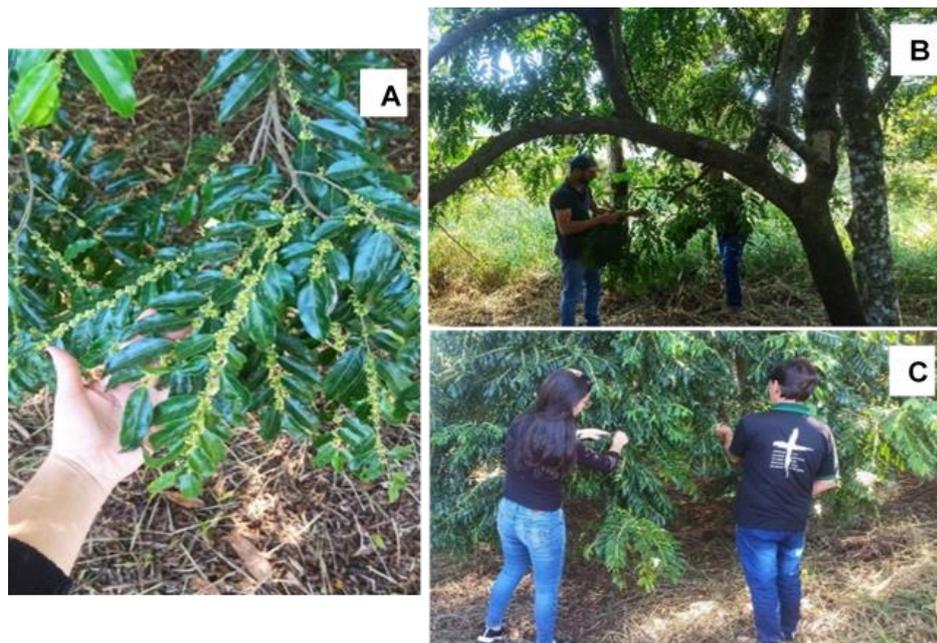


Figura 6: a) Folhas da *Casearia sylvestris*, b) Árvore da *Casearia sylvestris*, c) Arbusto da *Casearia sylvestris*

5.3 Identificação do material vegetal

A espécie vegetal foi identificada pela botânica Dr^a. Viviane Renata Scalon do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, UFOP. Uma exsicata (Figura 7, página 28) foi preparada e depositada no Herbário Professor José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto com o número de registro 36 416.



Figura 7: Exsicata da *Casearia sylvestris*

5.4 Estabilização do material vegetal

As partes aéreas do material vegetal foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar a 37°C por duas semanas. As folhas secas foram pulverizadas em moinho de facas para, posteriormente, serem submetidas à extração.

5.5 Obtenção do extrato etanólico da *Casearia sylvestris*

As folhas secas e pulverizadas (1000g) da *Casearia sylvestris* Sw foram extraídas exaustivamente, por percolação com etanol. O solvente extrator foi eliminado por evaporação em rota vapor e o extrato foi mantido em estufa a 37°C até o peso constante. Posteriormente, o pó obtido foi mantido em dessecador sob vácuo

até completa eliminação do etanol residual, originando o extrato etanólico seco da *C. sylvestris* de coloração esverdeada.

5.6 Obtenção dos perfis cromatográficos

Os perfis cromatográficos (impressões digitais) do extrato etanólico da *Casearia sylvestris* foram obtidos por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Para tal foi usado cromatógrafo da Water Alliance, acoplado a detector de arranjo diodos (DAD) modelo Waters 2996, do Laboratório Multiusuário 1 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFOP (PPG CiPharma/UFOP). A pré coluna utilizada foi do modelo Shimadzu Shim-pack GIST, C18, com dimensões de 4,0 x 10 mm. A coluna cromatográfica usada foi do modelo Shimadzu Shim-pack GIST, C18, com dimensões de 4,6 x 250 mm. As soluções dos extratos foram preparadas a 1%, diluídas em metanol grau HPLC e filtradas em filtro de seringa de 0,2 µm. As condições estabelecidas para a análise do extrato etanólico foram com fluxo de 1ml/min, temperatura da coluna de 25°C e volume de injeção de 20 µL. O método usado foi gradiente linear usando como eluentes misturas das fases móveis A e B: (A) água acidificada com ácido acético glacial 1%, pH 3,3, e (B) metanol acidificado com ácido acético glacial 1%, pH 3,2. Os cromatogramas foram extraídos na faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm.

5.7 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL-6, machos em idade adulta pesando em média 25 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 número 8876050723 (EM ANEXO). Estes animais foram escolhidos devido ao fato de que essa linhagem tem boa reprodução, é de longa duração e tem baixa suscetibilidade a tumores. Nesse sentido, camundongos C57BL/6 são usados em diversas áreas de pesquisa, como biologia cardiovascular, obesidade, diabetes, imunologia, genética e inflamação (BRYANT *et al.*, 2019; MATOSINHOS, 2019).

5.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória e anti-artrite gotosa

A artrite gotosa foi induzida pela injeção intra-articular de UMS, segundo o modelo descrito por Amaral e colaboradores (2012) com modificações e Bernardes e colaboradores (2021) com adaptações.

