

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

THAIS MORAIS DE BRITO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE DIFERENTES FRAÇÕES
DE *Solidago chilensis* MEYEN E CARACTERIZAÇÃO DE FITOCONSTITUINTES**

RIO DE JANEIRO

2018

THAIS MORAIS DE BRITO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE DIFERENTES FRAÇÕES
DE *Solidago chilensis* MEYEN E CARACTERIZAÇÃO DE FITOCONSTITUINTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Co-orientador: Dr. Fabio Coelho Amendoeira

RIO DE JANEIRO

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Brito, Thais Morais de

Avaliação da atividade anti-inflamatória de diferentes frações de *Solidago chilensis* Meyen e caracterização de fitoconstituintes / Thais Morais de Brito. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

74 f.: il., tab.

Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2018.

Orientador: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Co-orientador: Dr. Fabio Coelho Amendoeira.

1. Asteraceae. 2. Inflamação. 3. Quercetina. 4. Medicamentos Fitoterápicos. 5. Biomarcadores. 6. Controle de Qualidade. I Título.

Evaluation of the anti-inflammatory activity of different fractions of *Solidago chilensis* Meyen and phytoconstituents characterization

THAIS MORAIS DE BRITO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE DIFERENTES FRAÇÕES
DE *Solidago chilensis* MEYEN E CARACTERIZAÇÃO DE FITOCONSTITUINTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 06 / 03 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Isabella Fernandes Delgado (Doutora)
Fundação Oswaldo Cruz - RJ

Arthur Luiz Corrêa (Doutor)
Universidade Federal Fluminense – RJ

Tatiana Almeida Pádua (Doutora)
Instituto de Tecnologia em Fármacos - RJ

Fausto Klabund Ferraris (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - RJ

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor) – Co-orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - RJ

Aos meus queridos pais, Elizabeth Brito e Thales dos Santos, que sempre estiveram presente na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus pais, Elizabeth de Brito e Thales dos Santos, por todo apoio e incentivo ao longo da vida. Sempre muito preocupados com os meus estudos, me incentivaram e respeitaram minhas decisões mesmo sabendo que o caminho a ser percorrido é o mais longo. Eu os amo.

Agradeço aos meus orientadores Fausto Ferraris e Fabio Amendoeira por terem aberto as portas do mundo acadêmico para mim, e desde a iniciação científica me acolheram com muito carinho.

Agradeço a família LabFar por tudo. Tudo de maravilhoso que foi vivido e compartilhado ao longo do desenvolvimento desse projeto. Todos os momentos de correria em dias de experimento, de estresse em época de prazos, de alegria extrema nos dias de confraternização, e principalmente de loucura no dia a dia. A vocês, Fabio, Fausto, Flávia Muylaert, Esdras Barbosa, Amanda Chaves, Laís Doro e Naína Monsores, o meu mais sincero obrigada.

Agradeço a Simone Valverde por toda paciência, suporte e orientação no desenvolvimento da parte química desse projeto. E ao Temistocles Barroso pelo apoio em bancada no Laboratório de Química Medicinal de Produtos Bioativos.

Agradeço a Tatiana Pádua, pela orientação e ajuda no desenvolvimento de algumas metodologias que foram realizadas no Laboratório de Farmacologia Aplicada em Farmanguinhos, com a colaboração da Dra. Maria das Graças Henriques.

Agradeço ao INCQS, a Farmanguinhos e a Faperj pelo apoio.

“A mente que se abre a uma ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Entre os anos de 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos através do SUS cresceu em aproximadamente 161%. Atualmente o SUS oferta 12 medicamentos fitoterápicos nas unidades de atenção primária e conta com a pesquisa e desenvolvimento das espécies presentes na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS ampliar a disponibilização desse acervo. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) é uma espécie nativa da América do Sul (Brasil) conhecida popularmente como arnica. Na medicina popular brasileira, inflorescências e rizomas desta planta são usadas desde o final do século XIX em substituição à espécie exógena e hepatotóxica da *Arnica montana* L. no tratamento de edemas e patologias inflamatórias. *S. chilensis* está presente no Memento Terapêutico Fitoterápico, desde a sua primeira edição, sendo produzidos e utilizados seus extratos, tinturas, cremes e pomadas para uso tópico. Entretanto, esta espécie é amplamente utilizada sem definição ou descrição dos marcadores químicos e/ou biológicos e seus teores. Embora a atividade anti-inflamatória da espécie vegetal em questão esteja evidenciada na literatura, há uma carência de estudos com frações enriquecidas ou substâncias isoladas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar fitoquimicamente e avaliar a ação farmacológica *in vivo* e *in vitro* do extrato bruto (EB) e das diferentes frações (hexânica, diclorometânica, acetálica, butanólica, aquosa) isoladas da inflorescência de *Solidago chilensis*. Camundongos Swiss Webster pré-tratados 1 hora antes com o EB e frações (10 mg/kg) foram desafiados com injeção intra-torácica contendo lipopolissacarídeo (LPS). Vinte quatro horas após desafio, o EB e todas as frações reduziram o infiltrado de leucócitos totais, bem como, a população de neutrófilos, sendo que as frações diclorometânica, hexânica e aquosa apresentaram melhor atividade. Por outro lado, as frações diclorometânica e hexânica apresentaram um potente efeito inibidor na migração de eosinófilos. O EB e todas as frações testadas inibiram a produção de TNF- α e CXCL2, sendo o EB e as frações diclorometânica e hexânica capazes de inibir a produção de Eotaxina-1; e somente a fração hexânica a única capaz de modular KC. Nos ensaios *in vitro*, a fração diclorometânica apresentou o melhor perfil de redução de óxido nítrico, seguido da fração hexânica. Dados preliminares apontam para uma atividade redutora da expressão de COX-2 no EB, sendo a fração diclorometânica com maior atividade repressora dessa expressão. No EB foi encontrado 23,1% de solidagenona,

e 39,1% de flavonoides derivados da quercetina e do kaempferol. Foi encontrado 35,8% de derivados da quercetina na fração diclorometânica. De acordo com o observado neste estudo, a quercetina e seus derivados seriam ótimos biomarcadores de atividade anti-inflamatória para os extratos provenientes das inflorescências de *Solidago chilensis*. Ela foi encontrada no extrato bruto e na fração diclorometânica em boas proporções, e já é bem descrita na literatura suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante.

Palavras-chave: *Solidago chilensis* Meyen. Inflamação. Fitocomponentes. Quercetina. Fitoterápicos. Biomarcadores. Controle de Qualidade. RENISUS.

ABSTRACT

Between 2013 and 2015, the search for herbal treatments and herbal medicines through SUS increased by approximately 161%. SUS currently offers 12 herbal medicines in the primary care units and counts on the research and development of the species present in RENISUS to expand the availability of this collection. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) is a species native to South America (Brazil) popularly known as arnica. In Brazilian popular medicine, inflorescences and rhizomes of this plant have been used since the end of the 19th century to replace the exogenous and hepatotoxic *Arnica montana* L. in the treatment of edema and inflammatory pathologies. *S. chilensis* has been present in the Therapeutic Phytotherapeutic Memento since its first edition, and its extracts, dyes, creams and ointments have been produced for topical use. However, this species is widely used without definition or description of chemical and / or biological markers and their contents. Although the anti-inflammatory activity of the plant species in question is evidenced in the literature, there is a lack of studies with enriched fractions or substances isolated from it. The present work had as objective to characterize phytochemically and to evaluate the pharmacological action *in vivo* and *in vitro* of the crude extract (EB) and the different fractions (hexane, dichloromethane, acetal, butanolic, aqueous) isolated from the inflorescence of *Solidago chilensis*. Swiss Webster mice pretreated 1 hour before with EB and fractions (10 mg / kg) were challenged with intra-thoracic injection containing lipopolysaccharide (LPS). Twenty four hours after challenge, EB and all fractions reduced the total leukocyte infiltrate, as well as the neutrophil population, and the dichloromethane, hexane and aqueous fractions presented better activity. On the other hand, dichloromethane and hexane fractions presented a potent inhibitory effect on the migration of eosinophils. The EB and all fractions tested inhibited the production of TNF- α and CXCL2, being EB and dichloromethane and hexane fractions capable of inhibiting the production of Eotaxin-1; and the hexane fraction is the only one capable of modulating KC. In the *in vitro* tests, the dichloromethane fraction obtained the best nitric oxide reduction profile, followed by the hexane fraction. Preliminary data point to a reductive activity of COX-2 expression in EB, being the dichloromethane fraction with the greatest repression activity of this expression. In EB, 23.1% of solidagenone and 39.1% of flavonoids derived from quercetin and kaempferol were found. 35.8% of quercetin derivatives were found in the dichloromethane fraction. According to the

observed in this study, quercetin and its derivatives would be excellent biomarkers of anti-inflammatory activity for the extracts from the inflorescences of *Solidago chilensis*. It was found in the crude extract and the dichloromethane fraction in good proportions, and it is well described in the literature its anti-inflammatory and antioxidant properties.