Os animais receberam por gavagem 0,2 ml do veículo [DMSO: Tween-80: água (1:1:8)], das diferentes doses (15 / 30 / 60 / 120 / 240 mg/kg) do extrato etanólico e do fármaco de referência (indometacina) no tratamento da crise aguda de gota. Após uma (1) hora da administração dos tratamentos, os animais foram anestesiados com uma associação de ketamina/xilazina (100/10 mg/kg) via intraperitoneal. Os animais foram depilados para aplicação de 10 µL de uma suspensão de cristais de urato monossódico (UMS) intra-articular na articulação fêmur tibial (Figura 8, página 31). Passadas 6 horas da indução da inflamação, os animais foram eutanasiados com uma injeção i.p. da associação de ketamina/xilazina (300/30 mg/kg). Após a eutanásia, foi obtido o lavado intra-articular por meio da lavagem da cavidade, por duas vezes, com 5 µL da solução de PBS 1X. Esse lavado intra-articular (10 µL) foi adicionado a um eppendorf contendo 88 µL da solução de PBS1X e 2 µL de EDTA, obtendo-se, assim um volume final de 100 µL, que foi utilizado para a contagem total de leucócitos e avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular após a administração de UMS.

Os animais foram distribuídos em grupos de seis camundongos e denominados:

- **Grupo 1 – Controle normal:** aquele que não recebeu a injeção intra-articular de UMS, apenas uma injeção intra-articular de 10 µL de PBS 1X e o veículo DMSO: Tween: Água por gavagem.
- **Grupo 2 - Controle do modelo da artrite ou controle negativo ou “controle UMS”:** aquele que recebeu a injeção intra-articular de UMS (ou seja, houve indução da artrite) e o veículo por gavagem.
- **Grupos 3 - Controles positivos:** aqueles que receberam a injeção intra-articular de UMS e tratamentos com fármacos de referência, uma hora antes da injeção de cristais de UMS. O controle positivo para a avaliação dos parâmetros inflamatórios recebeu, por gavagem, o fármaco padrão indometacina (3 mg/kg).
- **Grupos 4 a 8 – grupos testes:** aqueles que receberam a injeção intra-articular de UMS e os tratamentos com diferentes doses dos extratos etanólicos das

folhas da *C. sylvestris*, administrados uma hora antes da injeção de cristais de UMS.

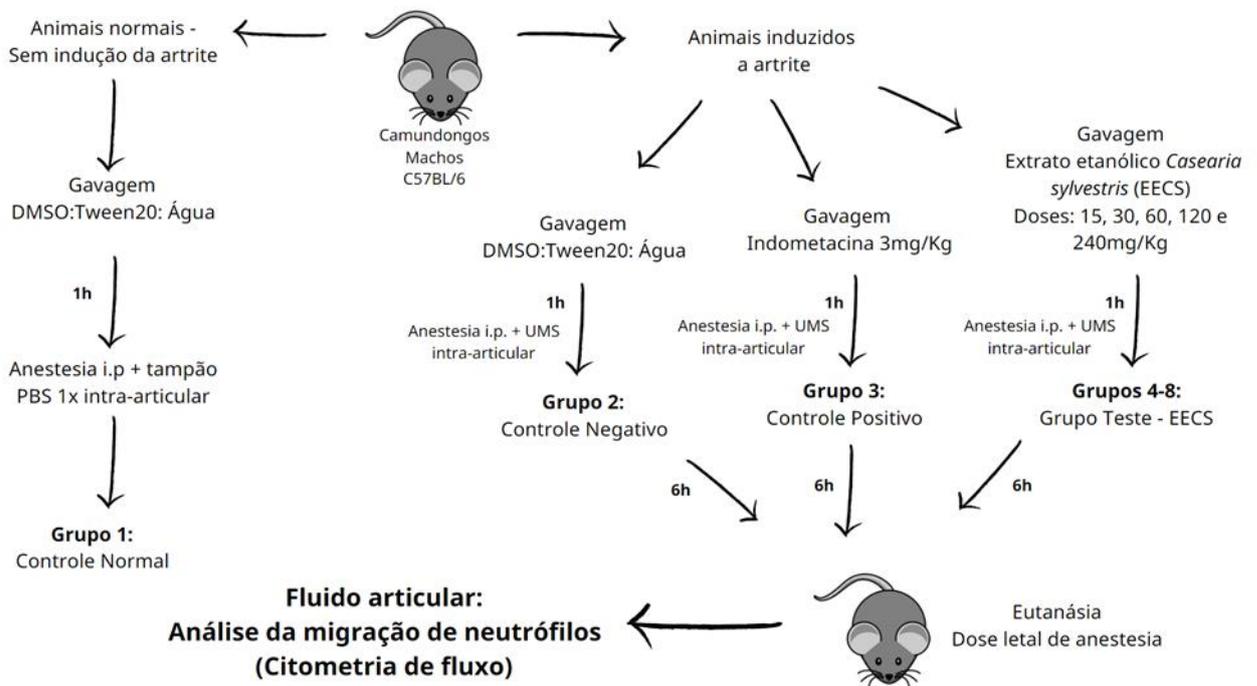


Figura 8: Esquema da avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da *Casearia sylvestris*

5.9 Contagem de neutrófilos

Os eppendorfs contendo os lavados intra-articulares foram homogeneizados (vórtex). Os lavados foram usados para a dosagem de neutrófilos no citômetro de fluxo. O marcador de neutrófilos (1 μ L) foi diluído em 499 μ L de PBS 1x com 10% de soro fetal bovino e 10% de soro de rato. Após, foi adicionado 10 μ L do marcador diluído a cada tubo de ensaio contendo o lavado articular, exceto no pool. 5 μ L de cada amostra foram adicionados a um único tubo de citometria sem marcador de neutrófilos (pool). O restante do lavado foi pipetado para tubos de citometria com marcador de neutrófilos e foram homogeneizados em vórtex e incubados a temperatura ambiente, no escuro, por 20 minutos. A cada tubo de citometria foi adicionado 1 ml de PBS 1x, estes foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes descartados, sendo a camada líquida inferior mantida (aproximadamente 100 μ L). As amostras foram então analisadas por citômetro de fluxo para obtenção da porcentagem de neutrófilos presentes em cada amostra.

5.10 Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos passaram pela Análise de Variância (ANOVA) utilizando o Software GraphPad Prism 6.0, seguido dos testes de Dunnett e Tukey. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, sendo consideradas diferenças significativas quando o valor de P for menor que 0,05 ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Rendimento dos extratos

A partir de 1000 g de planta seca e pulverizada da *Casearia sylvestris* foram obtidos 144,5 g do extrato etanólico que apresentou rendimento de 14,45%.

6.2 Perfis cromatográficos dos extratos

Na Figura 9, página 33, é apresentado o perfil cromatográfico do extrato etanólico da *C. sylvestris*, impressão digital (*finger print*), assim como os espectros no UV dos picos principais.

Os picos principais foram registrados entre 13 e 30 minutos demonstrando que os principais componentes do extrato apresentam polaridade de média a baixa.

A literatura relata que os picos majoritários referentes às casearinas (diterpenos clerodânicos) oriundas de folhas da *C. sylvestris*, apresentam espectro de absorção no UV típico dessa classe de metabólitos secundários, no comprimento de onda de 232-235 nm (ODA, 2021). Entretanto, neste presente estudo o cromatograma do extrato etanólico foi obtido no comprimento de onda 260-280 nm.

Nesse sentido, observou-se que não foi possível sugerir os constituintes químicos principais presentes no extrato etanólico, uma vez que a faixa de comprimento de onda usada não foi adequada para detectar os metabólitos secundários presentes nele. Uma nova análise será realizada.

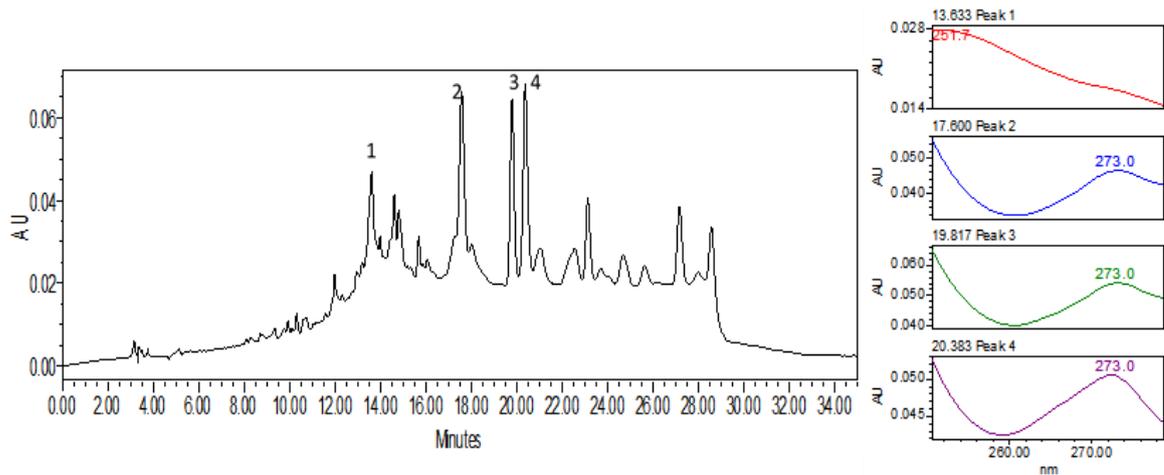


Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* Swartz e espectros no UV para os picos 1, 2, 3 e 4.

6.3 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 a partir dele fosse possível realizar a contagem de neutrófilos no quadrante Q3 das outras amostras contendo o marcador (Figura 10A, página 34).

Após definir o quadrante a ser usado para realizar a contagem da população de neutrófilos, procedeu-se com as análises individuais das amostras contendo o marcador, como mostrado na Figura 10B, página 34. No histograma da figura 10B, é possível observar que a população de neutrófilos cresceu no quadrante Q3 na amostra contendo o marcador.

Desse modo, as análises de cada amostra prosseguiram como exemplificado nos gráficos (Figura 11a-h, página 36), e a partir daí foi possível obter a porcentagem de neutrófilos presentes. Os neutrófilos presentes foram quantificados pelas leituras no citômetro de fluxo.

Na figura 11b, página 36, é possível observar que a população de células presentes no quadrante Q3 é maior no grupo UMS (controle negativo) (b) quando comparado com os demais grupos. Este fato era esperado, uma vez que o grupo controle UMS não recebeu tratamento, o que indica maior migração de neutrófilos para a região periarticular do fêmur-tibial dos camundongos. No grupo controle positivo (Figura 11c, página 36) houve redução da migração de neutrófilos, mostrando

que o fármaco (indometacina) foi capaz de inibir a migração de neutrófilos e, conseqüentemente, a inflamação induzida feita nos camundongos.