Key words: *Solidago chilensis* Meyen. Inflammation. Phytocomponents. Quercetin. Phytotherapics. Biomarkers. Quality Control. RENISUS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Relação de Fitoterápicos ofertados no SUS.....	20
Figura 1 - Número cumulativo de citações de <i>S. chilensis</i>	21
Figura 2 - Distribuição da <i>S. chilensis</i> na América Latina.....	23
Figura 3 - Fotografia da <i>Solidago chilensis</i> Meyen.....	24
Figura 4 - Extração líquido-líquido do extrato éter-etanólico de <i>Solidago chilensis</i> Meyen.....	33
Figura 5 - Efeito <i>in vivo</i> do extrato bruto de <i>S. chilensis</i> (0.01. 0.1. 1. 10 e 100 mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais e populações de células polimorfonucleares	43
Figura 6 - Efeito <i>in vivo</i> do extrato bruto e de diferentes frações de <i>S. chilensis</i> (10mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais e populações de células polimorfonucleares.....	45
Figura 7 - Efeito <i>in vivo</i> do extrato bruto e de diferentes frações de <i>S. chilensis</i> (10mg/kg) na geração dos mediadores TNF- α . KC. CXCL2 e Eotaxina-1.....	48
Figura 8 - Efeito citotóxico do extrato bruto e das frações de <i>Solidago chilensis</i> Meyen em linhagem de macrófagos murino J774A.1.....	50
Figura 9 - Produção de NO em células J774A.1 tratadas com extrato bruto de <i>S. chilensis</i> em diferentes concentrações (0.01; 0.1; 1 e 10 μ g/mL) e as frações (10 μ g/mL).....	52
Figura 10 - CLAE-UV-PDA do extrato bruto de <i>Solidago chilensis</i> para a caracterização de terpenos.....	53
Figura 11 - CLAE-UV-PDA da fração diclorometânica de <i>Solidago chilensis</i> para a caracterização de terpenos	56
Figura 12 - CLAE-UV-PDA da fração diclorometânica de <i>Solidago chilensis</i> para a caracterização de flavonoides.....	56
Figura 13 - Espectro UV da quercetina e do flavonoide não caracterizado.....	57
Figura 14 - CLAE-UV-PDA da fração aquosa de <i>Solidago chilensis</i> para a caracterização de flavonoides.....	59
Figura 15 - Efeito da <i>S. chilensis</i> na produção de COX-2 após estimulação com LPS.....	66

Quadro 2 - Compilado de resultados avaliando parâmetros de atividade anti-inflamatória em modelo de experimentação <i>in vivo</i> com camundongos pré-tratados com extrato bruto e frações de <i>S. chilensis</i>	69
Quadro 3 - Compilado de resultados avaliando parâmetros de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade em modelo de experimentação <i>in vitro</i> com células de linhagem J774A.1 pré-tratadas com extrato bruto e frações de <i>S. chilensis</i>	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fitoconstituintes caracterizados por CG-EM na fração hexânica de <i>Solidago chilensis</i>	54
Tabela 2 - Flavonoides e ácido clorogênico caracterizados por CLAE-UV-PDA na fração diclorometânica de <i>S. chilensis</i>	57
Tabela 3 - Fitoconstituintes caracterizados por CLAE-UV-PDA na fração aquosa de <i>S. chilensis</i>	59

LISTA DE ABREVIÇÕES

PSA	persulfato de amônio
cav	cavidade
EB	extrato bruto
EDTA	ácido tetracético etilenodiamino
E.P.M.	erro padrão da média
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrofotometria por Ultravioleta
cm	centímetro
COX-2	ciclooxigenase-2
DAD	Detector por Arranjo de Fotodiodos
DL ₅₀	Dose Letal média
DPPH	2.2-difenil-1-picrilhidrazil
IL-1	interleucina
IL-1 β	interleucina 1 β
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratorácica
KC	químico neutrofílica
kg	quilograma
L	litro
LPS	lipopolissacarídeo
m	metros
mg	miligrama
min	minutos
MIP-2	proteína inflamatória de macrófagos 2
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MTT	brometo de tiazolil azul de tetrazolio
μ l	microlitro

μm	micrômetro
μM	micromolar
n	população amostral
NO	óxido nítrico
nm	nanômetro
OPD	dicloridrato de o-fenilenodiamina
PBS	solução fosfato salino
pc	peso corpóreo
PVDF	fluoreto de polivinilideno
rpm	rotação por minuto
TEMED	tetrametiletilenodiamina
Temp	temperatura
TNF- α	fator de necrose tumoral α
UV	ultravioleta
V_{inj}	volume de injeção
x	vezes

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
Farmanguinhos	Instituto de Tecnologia em Fármacos
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LaQMed	Laboratório de Química Medicinal de Produtos Bioativos
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos
PNMNPC	Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Uso de plantas medicinais e fitoterápicos	18
1.2 <i>Solidago</i> medicinais	19
1.3 <i>Solidago chilensis</i> Meyen	22
1.3.1 Atividades farmacológicas	24
1.3.2 Toxicidade.....	27
1.3.3 Fitoconstituintes descritos na literatura.....	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVO GERAL	31
3.1 Objetivos específicos	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Coleta e preparo do material vegetal	32
4.2 Preparo do extrato bruto e das frações	32
4.3 Caracterização fitoquímica das frações	34
4.4 Análise da viabilidade celular	35
4.5 Avaliação da capacidade inibitória da produção de óxido nítrico em J774A.1	35
4.6 Animais	36
4.7 Pleurisia induzida por LPS	36
4.8 Análise de proteína total	37
4.9 Enzyme-Linked immunosorbent assay	37
4.10 Immunoblot	38
4.11 Preparo de soluções	39
4.12 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Efeito <i>in vivo</i> do extrato bruto de <i>S. chilensis</i> na pleurisia induzida por LPS	42
5.2 Efeito <i>in vivo</i> das frações de <i>S. chilensis</i> na pleurisia induzida por LPS	44
5.3 Efeito <i>in vivo</i> do extrato bruto e das frações de <i>S. chilensis</i> na produção de proteínas totais e mediadores inflamatórios quimiotáticos	46

5.4 Efeito citotóxico do extrato bruto e das frações de <i>S. chilensis</i> em linhagem J774A.1	49
5.5 Avaliação da capacidade inibitória do extrato bruto e das frações de <i>S. chilensis</i> na produção de óxido nítrico <i>in vitro</i> (J774A.1)	51
5.6 Fitoconstituintes da <i>solidago chilensis meyen</i>	53
5.6.1 Extrato Bruto.....	53
5.6.2 Fração Hexânica.....	54
5.6.3 Fração Diclorometânica.....	55
5.6.4 Fração Aquosa.....	58
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de plantas medicinais e fitoterápicos

O uso de plantas para restauração da saúde vem sendo aplicado ao longo dos séculos por diferentes povos em todo o mundo. A globalização permitiu a fusão do conhecimento de diversas culturas com as descobertas científicas das últimas décadas acerca das plantas medicinais (AGUIAR, 2014). Entende-se por planta medicinal, a espécie vegetal utilizada com propósitos terapêuticos, sendo ela cultivada ou não (BRASIL, 2014a).