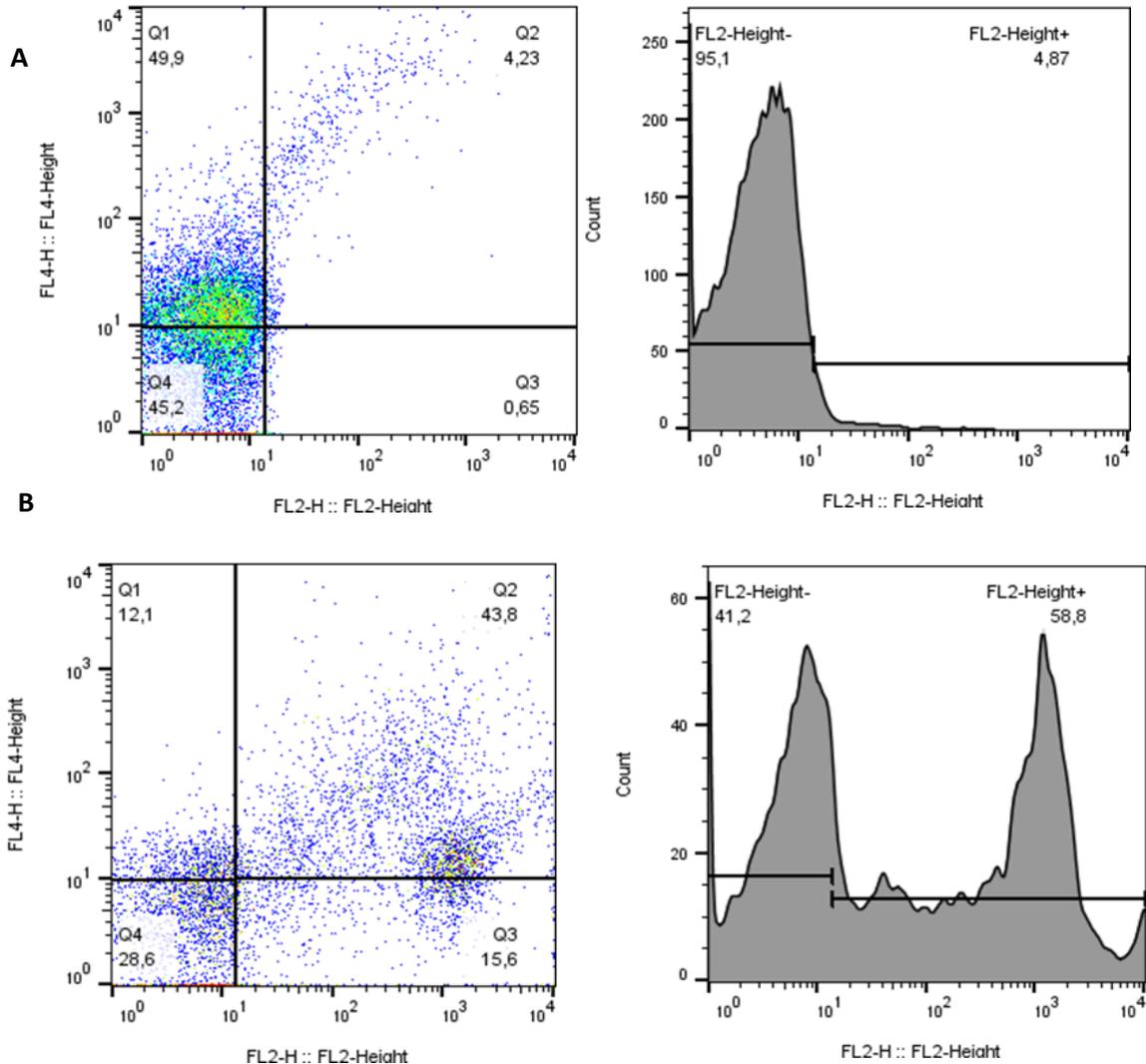


Figura 10: A) Histograma do branco (pool) sem o marcador de neutrófilos **B)** Histograma das análises de uma amostra contendo o marcador de neutrófilos, obtidos das análises do software FlowJow Diagnostic tool v.10.8.1.

As análises estatísticas mostraram que houve diferença entre o grupo controle normal e o grupo controle negativo (Figuras 10 e 11), comprovando que a inflamação foi induzida com sucesso pela injeção de UMS intra-articular. Além disso, nos animais do grupo controle normal, que recebeu apenas a injeção intra-articular de tampão (PBS 1X), a população de células presentes em Q3 foi reduzida, indicando que não houve inflamação. Os resultados apresentados pelos controles demonstraram o funcionamento do método usado.

No presente estudo, foi avaliada a ação anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* nas doses de 15, 30, 60, 120 e 240 mg/kg, em camundongos da linhagem C57BL/6 com artrite gotosa induzida pela aplicação local de cristais de UMS na cavidade intra-articular. Os resultados são mostrados na Figuras 11 e 12, páginas 36 e 37, respectivamente.

Desse modo, observa-se que houve diferença significativa entre os grupos tratados com o extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* nas diferentes doses. Além disso, verifica-se que houve diferença destes mesmos grupos em relação ao grupo controle normal e em relação ao grupo controle positivo tratado com a indometacina (AINE), já que os grupos submetidos ao tratamento com o fármaco de referência e com o extrato apresentaram menor população de neutrófilos no quadrante Q3. Os grupos tratados com o extrato etanólico nas cinco doses avaliadas, e tratados com a indometacina obtiveram respostas significativamente diferentes do grupo controle negativo.

Sendo assim, ao comparar os grupos tratados com o extrato nas cinco doses avaliadas (Figura 11d-h e 12) com o grupo controle negativo (Figura 11b e 12), observa-se que o extrato foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos para a articulação do fêmur-tibial dos camundongos da linhagem C57BL/6 e, conseqüentemente, o processo inflamatório.