Cerca de 25% das prescrições médicas em países industrializados são de plantas medicinais, enquanto 80% é o valor alcançado no arsenal terapêutico dos países em desenvolvimento. No Brasil, pesquisas demonstraram que aproximadamente 92% da população já fez uso de alguma planta medicinal, e que um pouco menos da metade da população as mantinham em cultivos domésticos (AGUIAR, 2014).

O Brasil possui em torno de 15 a 20% da biodiversidade do planeta, e esse número o classifica como o maior detentor da mesma. Além desse vasto acervo genético, o Brasil também ganha destaque na diversidade étnica e cultural, com um valioso conhecimento tradicional, passado de geração para geração, e associado ao uso de plantas medicinais (BRASIL, 2016a). Tendo em vista a capacidade do país em desenvolver pesquisas com resultados em tecnologias e terapias adequadas, o Ministério da Saúde Brasileiro, no final da década de 80, principalmente após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), legitimou e institucionalizou as abordagens de atenção à saúde preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a inserção da Medicina Tradicional através da Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares (PNMNPC) no SUS (BRASIL, 2005).

Em 2006, foi instituído no país o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que visa: “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2016a). A promoção do acesso aos medicamentos fitoterápicos teve início em 2007, sendo que a partir do PNPMF, foi criada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). A RENISUS consiste

de uma lista com 71 espécies vegetais já utilizadas nos serviços de saúde municipais e estaduais, que por possuírem comprovação de eficácia através de estudos etnofarmacológicos, podem avançar nas etapas da cadeia produtiva e gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2014b; OSHIRO et al, 2016).

Os fitoterápicos são medicamentos de baixo custo que parte da população está habituada, pois aprendeu a usá-los com seus antecessores familiares. Logo, é importante que o acesso a eles seja ampliado (BRASIL, 2016b). A instituição de políticas e programas públicos foi importante para tornar acessível a toda população brasileira as práticas relacionadas à fitoterapia, assim como a padronização das mesmas (OSHIRO et al, 2016). Entre os anos de 2013 e 2015, a busca por tratamentos a base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos através do SUS cresceu em aproximadamente 161% (BRASIL, 2016b). Segundo o MS, cerca de 3.250 estabelecimentos de 930 municípios brasileiros oferecem os produtos que, todos os anos, beneficiam em torno de 12 mil pessoas que utilizam plantas medicinais frescas, drogas vegetais, ou medicamentos fitoterápicos industrializados ou manipulados (BRASIL, 2016b). Atualmente o SUS oferta 12 medicamentos fitoterápicos (Quadro 1), sendo os mais utilizados na rede pública, o guaco, a espinheira-santa, e a isoflavona-de-soja (BRASIL, 2016b). Além destes, o MS conta com a pesquisa e desenvolvimento das espécies presentes na RENISUS para ampliar o acervo de fitoterápicos disponibilizados pelo SUS. Dentre as espécies de interesse, consta a *Solidago chilensis* Meyen.

1.2 *Solidago* medicinais

A *Solidago* pertence à família Asteraceae, uma das maiores famílias botânicas com espécies representantes em praticamente todo o planeta. O gênero *Solidago*, que compreende em torno de 120 espécies arbustivas e é o maior gênero de sua família, possui um vasto emprego medicinal em vários países, principalmente na América do Norte e com algumas poucas espécies na América do Sul (LOBLER, 2013; OLIVEIRA et al, 2017a). Mundialmente conhecidas como “goldenrod”, têm como representantes a *Solidago virgaurea*, *Solidago canadensis*, e a *Solidago gigantea*, encontradas no norte das Américas, enquanto no sul predomina a *S. chilensis*. Utilizada oficialmente nos EUA, a *S. virgaurea* também consta na farmacopeia europeia, enquanto no Canadá e na América do Sul as espécies medicinais mais

utilizadas são a *S. canadensis* e a *S. chilensis*, respectivamente (OLIVEIRA et al, 2017a).

Quadro 1 - Relação de fitoterápicos ofertados no SUS.

Nome popular	Nome científico	Indicação
Espinheira-santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Auxilia no tratamento de gastrite e úlcera duodenal e sintomas de dispepsias
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	Apresenta ação expectorante e broncodilatadora
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	Tratamento dos sintomas de dispepsia funcional (síndrome do desconforto pós-prandial) e de hipercolesterolemia leve a moderada. Apresenta ação colagoga e colerética
Aroeira	<i>Schinus terebenthifolius</i>	Apresenta ação cicatrizante, antiinflamatória e anti-séptica tópica, para uso ginecológico
Cáscara-sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Auxilia nos casos de obstipação intestinal eventual
Garra-do-diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Tratamento da dor lombar baixa aguda e como coadjuvante nos casos de osteoartrite. Apresenta ação anti-inflamatória
Isoflavona-de-soja	<i>Glycine max</i>	Auxilia no alívio dos sintomas do climatério
Unha-de-gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Auxilia nos casos de artrites e osteoartrite. Apresenta ação antiinflamatória e imunomoduladora
Hortelã	<i>Mentha x piperita</i>	Tratamento da síndrome do cólon irritável. Apresenta ação antiflatulenta e Antiespasmódica
Babosa	<i>Aloe vera</i>	Tratamento tópico de queimaduras de 1º e 2º graus e como coadjuvante nos casos de Psoríase vulgaris
Salgueiro	<i>Salix alba</i>	Tratamento de dor lombar baixa aguda. Apresenta ação antiinflamatória
Plantago	<i>Plantago ovata Forssk</i>	Auxilia nos casos de obstipação intestinal habitual. Tratamento da síndrome do cólon irritável

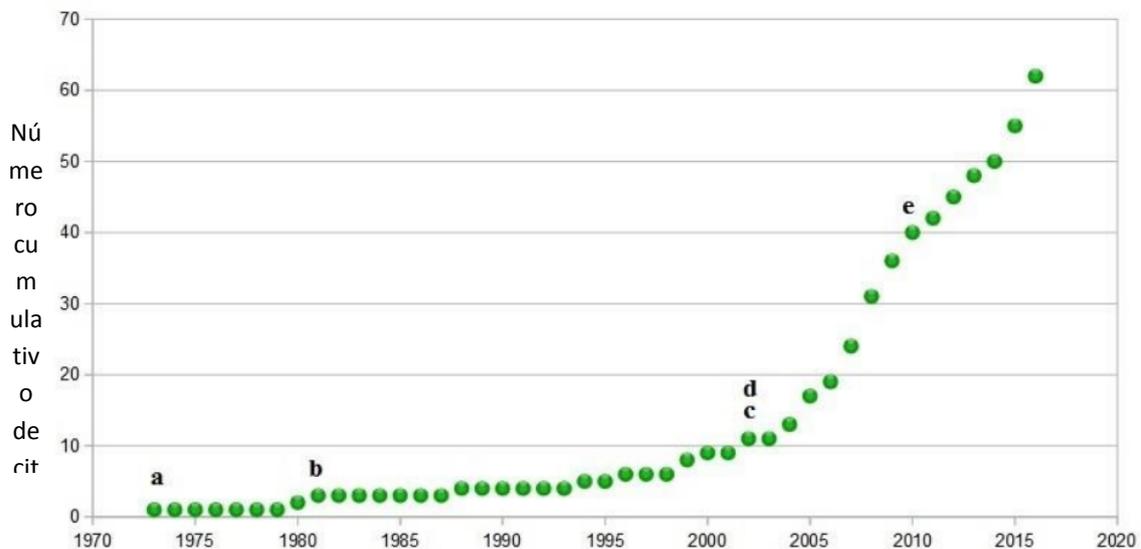
Fonte: Brasil, 2012.

A medicina popular indica as espécies de *Solidago* para o tratamento de uma série de patologias, dentre elas: faringite, inflamação renal, intestinal, e do trato urinário, anti-fadiga, antisséptico, tuberculose, gota, asma, desordens reumáticas, como diurético e é ainda atribuída às funções, anti-inflamatória, cicatrizante e analgésica (OLIVEIRA et al, 2017a).