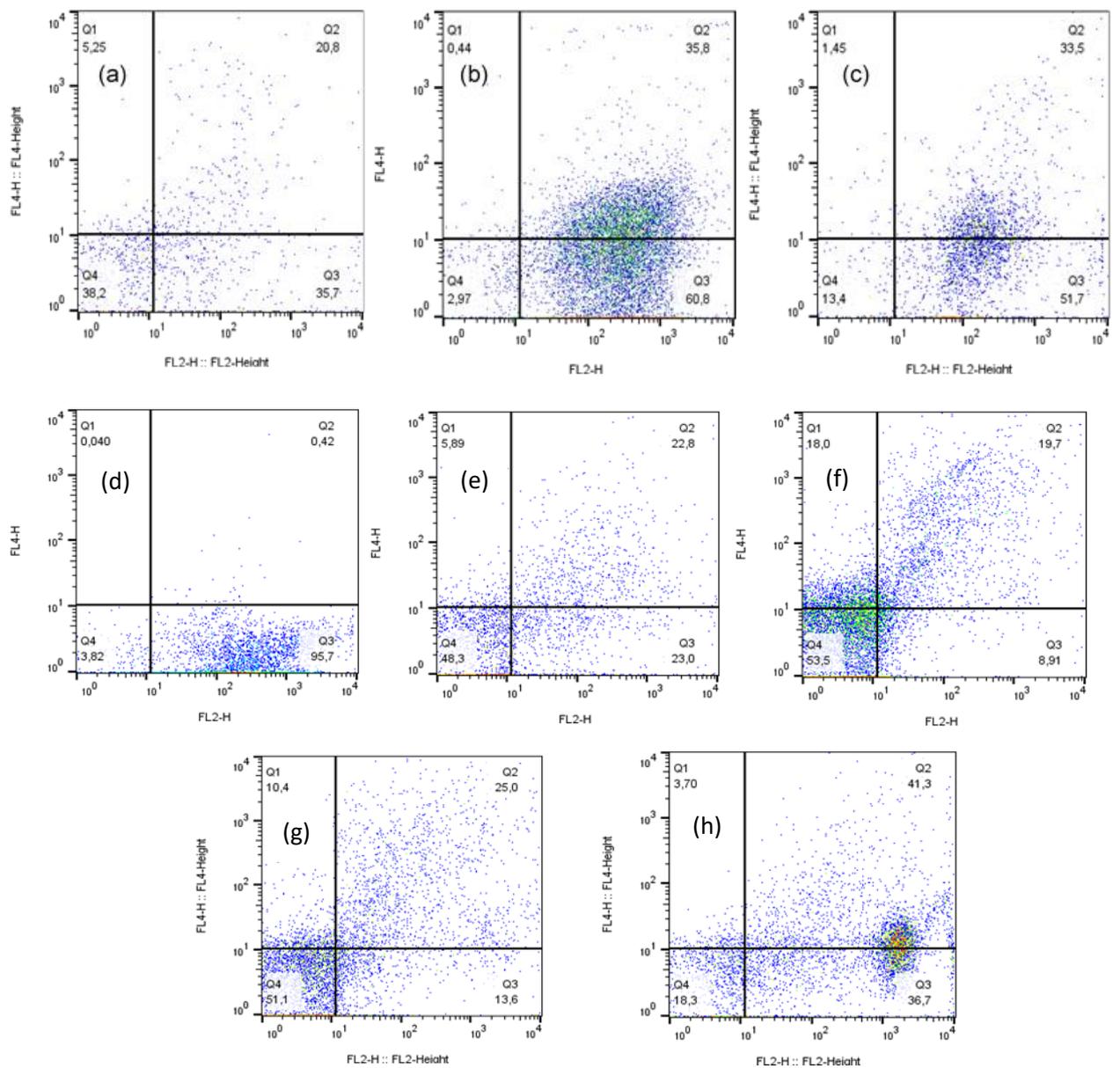


Figura 11: Histogramas dos grupos **(a)** Controle normal; **(b)** Controle UMS ou controle negativo; **(c)** Grupo indometacina ou controle positivo; **(d-h)** histogramas dos tratamentos com extrato etanólico da *Casearia sylvestris* Swartz nas diferentes doses avaliadas: **(d)** 15 mg/kg; **(e)** 30 mg/kg; **(f)** 60 mg/kg; **(g)** 120 mg/kg; **(h)** 240 mg/kg.

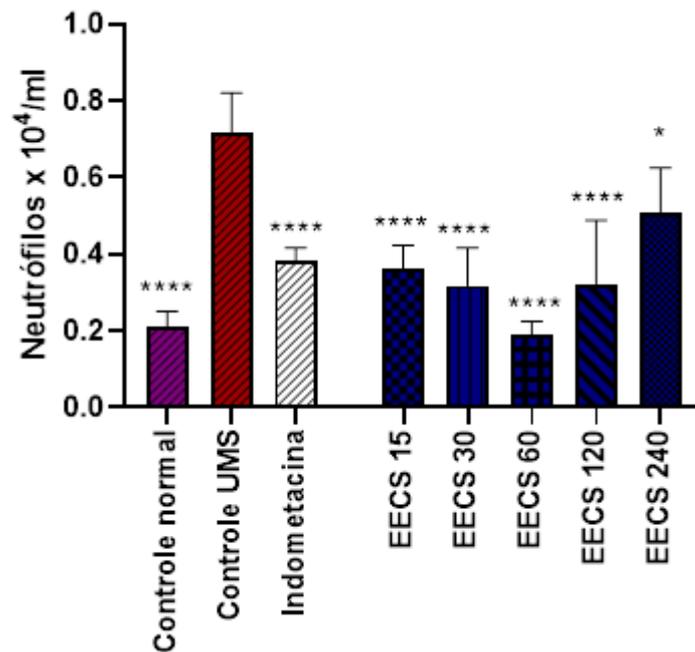


Figura 12: Efeitos do extrato etanólico da *Casearia sylvestris* (EECS) em diferentes doses sobre a migração de neutrófilos em camundongos C57BL/6 com inflamação induzida por cristais de urato monossódico (UMS) em comparação ao controle negativo (DMSO: Tween 80: água destilada (1:1:8)). Controle indometacina (fármaco padrão). * P < 0,0001 vs. controle negativo; # P < 0,0001 vs. controle normal. (n=6, One-way ANOVA seguido do teste de Dunnett).

7 DISCUSSÃO

A gota se caracteriza por uma artrite inflamatória dolorosa decorrente do depósito de cristais de UMS nas articulações, fluido sinovial e outros tecidos. Suas manifestações clínicas incluem dor intensa, edema, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação do complemento e atividade quimiotática de leucócitos (AZEVEDO *et al.*, 2017; MATOSINHOS, 2019). Como resultado, há a hipersecreção da citocina IL-1 β como produto da ativação do inflamassoma NLRP3, que tem importante papel na resposta inflamatória. A síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), enzimas (COX-2 e NO), 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- κ B. Como consequência da superprodução desses mediadores, principalmente da IL-1 β , ocorre a infiltração de neutrófilos (RAMONDA *et al.*, 2015).

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo à agressão tecidual, que tem como objetivo combater os agentes nocivos, visando à homeostase. Porém,

quando exacerbada, pode ser prejudicial para as células. A inflamação aguda é caracterizada por alterações vasculares, como vasodilatação e expressão de moléculas de superfície, que ocorrem para que mediadores inflamatórios alcancem o foco da lesão e contribuam para o desenvolvimento do processo inflamatório (CRUVINEL *et al.*, 2010).

A reação inflamatória nas articulações resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios, dentre eles os neutrófilos. Os neutrófilos são os granulócitos de defesa mais abundantes e, em geral, são as primeiras células que chegam ao local da lesão. (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

A diminuição do processo inflamatório promovida pelo tratamento com indometacina, neste estudo, foi caracterizada pela inibição da migração de neutrófilos no tecido inflamado dos animais induzidos à artrite gotosa pela injeção de cristais de UMS. 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 (BRUTON e HILAL-DANDAN, 2018).

De acordo com Gusmam e colaboradores (2015) o efeito anti-inflamatório da *Casearia sylvestris* se relaciona a inibição da liberação de TNF- α , inibição da liberação de quimiocinas e mediadores pró-inflamatórios. Oda (2021) descreveu que os prováveis mecanismos da atividade anti-inflamatória da *C. sylvestris* podem estar relacionados à redução da produção de prostaglandinas pela inibição da ciclooxigenase ou da fosfolipase A2 secretada. Este mesmo autor aponta que, embora as casearinas J e O e seus produtos de degradação ácida e metabolismo hepático não inibam a liberação de óxido nítrico, o mecanismo anti-inflamatório de outros diterpenos pode estar relacionado ao óxido nítrico, que é um importante sinal do processo inflamatório.

Esses resultados indicam que o extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris* apresenta potencial anti-inflamatório *in vivo*, através da inibição da migração de neutrófilos para o tecido periarticular lesionado e, em consequência disso, reduz o processo inflamatório.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o extrato etanólico das folhas da *Casearia sylvestris*, mostrou atividade anti-inflamatória relacionada à inibição da migração de neutrófilos.

Os tratamentos em todas as doses (15, 30, 60, 120 e 240 mg/kg) avaliadas, foram efetivos em comparação como o fármaco de referência indometacina e com o controle negativo (UMS), os quais proporcionaram redução da migração de neutrófilos para o local da inflamação.

Dessa forma, esses resultados apontam o potencial que a espécie *Casearia sylvestris* possui para ser aplicada na terapêutica da gota. Esses achados sugerem a realização de mais estudos para o desenvolvimento de um novo IFAV para a elaboração de fitoterápico para o tratamento da gota aguda e de processos inflamatórios. Além disso, o extrato etanólico da *C. sylvestris* pode ser fonte de novos fitofármacos com as mesmas ações do IFAV.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos**. 1ª edição. Argentina: Corpus Editorial y distribuidora, 2007. Disponível em: <<https://pdfcoffee.com/fitoterapia-16-pdf-free.html>> Acesso em: 23 nov. 2023.
- AMARAL, F.A. et al. 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. Doi: 10.1002/art.33355. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21952942/>> Acesso em: 23 nov. 2023.
- AMENI, A.Z. **Estudo do extrato fluido da *Casearia sylvestris*: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas**. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-13112015-105253/publico/ALINE_ZANCHETI_AMENI_Original.pdf> Acesso em: 15 nov. 2023.
- ARAÚJO, E, J, E. et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 355-361, 2014. Disponível em: <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/108/106> Acesso em: 21 dez. 2023
- ARGENTA, S. C. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, maio, 2011. Disponível em: <<https://www.ufpb.br/nepfh/contents/documentos/artigos/fitoterapia/plantas-medicinais-cultural-popular-versus-ciencia.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2023.
- AZEVEDO, V. F. et al. Revisão crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 346–355, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.06.009>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/mFvgxkXjD8DqzHkSXxJd8mR/?lang=pt>> Acesso em: 20 dez. 2023.
- BERNARDES, A. C. F. P. F. **Avaliação dos efeitos de lactonas sesquiterpênicas na hiperuricemia, excreção do ácido úrico, estresse oxidativo e artrite gotosa**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018. Disponível em: <<https://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/14437>> Acesso em: 15 nov. 2023.
- BORGES, L. P.; AMORIM, A. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p. 54-67, 2020. Disponível em: <<https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/9705>> Acesso em: 23 nov. 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Pacientes com gota ganham novo tratamento. 2016. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS&p_p_col_id=column-

1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_R6VaZWsQDDzS_groupId=219201&_101_INSTANCE_R6VaZWsQDDzS_urlTitle=pacientes-com-gota-ganham-novo-tratamento&_101_INSTANCE_R6VaZWsQDDzS_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_R6VaZWsQDDzS_assetEntryId=2987647&_101_INSTANCE_R6VaZWsQDDzS_type=content> Acesso em 09 jan. 2024.

BRUTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 13ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2018. E-book. ISBN 9788580556155. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580556155/>. Acesso em: 29 nov. 2023.