Pelo descrito na literatura, através de comprovações científicas em modelos de experimentação animal e ensaios *in vitro*, o extrato etanólico de *S. gigantea* demonstrou atividade anti-inflamatória (OLIVEIRA et al, 2017a). Thiem e Goslinska (2002) evidenciaram em tecido caloso a atividade antimicrobiana moderada do extrato etanólico e metanólico de *S. virgaurea*, bem como sua ação antiacantamebíase do extrato metanólico em cepa *Acanthamoeba castellanii*, patogênica para ratos (DERDA; HADAS; THIEM, 2009). A *S. virgaurea* possui ainda, atividade diurética através da sua fração flavonoídica (ALONSO, 2004). E na *S. canadensis* foi observado através de ensaio com MTT modificado, que o óleo essencial apresenta efeito anti-tumoral em diferentes linhagens de câncer humano (DEQIANG et al, 2011).

Quanto a *S. chilensis*, foi observada a atividade anti-inflamatória em modelos murinos de experimentação (GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008), atividade antioxidante e hepatoprotetora de extrato etanólico (SABIR et al, 2012), dentre muitas outras atividades evidenciadas (OLIVEIRA et al, 2017a). A *S. chilensis* é uma espécie muito promissora dado que sua distribuição abrange diferentes ecossistemas ao longo da América do Sul, possui muitas indicações terapêuticas na medicina tradicional e evidenciadas em publicações com base experimental. Publicações estas, que vem crescendo ao longo dos anos (Figura 1), e principalmente ao longo da última década, aprofundando as descobertas sobre suas propriedades farmacológicas e composição fitoquímica (GASTALDI et al, 2018).

Figura 1 - Número cumulativo de citações de *S. chilensis*.



Legenda: O primeiro relato sobre o assunto é marcado com a letra a – Distribuição nos ecossistemas Sul Americanos em 1973. b - Identificação fitoquímica e flavonoides em 1981. c - Ensaio bioquímico antimicrobiano em 2002. d - Estudo farmacológico com modelo animal em 2002. e - Ensaio clínico em 2010. Fonte: GASTALDI et al. 2018.

1.3 *Solidago chilensis* Meyen

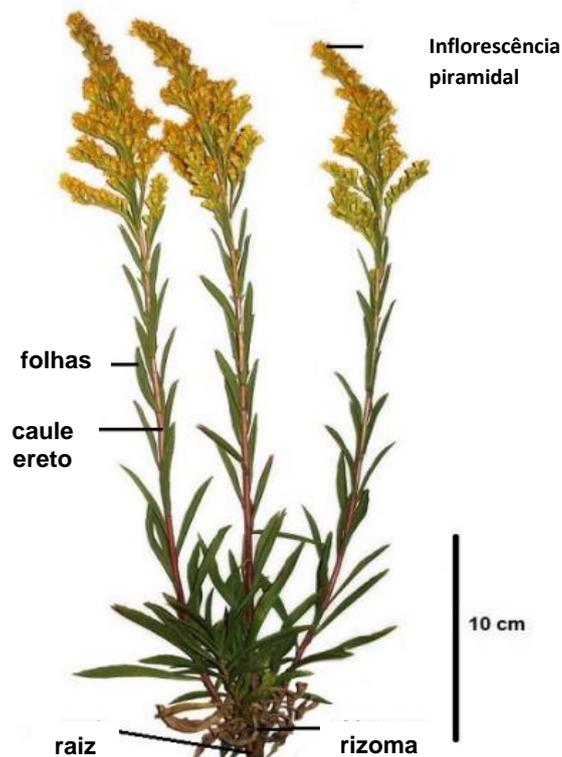
A *Solidago chilensis* Meyen, vem sendo utilizada no Brasil como sucessora da espécie exógena, hepatotóxica e em extinção, *Arnica montana*, por acreditar-se ter efeito farmacológico semelhante, sendo por isso conhecida como Arnica Brasileira ou Arnica Silvestre (VALVERDE; AZEVEDO; TOMASSINI, 2009; OLIVEIRA et al, 2017a). É popularmente conhecida também como erva-lanceta, macela-miúda, erva-federal, espiga-ouro, rabo-de-foguete, rabo-de-rojão, sapé-macho, lanceta e flecha (LORENZI; MATOS, 2002; GASTALDI et al, 2018). Tem como sinonímia botânica; *Solidago microglossa* L., *Solidago linearifolia* DC., *Solidago polyglossa* DC., *Solidago marginella* DC., *Solidago odora* Hook., *Solidago vulneraria* Mart., e *Solidago nitidula* Mart (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012; GASTALDI et al, 2018). Essa espécie pertence à família Asteraceae, e é natural do Chile, com distribuição na América do Sul, incluindo o Paraguai e Uruguai, partes da Argentina e Bolívia, e o Nordeste, Centro Oeste, Sul e o Sudeste do Brasil (Figura 2). No Brasil, a *Solidago chilensis* Meyen tem como domínios fitogeográficos a Caatinga, o Cerrado, a Mata Atlântica e o Pampa brasileiro, podendo se desenvolver até 2500 metros acima do nível do mar (TELES; BORGES, 2010; GASTALDI et al, 2018).

Figura 2 - Distribuição da *S. chilensis* na América Latina.



. Fonte: GASTALDI et al. 2018.

A *S. chilensis* é um subarbusto perene, ereto, rizomatoso, de caule simples e que não se ramifica, podendo chegar a 120 cm de altura, e possui inflorescências amarelas em panícula ornamentais de aproximadamente 20 cm (Figura 3). A espécie se multiplica através das sementes, e principalmente pelos rizomas (LORENZI; MATOS, 2002; VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012). Dentre as muitas indicações terapêuticas na medicina popular, destaca-se o uso em patologias de cunho inflamatório como reumatismo, gota e edemas, mas também é descrita como eficaz no auxílio da cura de feridas e queimaduras, na prevenção ou eliminação de cálculos renais, e no controle de distúrbios gástricos. São a ela ainda atribuída as propriedades antisséptica, analgésica, e estimulante do trato gastrointestinal (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA 2012; LIZ et al, 2008; ALONSO, 2004; DIGEST, 2001, GASTALDI et al, 2018).

FIGURA 3 - Fotografia da *Solidago chilensis* Meyen.

Fonte: GASTALDI et al. 2018.

1.3.1 Atividades farmacológicas

Das comprovações científicas, Goulart e colaboradores (2007), utilizando modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos, demonstraram o potencial anti-inflamatório através da redução do infiltrado leucocitário, inclusive de neutrófilos, e do exsudato em grupos tratados por via intraperitoneal (i.p.) com extrato aquoso, fração butanólica, e resíduo aquoso de rizomas de *S. chilensis* na dose de 25 mg/kg, (GOULART et al, 2007). Esses dados foram corroborados em modelo experimental in vivo de air pouch desafiado com carragenina, e tratados com os mesmos extrato e frações provenientes de rizoma, onde a redução nos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral - α (TNF- α), KC e óxido nítrico (NO), importantes mediadores do processo inflamatório, foi observada (GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008). O pré-tratamento com o extrato hidroalcolico da mistura de folhas e inflorescência de *S. chilensis*, também no modelo de air pouch, reproduziu os resultados observados por Liz (2008), segundo Tamura e colaboradores (2009).