Bryant CD. et al., C57BL/6 substrain differences in inflammatory and neuropathic nociception and genetic mapping of a major quantitative trait locus underlying acute thermal nociception. **Mol Pain**, 2019. Doi: 10.1177/1744806918825046. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365993/> > Acesso em 15 fev. 2024.

CARVALHO, J. F. Gota. **Medicinanet**, 11 nov. 2010. Disponível em: < [https://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/3782/gota.htm#:~:text=Predomina%20no%20sexo%20masculino%20\(95,tend%C3%Aancia%20heredit%C3%A1ria%20para%20a%20doen%C3%A7a.>](https://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/3782/gota.htm#:~:text=Predomina%20no%20sexo%20masculino%20(95,tend%C3%Aancia%20heredit%C3%A1ria%20para%20a%20doen%C3%A7a.>) Acesso em: 05 jan. 2024.

CAVALCANTE, W.L.G. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**. v.112, n.3, p.490-497, 2007. Doi: 10.1016/j.jep.2007.04.002. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540522/> > Acesso em: 3 jan. 2024.

CRUVINEL, W. M. et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–461, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/rbr/a/QdW9KFBP3XsLvCYRJ8Q7SRb/abstract/?lang=pt> > Acesso em: 11 nov. 2023.

DA SILVA, R. A. **Casearia sylvestris Sw.: uma planta brasileira de interesse do SUS**. 2016. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso - Especialização em Gestão da Inovação em Fitomedicamentos) - Fundação Oswaldo Cruz/FARMANGUINHOS/NGBS/CTM. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: < <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18486> > Acesso em: 11 nov. 2023.

DA SILVA, S. L. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, Campinas, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100012>. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/aa/a/QL6SQGvtGxn6vj4H9sqYmXg> > Acesso em: 3 jan. 2024.

DOS SANTOS, F. D. Gota: Uma Revisão. **Revista Médica da UFPR**, v. 3, n. 1, p. 25-31, fev. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rmu.v3i1.46382>. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/revmedicaufpr/article/view/46382> > Acesso em: 10 out. 2023.

ESPINOSA, J. et al. Ethanollic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.2, p.305-315, 2015. Doi: https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_074. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/5YbgvkwPp8QwzxfvsPkwYVb/?lang=en>> Acesso em: 11 nov. 2023.

FERREIRA, L. T. R. **Tratamento farmacológico e não farmacológico da gota: uma revisão. 2017.** Trabalho de conclusão de Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2017. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/7130> > Acesso em: 20 dez. 2023.

FERREIRA, M. C. A. *Casearia sylvestris* Sw. **Fitoterapia Brasil**. 2023. Disponível em: <<https://fitoterapiabrasil.com.br/planta-medicinal/casearia-sylvestris> > Acesso em: 27 nov. 2023.

FRANCESE, M. M.; CHRISTIANINI, Á. M. A.; WECKWERTH, P. H. Efeito do tratamento com *Casearia Sylvestris* sobre a angiogênese induzida pelas células tumorais de Ehrlich. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.13, n. 2. p. 1-8, 2021. Doi: DOI:10.25248/reas.e5640.2021. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/349452251_Efeito_do_tratamento_com_Casearia_Sylvestris_sobre_a_angiogenese_induzida_pelas_celulas_tumorais_de_Ehrlich > Acesso em: 22 dez. 2023.

GAW. A. et al. **Bioquímica Clínica**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015. Disponível em: <<https://www.fea.br/wp-content/uploads/2021/06/Bioquimica-Clinica-5ed-Allan-Gaw.pdf> > Acesso em: 12 fev. 2024.

GILBERT, B; ALVES, L. F; FAVORETO, R. F. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas. **Abifisa - Editora FIOCRUZ**, v. 3, 291 p., 2022. ISBN: 978-65-5708-177-8. <https://doi.org/10.7476/9786557081778>. Disponível em: <<https://books.scielo.org/id/p7jsg/pdf/gilbert-9786557081778.pdf> > Acesso em: 5 nov. 2023.

GOLAN, D. et al. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. E-book. ISBN 978-85-277-2600-9. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2600-9/>. Acesso em: 29 nov. 2023.

GUSMAN, G. S. et al. Evaluation of the effects of some Brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p.1-11, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/497123>. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/497123/> > Acesso em: 13 nov. 2023.

JOHNSON, R.J. et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? **American Heart Association**, v. 41, n. 6, p. 1183-1190, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000069700.62727.C5>. Disponível em: < <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.HYP.0000069700.62727.C5> > Acesso em: 10 out. 2023.

KUO, C-F. et al. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 11, p. 649-62, 2015. Doi: 10.1038/nrrheum.2015.91. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26150127/> > Acesso em: 3 jan. 2024.

KYDD, A.S. et al. Uricosuric medications for chronic gout. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 11, 2013. Doi: 10.1002/14651858.CD010457.pub2. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25392987/> > Acesso em: 11 fev. 2024.

LOURES, M. A. A. R. Gota: Homens costumam ser mais afetados. **Sociedade Brasileira de Reumatologia**. 30 nov. 2023. Disponível em: < <https://www.reumatologia.org.br/orientacoes-ao-paciente/gota-homens-costumam-ser-os-mais-afetados/> > Acesso em 13 dez. 2023.

MATOSINHOS, R. C. **Efeitos de extratos aquosos de *Coffea arabica* e de seus constituintes químicos na artrite gotosa**. 2019. Dissertação (Mestrado - "Fármacos, medicamentos e vacinas") – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

MOHAMMAD, S.; GIATTINO, S. L.; KEENAN, R. T. Current and emergem therapies for gout. **Current Treatment Options in Rheumatology**, v. 1, n. 2, p. 143-155, 2015. Doi: 10.1007/s40674-015-0015-6. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s40674-015-0015-6> > Acesso em: 11 nov. 2023.