Os mediadores inflamatórios avaliados nos trabalhos mencionados são de extrema importância para nortear os mecanismos da ação anti-inflamatória dos extratos. A citocina TNF- α , por exemplo, produzido por macrófagos e linfócitos, ativa fagócitos, dentre eles os neutrófilos (BORISH; STEINKE, 2003). É responsável também pelo aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, permitindo assim a entrada de granulócitos no local da inflamação, e o aumento da produção de IL-1, citocina responsável pela ativação de outras células do sistema imune, produção de outros mediadores inflamatórios, e liberação de histamina, culminando em vasodilatação e maior permeabilidade vascular (FEGHALI; WRIGHT, 1997; BORISH; STEINKE, 2003). TNF- α e IL-1 induzem a produção da enzima responsável pela síntese do mediador NO, que possui propriedades de vasodilatação, citotoxicidade mediada por macrófagos, e inibição da ativação e agregação plaquetária (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Já a quimiocina KC, liberada por mastócitos, tem como principal função a quimiotaxia de neutrófilos para os sítios de inflamação (PALOMINO; MARTI, 2015). A modulação desses mediadores proporciona uma ideia dos mecanismos da ação anti-inflamatória dos extratos de *S. chilensis*.

Alguns outros trabalhos investigaram mais do que apenas o potencial anti-inflamatório da espécie. Em trabalho de Assini e colaboradores (2013), foi pré administrado, por via oral o infuso dos rizomas de *S. chilensis* (25, 100 e 250 mg/kg), em camundongos Swiss Webster que após 30 min receberam uma injeção intraplantar de formalina 2%. Foi avaliado o tempo de lambida da pata estimulada, após 5 e 15 min, onde é atribuído o efeito imediato da formalina nas fibras nociceptivas, e potencial anti-inflamatório nos 15 min seguintes. Foi observada uma redução significativa do tempo gasto pelo animal em todas as doses testadas, demonstrando o potencial antinociceptivo na fase dos primeiros 5 min (ASSINI; FABRÍCIO; LANG, 2013).

Em trabalho de Silva e colaboradores (2010), uma pesquisa realizada com protocolo duplo-cego em pacientes (n=10) acometidos de lumbago tratados por via tópica por 15 dias com extrato glicólico de partes aéreas de *S. chilensis* ou com placebo (propilenoglicol), apresentaram resultados significativamente diferentes. Os pacientes que fizeram uso do extrato tiveram a percepção de dor reduzida em escala visual analógica, e a flexibilidade de extensão frontal da região lombar aumentada de 0,5 a 1,0 cm (SILVA et al, 2010). O extrato glicólico de partes aéreas de *S. chilensis*

também se demonstrou eficaz na recuperação da inflamação nos tendões flexores ou extensores do punho e mão, de pacientes (n=8) que fizeram o tratamento tópico duas vezes ao dia, por 21 dias (SILVA et al, 2015).

Fêmeas CF-1 tratadas com diferentes doses do extrato aquoso de inflorescências de *S. chilensis*, em modelo de úlcera gástrica induzida por ingestão de álcool absoluto, apresentaram 61,4%, 75,1% e 78,4% de efeito gastroprotetor nas doses de 125, 250, e 400 mg/kg, respectivamente (BUCCIARELLI et al, 2010). Em estudo mais recente, foi evidenciado o potencial do extrato metanólico de folhas de *S. chilensis*, e dos componentes isolados quercitrina e afzelina na inibição de úlcera gástrica induzida por etanol/HCl e indometacina em modelo de experimentação in vivo com fêmeas de camundongos Swiss Webster. A administração oral do extrato metanólico (100 mg/kg), da ranitidina (200 mg/kg), como controle positivo, e também da quercitrina (1,38 mg/kg) e da afzelina (0,026 mg/kg), aceleraram o processo de cura gástrica, reduzindo o sítio da úlcera em torno de 50% em relação ao grupo não tratado, e modulando os níveis da enzima mieloperoxidase no tecido gástrico. O extrato reduziu em 30% os níveis de TNF- α , enquanto o fármaco controle na concentração 100 mg/kg não foi capaz de reduzir significativamente os níveis desse mediador. Os autores do trabalho destacam a importância do achado pelo fato de que a atenuação de citocinas, como o TNF- α , são responsáveis pela recorrência da úlcera no tecido gástrico (BARROS et al, 2016).

Em trabalho de Sabir e colaboradores (2012), a administração oral do extrato etanólico de folhas de *S. microglosa* (sinonímia botânica da *S. chilensis*) na dose de 100 e 200 mg/kg, apresentaram hepatoproteção acentuada em modelo experimental in vivo (ratos Wistar) de hepatotoxicidade induzida por paracetamol. A elevação, característica de danos hepáticos, de enzimas no soro dos animais não foi detectada em animais tratados com o extrato. O tratamento com extrato hidroalcólico de *S. chilensis* (3 mg/kg i.p.), em modelo experimental de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica em camundongos Swiss Webster, foi capaz de reduzir a gordura corporal e epididimal quando comparado ao grupo não tratado. Não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis de triglicerídeos e insulina no soro, mas o valor de glicemia no grupo tratado com extrato foi significativamente inferior. Os autores também atribuíram à atividade anti-inflamatória do extrato, a capacidade de melhorar a resistência à insulina, através da redução da fosforilação das proteínas JNK e I κ B, que levariam a redução do transporte de glicose intracelular, e a ativação do fator de

transcrição NF- κ B, que induziria a produção de mediadores inflamatórios responsáveis pela resistência à insulina em vários tecidos via supressão do receptor de insulina (MELO et al, 2011)

O efeito hipolipemiante do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *S. chilensis* (150, 300, e 600mg/kg) e do flavonoide isolado, quercetina (10 mg/kg), em modelo animal de hipercolesterolemia induzida por dieta, utilizando ratos Wistar, foi demonstrado por Junior e colaboradores (2015). Os grupos de animais extrato, quercetina, e a droga de referência, sinvastatina (4 mg/kg), apresentaram redução significativa dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, e lipoproteína de baixa densidade no soro. Foram capazes de reduzir o aumento do peso do fígado, e aumentar a excreção de colesterol através das fezes (JUNIOR et al, 2015).

À espécie *Solidago microglossa*, foi ainda atribuída a atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, avaliada pelo método de disco-difusão com extrato etanólico das partes aéreas (BRASILEIRO et al, 2006). E no extrato aquoso, fração butanólica e resíduo aquoso do rizoma de *S. chilensis* foi observada uma inibição de crescimento significativa para os microorganismos; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Esse mesmo trabalho ainda demonstrou o potencial antiagregante plaquetário através de método turbidimétrico usando um agregômetro Chronolog (LIZ et al, 2009).

1.3.2 Toxicidade

Poucos estudos descrevem sobre o potencial tóxico do gênero *Solidago*. O grupo de Worthley (1967) a fim de demonstrar efeito tóxico letal em camundongos Swiss Webster machos, administrou por via i.p. o extrato aquoso ou etanólico de todas as partes de oito espécies do gênero *Solidago*. Apenas três das espécies levaram 100% da população a óbito na dose de 600 mg/kg/pc, enquanto nas doses de 0,6; 6 e 60 mg/kg/pc não houve morte.

A administração oral do extrato aquoso de *S. chilensis* incorporado na dieta de fêmeas CF-1, em dose única (2.000 mg/kg/pc) por 24h, não demonstrou alteração de parâmetros comportamentais, funcionais, e de atividade motora (BUCCIARELLI et al, 2010). Mas, em trabalho de Paula-Freire e colaboradores (2014), o extrato etanólico de partes aéreas administrado por via i.p. em camundongos Swiss Webster fêmeas e machos, em dose única, apresentou significativa toxicidade. Discreta cianose pode

ser observada na dose de 100 mg/kg/pc, e redução da força de preensão e aumento da taxa respiratória foi observada em 30 min após administração das concentrações acima de 100 mg/kg/pc. Piloereção ocorreu em até 4 horas após a administração do extrato em dose de 300, 500, 750, e 1.000 mg/kg/pc. Todos os animais tratados com 1.000 mg/kg do extrato foram a óbito em até 2 horas após a administração, e nenhum animal tratado com 30 mg/kg do extrato apresentou significativas alterações comportamentais. O fígado dos animais apresentou manchas e coloração escura de forma dose-dependente, e foi estimada a DL_{50} do extrato etanólico em 512.5 mg/kg (PAULA-FREIRE et al, 2014).

Bagatine (2009) obteve resultados em que os infusos de folhas de *S. microglossa* apresentaram efeito citotóxico, porém não mutagênico, com base em um sistema de teste vegetal in vivo com *Allium cepa*. Os efeitos citotóxicos e antiproliferativos foram observados através da diminuição do índice mitótico em todas as populações testadas, quando a maior dose de infuso foi utilizada (14 mg/mL) (BAGATINE et al, 2009). Os resultados foram corroborados pelo trabalho de Lober e colaboradores (2013), utilizando o infuso de *S. chilensis* (5 e 20 g/L) no mesmo modelo experimental. Foram vistas ainda alterações cromossômicas, que não haviam sido identificados por Bagatine. (BAGATINE et al, 2009; LOBER, 2013).

1.3.3 Fitoconstituintes descritos na literatura

Quanto à sua composição química, é descrito a presença de flavonoides como a rutina, quercetina, nicotiflorina, hiperosídeo, isoquercitrina, afzelina, e quercitrina, sendo este último o majoritário, bem como, diterpenos clerodânicos e labdânicos como a solidagenona, dexosolidagenona, solidagolactona e inulina (TORRES; ROQUE; AKISUE, 1989; LORENZI, MATOS, 2002; VILA et al, 2002; VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012; OLIVEIRA et al, 2017b). Liz (2008) descreve ainda a presença de ácido clorogênico e ácido cafeico em fração butanólica de rizomas de *S. chilensis*. Foi identificada no óleo essencial de folhas e inflorescências, a presença de mono e sesquiterpenos oxigenados ou não, e dois diterpenos, o fitol e o pumilóxido, sendo o segundo o majoritário (VILA et al, 2002). Designada pela sinonímia *S. odora*, há estudos descrevendo a presença de ésteres acetilênicos e derivados fenilpropanóides isolados das raízes (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012).

Sabendo que os flavonoides têm atividades anti-inflamatória e antioxidante descritas na literatura (ENDALE et al, 2013; KANIMOZHI; BHAVANI; SUBRAMANIAN, 2016), e os diterpenos labdânicos sendo associados a atividades anti-inflamatória, anti-ulcerogênica, e inibidora de enzimas importantes do metabolismo humano (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012), podemos supor que essas substâncias já identificadas na espécie em estudo, estejam associadas aos efeitos biológicos e farmacológicos observados. No entanto, é desconhecido na literatura as proporções de apresentação de cada uma dessas substâncias e o seu real comprometimento nos efeitos terapêuticos. Por exemplo, a espécie pode possuir quercetina, mas em concentrações muito reduzidas a ponto de não ter atividade anti-inflamatória.

2 JUSTIFICATIVA

Embora a atividade anti-inflamatória da espécie vegetal em questão esteja evidenciada na literatura, há uma carência de estudos com frações isoladas ou substâncias isoladas da mesma. Os trabalhos presentes na literatura, não apontam os metabólitos secundários isolados como possíveis rotas para sua atividade farmacológica. Extratos aquosos, butanólicos, resíduos, e outros, são as soluções usadas nos tratamentos (GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008), com amplo perfil fitoquímico onde não se tem o conhecimento exato das moléculas que exercem as funções apresentadas. As propriedades medicinais das plantas são caracterizadas principalmente pela presença de flavonóides, mas também podem ocorrer por influência de outros compostos como os terpenóides, por exemplo (REPETTO, 2002). Estudos fitoquímicos feitos com o gênero *Solidago*, demonstraram a presença de inúmeros grupos de metabólitos secundários (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012), dentre eles grande variedade de diterpenos (WILLIAMS et al, 2014).

A Fiocruz, através da Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF) no Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) participa diretamente do manejo sustentável da produção e cultivo das plantas medicinais e de sua inserção, bem como de fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, no Serviço Único de Saúde (SUS). Dentre as plantas cultivadas pelo PAF encontra-se a *Solidago chilensis* Meyen.

A *Solidago chilensis* vem sendo utilizada em substituição à *Arnica montana* L. pela população e por empresas privadas e públicas, sendo que a Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, através das Farmácias Vivas, faz a distribuição da *S. chilensis* para uso terapêutico complementar.

O Ministério da Saúde apresenta a necessidade de subsidiar estudos comprobatórios do controle da eficácia dessas espécies e de medicamentos produzidos a partir delas, para atender a população em relação ao uso seguro e à eficácia dos insumos farmacêuticos de origem vegetal. Assim sendo, este estudo pretende caracterizar os principais componentes fitoquímicos e comprovar a atividade anti-inflamatória destes, a fim de estabelecer os marcadores químicos desta espécie vegetal que poderão futuramente ser usados no controle de qualidade de fitoterápicos a partir da *Solidago chilensis*.

3 OBJETIVO GERAL

Verificar se os tratamentos com diferentes frações isoladas da inflorescência de *Solidago chilensis*, possuem efeitos anti-inflamatórios diferenciados, utilizando o ensaio de pleurisia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos e ensaios *in vitro*, além de caracterizar fitoquimicamente as frações com melhor atividade.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar em modelo experimental *in vivo* de pleurisia induzida por LPS, a ação anti-inflamatória das diferentes frações de *S. chilensis*, através do recrutamento leucocitário e produção de mediadores inflamatórios presentes no lavado pleural;
- Avaliar a ação citotóxica das diferentes frações isoladas de *S. chilensis*, em linhagem de macrófagos murinos, através de ensaio de viabilidade celular com resazurina;
- Avaliar *in vitro*, a ação anti-inflamatória das diferentes frações isoladas de *S. chilensis*, em linhagem de macrófagos murinos, observando a produção de mediadores inflamatórios presente no sobrenadante;
- Analisar, dentre as frações da *S. chilensis* com melhor perfil anti-inflamatório, se há seletividade para a enzima COX-2, através de immuno blot;
- Identificar, nas frações da *S. chilensis* com melhor atividade anti-inflamatória, o perfil fitoquímico.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo do material vegetal

A pesquisa foi realizada a partir da extração de inflorescências, de *Solidago chilensis* Meyen, obtidas no Palácio Itaboraí, Fiocruz, Petrópolis, Rio de Janeiro. A identificação da espécie foi realizada pelo Dr. Marcelo Neto Galvão, da PAF/Farmanguinhos, e uma exsicata foi depositada no Herbário Farmácias Verdes sob o código 646/FFAR. As inflorescências do material vegetal fornecido foram submetidas à secagem em estufa 35-40° C e pulverização em moinho de facas.