NETO, R. A. B. Tofo gotoso. **Medicinanet**, 03 fev. 2014. Disponível em: < https://www.medicinanet.com.br/conteudos/casos/5684/tofo_gotoso.htm#:~:text=Coment%C3%A1rios,podem%20levar%20%C3%A0%20destrui%C3%A7%C3%A3o%20articular. > Acesso em 27 nov. 2023.

ODA, F. B. **Disposição cinética e atividade anti-inflamatória in vitro de diterpenos clerodânicos da *Casearia sylvestris* Swartz e de seus produtos de degradação**. 2021. Tese (Pós-Graduação - Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/00b65422-993c-4fd9-bd21-8252b0ce93bd/content>> Acesso em: 10 out. 2023.

PIERRI, E. G. et al. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 4, p. 495-501, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.008>. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/8PD6yVPKkPXLgtFnH4nVSFS/abstract/?lang=en> > Acesso em: 15 nov. 2023.

PUIG, J. G.; MARTÍNEZ, M. A. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. **Current opinion in rheumatology**, v. 20, n. 2, p. 187-191, 2008. Doi: 10.1097/BOR.0b013e3282f4b1ed. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18349749/>> Acesso em: 11 fev. 2024.

RAMONDA, R.; et al. Molecular mechanisms of pain in crystal-induced arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 1, p. 98-110, 2015. Doi: 10.1016/j.berh.2015.04.025. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267004/>> Acesso em: 10 out. 2023.

RIBEIRO, S. M. et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of *Casearia sylvestris* extracts from distinct Brazilian biomes against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Araraquara, v. 19, n. 1, p.1-16, nov. 2019. doi: 10.1186/s12906-019-2717-z. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31718633/>> Acesso em: 15 nov. 2023.

SHEIKH, M. Hyperuricemia in systemic lupus erythematosus: is it associated with the neuropsychiatric manifestations of the disease? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 6, p. 471-477, maio. 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2015.07.011>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/yCJDyvw8SRkPkpqwW5k59hR/?lang=en>> Acesso em: 16 nov. 2023.

SILVA, A. A. O. et al. Análise fitoquímica e doseamento de metabólitos secundários das folhas de *Miconia albicans* (Sw) Triana coletadas de duas regiões do estado de Goiás. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 10, n. 1, 2021. Doi:10.37951/refacer.v10i1.5880. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/354265482_ANALISE_FITOQUIMICA_E_DOSEAMENTO_DE_METABOLITOS_SECUNDARIOS_DAS_FOLHAS_DE_Miconia_albicans_Sw_TRIANA_COLETADAS_DE_DUAS_REGIOES_DO_ESTADO_DE_GOIAS> Acesso em: 9 out.2023.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/315756327_Farmacognosia_do_produto_natural_ao_medicamento> Acesso em: 12 fev. 2024.

Sociedade Brasileira de Reumatologia. Gota. São Paulo, ago, 2022. Disponível em: <<https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/gota/#>> Acesso em: 13 dez., 2023.

SPÓSITO, L. et al. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives. **Journal of Ethnopharmacology**, Araraquara, v. 233, p. 1-12, 2018. Doi: 10.1016/j.jep.2018.12.032. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30594606/>> Acesso em: 9 out. 2023.

TORRES, R. C. et al. Mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012. ISSN: 1981-6855. Disponível em: <

https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/18370/vinicius3_carvalho_etal_IOC_2012.pdf?sequence=2> Acesso em: 20 fev. 2024.

WERLE, A. L. B. et al. Avaliação da atividade da *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 2, p. 400-402, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300011>. Disponível em: <
<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/wv3bHyqFdZGjLp5J6KcnrHk/abstract/?lang=pt> >
Acesso em: 28 nov.2023.

WHALEN, Karen; FINKELL, Richard; PANAVELIL, Thomas. A. **Farmacologia ilustrada**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2016. E-book. ISBN 9788582713235. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713235/>. Acesso em: 29 nov. 2023.

YAMASHITA, C.I. et al. **Estudo sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero Casearia coletadas em regiões distintas da Mata Atlântica, SP**. 2006. Dissertação (Mestrado 165 em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2006. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Celina%20Izumi%20Yamashita_M.pdf> Acesso em: 9 out. 2023.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIGOTA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS, OLEOS ESSENCIAIS E DE ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS, PLECTRANTHUS BARBATUS, PLECTRANTHUS AMBOICOS E CASEARIA SYLVESTRIS", protocolada sob o CEUA nº 8876050723 (ID 000987), sob a responsabilidade de **Dênia Antunes Saúde Guimarães** e equipe; *Ana Carolina Silva; Isabela Fernanda Souza; Maria Gabriele Freire Martins; Andressa Magalhães Barbosa; Aureliana de Fátima dos Reis Menezes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 27/02/2024.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ANTI-GOUT AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF EXTRACTS, ESSENTIAL OILS AND SOME CHEMICAL CONSTITUENTS OF PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS, PLECTRANTHUS BARBATUS, PLECTRANTHUS AMBOICOS AND CASEARIA SYLVESTRIS ", utilizing 526 Heterogenics rats (526 males), 1150 Isogenics mice (1150 males), protocol number CEUA 8876050723 (ID 000987), under the responsibility of **Dênia Antunes Saúde Guimarães** and team; *Ana Carolina Silva; Isabela Fernanda Souza; Maria Gabriele Freire Martins; Andressa Magalhães Barbosa; Aureliana de Fátima dos Reis Menezes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 02/27/2024.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2024** a **03/2026** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **12 a 16 semanas** Quantidade: **526**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **180 a 280 g**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **9 a 11 semanas** Quantidade: **1150**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **20 a 25 g**

Ouro Preto, 27 de fevereiro de 2024

Prof. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