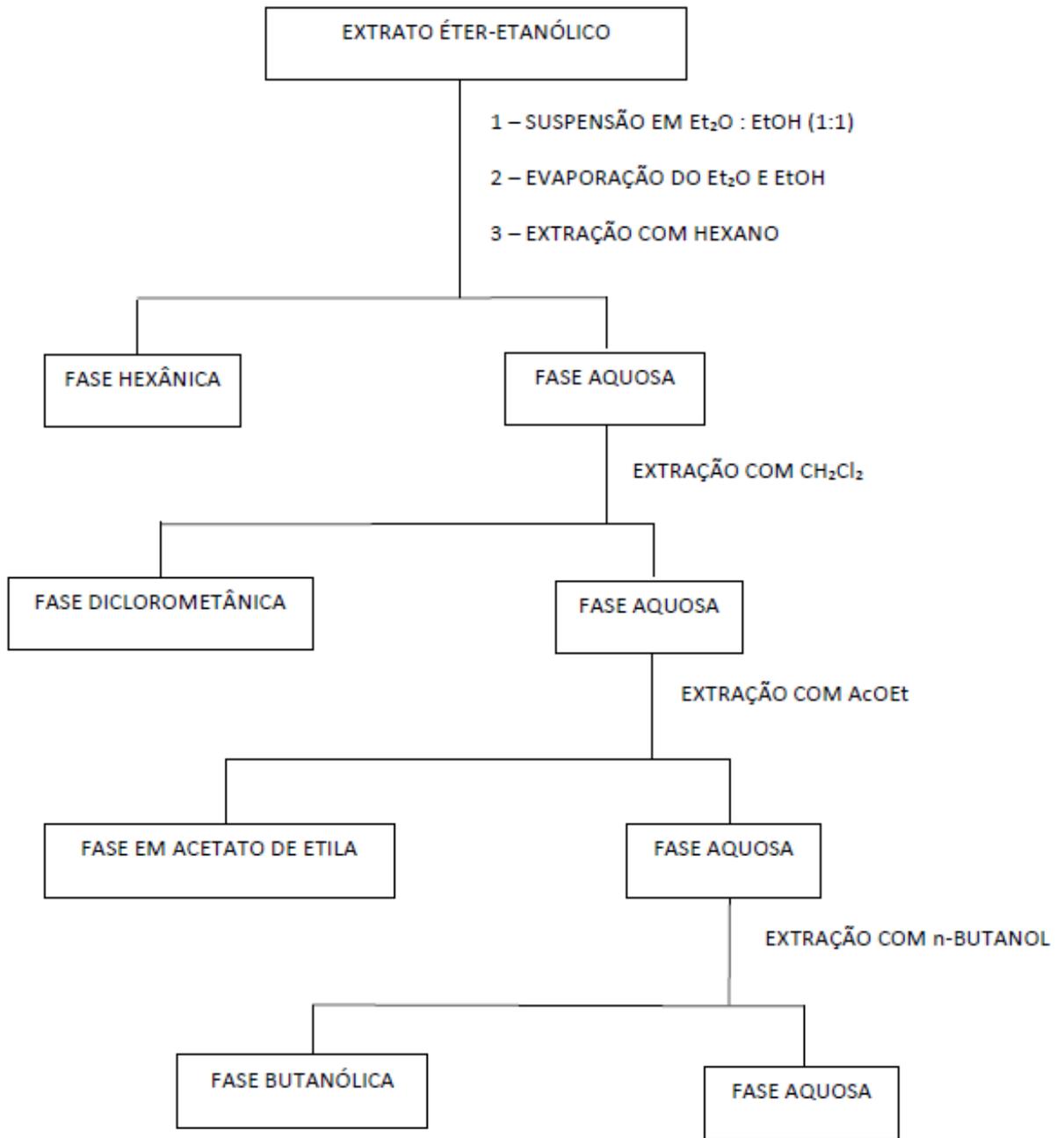
4.2 Preparo do extrato bruto e das frações

A extração foi feita com 3L de éter e etanol (Tedia®) (1:1) por maceração dinâmica em agitador orbital (BioVera – IKA KS 501), a partir de 200g das inflorescências secas pulverizadas, à temperatura ambiente durante 6 horas diárias. Posteriormente foi feita a filtração em papel de filtro, utilizando funil de vidro e balão volumétrico de 1,0 L para posterior secagem em evaporador rotativo (Buchi/ R-124). O preparo foi realizado em Farmanguinhos conforme metodologia desenvolvida no Laboratório de Química Medicinal de Produtos Bioativos (LaQMed) representado na figura 4 (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012).

Após a secagem do extrato bruto, este foi acrescido de água e metanol (8:2), e o metanol foi evaporado em rotavapor, permanecendo apenas o extrato bruto em água. A partição iniciou com adição de 500 mL do solvente hexano (Tedia®) no extrato bruto em água dentro do funil de separação. A fase não aquosa foi evaporada, e foram adicionados mais 500 mL do solvente ao resíduo aquoso. Esse processo foi realizado 5 vezes. Ao resíduo aquoso da fração hexânica, foram adicionados 500 mL de solvente diclorometano (Tedia®), e evaporado após. O solvente acetato de etila (Tedia®) foi adicionado ao resíduo aquoso da fração diclorometânica, e o n-Butanol (Tedia®) ao resíduo aquoso da fração acetálica. Foram realizadas 4, 10, e 1 passagem de solvente, de 500 mL cada, para as frações diclorometânica, acetálica e butanólica, respectivamente. O resíduo aquoso da fração butanólica consiste na fase aquosa utilizada nos demais ensaios deste trabalho. Todos os solventes foram

evaporados em rotavapor de acordo com a programação específica para cada solvente, com balões em banho-maria a aproximadamente 40° C e 100 rpm.

Figura 4 - Extração líquido-líquido do extrato éter-etanólico de *Solidago chilensis* Meyen



Fonte: BRITO, 2018.

4.3 Caracterização fitoquímica das frações

- Para a caracterização fitoquímica foram utilizadas diferentes metodologias, dentre elas: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrofotometria por Ultravioleta e com Detector por Arranjo de Fotodiodos (CLAE-UV-DAD), para a análise de flavonoides e compostos fenólicos no extrato bruto e nas frações diclorometânica e aquosa, e de diterpenos labdânicos, comumente encontrados em *S. chilensis* (como a solidagenona), no extrato bruto e fase diclorometânica; Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) para avaliação dos componentes da fração hexânica.
- CLAE-UV-DAD para a investigação de flavonoides e compostos fenólicos: As amostras foram diluídas (10 mg/ML), e alíquotas de 10 µL foram injetadas. Foi utilizado um sistema CBM-20A, consistindo de bomba de gradiente LC-20ADXR e injetor SIL-30AC (20µL). O instrumento foi equipado com um detector PDA, tipo SPD-M20A, e uma coluna Hibar LicChrospher 100 RP-18 – 5µm (Merck® - 250 x 4 mm) foi utilizada como fase estacionária. Foram empregados os eluentes acetonitrila (eluento A) e ácido acético: água 1:40 (eluento B). A corrida foi realizada a temperatura ambiente (25° C) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O gradiente de eluição começou, nos primeiros 15 min, com 14% do eluento A e 84% do eluento B. O gradiente seguiu de forma linear com 35% do eluento A, nos 30 min seguintes, passando para 100% do mesmo eluento nos 2 min finais. Os dados foram coletados em UV à 360 nm. Os sinais foram identificados com padrões autenticados de acordo com o espectro UV, os tempos de retenção, e com dados da literatura (APATI et al, 2002; OLIVEIRA et al, 2017b).
- CLAE-UV-DAD para a investigação de diterpenos (solidagenona): As amostras foram diluídas (0,1 mg/ML), e alíquotas de 10 µL foram injetadas. O instrumento foi equipado com um detector PDA, tipo SPD-M20A, e uma coluna Hibar LicChrospher 100 RP-18 – 5µm (Merck® - 250 x 4 mm) foi utilizada como fase estacionária. Um mistura binária, composta por ácido trifluoracético 0,05% (54,94 mL) e acetonitrila (27,06 mL), foi utilizada como sistema eluente isocrático. A separação ocorreu à 30° C, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, e tempo total de corrida de 85,01 min. As substâncias eluídas foram analisadas quanto

à sua absorção em UV entre 210 e 400 nm (VALVERDE; AZEVEDO; TOMASSINI, 2009).

- CG-EM: A temperatura do injetor e da ionização de chama foi 260 e 300° C, respectivamente. Foi utilizado H₂ como gás carreador e vazão de 2 mL/min. A rampa de aquecimento seguiu seguinte programação; 60° C (10 min); 60-120° C (6° C /min); 120-290° C (15° C/min); 290° C (17min). Espectrômetro de Massas em quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70eV.

4.4 Análise da viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, células da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 (BCRJ – código 0121), obtidas do cultivo em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich: F9665), foram centrifugadas (Nova Técnica – NT 812) por 8 min a 33570 G e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura para contagem em câmara de Neubauer e ajuste de suspensão para 1x10⁵ cél/mL. Em microplaca de 96 poços as células foram incubadas (100 µl/poço) com 100 µl das frações, em triplicata, nas doses de 1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL por 44 horas em estufa (Sanyo Scientific/ COM-17AC) com 5% de CO₂ a 37° C. Após esse período 20 µl de resazurina foi adicionado em cada poço, e a placa foi novamente incubada em estufa por um período de 4 horas (SILVA, 2009). A intensidade da fluorescência foi mensurada em leitor de microplaca SpectraMax®M5/ Molecular Devices a 560-590 nm, com valores processados pelo programa SoftMax Pro 5.3.

4.5 Avaliação da capacidade inibitória da produção de óxido nítrico em J774A.1

Células da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 (BCRJ – código 0121), suspensas em 2,5x10⁵ cél/mL, obtidas do cultivo em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich: F9665), foram plaqueadas em placa de 96 poços, e tratadas com extrato bruto de *Solidago chilensis* (0,01; 0,1; 1, e 10 µg/mL), e em um segundo ensaio com extrato bruto e cinco diferentes frações da espécie em estudo (10 µg/mL), dexametasona [Sigma D1756-1G (20 pg/mL)], e diclofenaco de sódio [Sigma D6899106 (50 µg/mL)] 1 hora antes do estímulo com LPS (1 µg/mL – Sigma-Aldrich O55:B5). O microtubo com LPS, após ser descongelado, foi submetido ao sonificador (Unique - 1400) por 1h antes de ser diluído. Após 24 horas de incubação

em estufa (Sanyo Scientific/ COM-17AC) com 5% CO₂ a 37° C, 100 µl dos sobrenadantes foram coletados para a avaliação da produção de NO. Como controle negativo foi utilizado o sobrenadante de macrófagos não tratados e não estimulados, e como controle positivo o sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS e não tratados. Nitrito, um metabólito estável do NO, foi determinado pelo método colorimétrico de Griess (GREEN, 1982; PARK et al 2018). A curva do nitrito foi preparada em 5 pontos de concentração (100; 50; 25; 12,5 e 6,25µM) mais o branco. Foram adicionados 100 µl do reagente de Griess em cada amostra e nos 5 pontos da curva, e após 15 min, a absorbância foi mensurada a 540 nm em leitor de microplaca SpectraMax®M5/ Molecular Devices. Os valores foram processados pelo programa SoftMax Pro 5.3.

4.6 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss Webster, com tempo de vida de 5 a 6 semanas, e peso médio variando entre 20 – 25 g, oriundos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB-Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Os animais foram mantidos sob condição constante de temperatura (22 + 2° C), em ciclo claro/escuro de 12h, e com fornecimento de água e comida ad libitum. Os animais foram aclimatados por uma semana antes dos experimentos no Serviço de Animais de Laboratório do INCQS. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob a licença P17/13-5.

4.7 Pleurisia induzida por LPS

Para indução da pleurisia os animais receberam uma administração intratorácica de 100 µl de LPS (12,5 ng/por animal) diluído em PBS estéril, ou apenas PBS estéril, no caso do grupo salina (PENIDO, 2006). O microtubo com LPS, após ser descongelado, foi submetido ao sonificador (Unique - 1400) por 1h antes de ser diluído. Os animais foram tratados por via i.p., uma hora antes do desafio com LPS (Sigma-Aldrich O55:B5), com extrato bruto de *S. chilensis* em diferentes doses (0,01, 0,1, 1, e 10 mg/kg), e em um segundo ensaio com extrato bruto e diferentes frações na dose de 10 mg/kg. Em ambos os ensaios, os grupos tratados com dexametasona

(Sigma – D1756-1G) 5 mg/kg e diclofenaco de sódio (Sigma – D6899106) 50 mg/kg foram utilizados como controle positivo, e o grupo não tratado como controle negativo. Todos os tratamentos foram administrados no volume de 200 µl por animal. Para avaliação da pleurisia, os animais foram eutanasiados 24 horas após o estímulo e suas cavidades torácicas foram lavadas com 1000 µl de PBS contendo EDTA (10 µM). A contagem de leucócitos totais foi realizada através de câmara de Neubauer com diluição de 1:20 da amostra em corante de Turk, e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de citoesfregaços (centrífuga ALB 12 CC – INBRAS – 605 rpm/5 min), corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa (Kit Panótico rápido – Laborclin), utilizando microscópio Nikon Eclipse E100 (x40) para ambas as contagens (PENIDO, 2006; VAGO et al, 2012). Os lavados foram centrifugados por 10 min a 20.000 rpm (centrífuga Mikro 20 – Hettich) e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70° C (Thermo Scientific – REVCO EXF) para posterior análise.

4.8 Análise de proteína total

Os sobrenadantes dos lavados pleurais foram descongelados gradativamente em isopor com gelo, e 5µl de cada amostra (lavado pleural e proteína BSA) foram plaqueadas em placa de 96 poços. A curva de proteína foi feita com BSA em 4 pontos de concentração (1,4; 0,7; 0,35 e 0,17 mg/ml) utilizando PBS para as diluições e para o branco. Em seguida foi adicionado 245µl do reagente de Bradford (Sigma – B6916) em todos os poços, e aguardado 15 min para a complexação das proteínas, mantendo a placa ao abrigo da luz. A absorbância foi mensurada a 595 nm em leitor de microplaca SpectraMax®M5/ Molecular Devices. Os valores foram processados pelo programa SoftMax Pro 5.3 (YO et al, 2016).

4.9 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os níveis das citocinas TNF- α , e das quimiocinas CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC e CCL11/eotaxina-1 presentes no sobrenadante dos lavados pleurais de camundongos Swiss Webster foram avaliados pelo método de ELISA sanduíche validado pelo Laboratório de Farmacologia Aplicada em Farmanguinhos. Na primeira etapa de coating, foram adicionados anticorpos de captura purificados em placas MaxiSorp de

96 poços. Foram adicionados, em placas individuais, os anticorpos anti-TNF- α , anti-CXCL2, anti-CXCL1 e anti-CCL11, nas concentrações de 2,0, 2,0, 4,0, e 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, diluídos em tampão de cobertura (50 $\mu\text{l/poço}$). Após 24h de incubação a 40° C, as placas foram lavadas duas vezes com 200 $\mu\text{l/poço}$ de PBS/Tween. Na etapa de bloqueio foi utilizado 200 $\mu\text{l/poço}$ de PBS-BSA 1%, seguido de 1h de incubação em temperatura ambiente, e lavagem com PBS/Tween por quatro vezes seguidas. Foram adicionados às placas, 50 μl das amostras e a curva padrão de PBS-BSA 1% em onze pontos mais o branco. A curva de calibração foi construída através de diluições seriadas, partindo do ponto de maior concentração; 15, 10, 15, e 1 ng/ml para os anticorpos anti-TNF- α , anti-CXCL2, anti-CXCL1 e anti-CCL11, respectivamente. As placas foram novamente incubadas a 40° C por 24h. A etapa seguinte foi a adição do anticorpo biotilado para detecção, com solução de uso a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ em 100 $\mu\text{l/poço}$ de PBS-EDTA 1% para o anti-CXCL2 e anti-CXCL1, e 0,4 $\mu\text{g/ml}$ em 100 $\mu\text{l/poço}$ para os demais anticorpos. As placas foram mais uma vez incubadas a temperatura ambiente por 1h, e lavadas quatro vezes com PBS/Tween. Foi feita a adição da enzima conjugada avidina (protegida ao abrigo da luz) na proporção de 1/500 em 50 μl de PBS-EDTA 1%, seguido de incubação por 30 min em temperatura ambiente, e lavagem com PBS/Tween (6x). Por conseguinte, foi adicionado o tampão perborato (12,15 mg/mL) com OPD (0,5 mg/mL) em 100 $\mu\text{l/poço}$, protegendo sempre da luz. A reação foi interrompida com 100 $\mu\text{l/poço}$ de ácido sulfúrico 2M (CORREA et al, 2016). A intensidade da fluorescência foi mensurada em leitor de microplaca SpectraMax®M5/ Molecular Devices a 490 nm, com valores processados pelo programa SoftMax Pro 5.3.

4.10 Immuno blot

- Etapa 1 - Preparo das amostras e extração de proteínas: Células da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 (BCRJ – código 0121), com ajuste de suspensão para 2,5x10⁵ cél/mL, obtidas do cultivo em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich: F9665), foram plaqueadas em placa de 12 poços, e tratadas com extrato bruto e cinco diferentes frações (10 $\mu\text{g/mL}$) de *Solidago chilensis*, e diclofenaco de sódio [Sigma D6899106 (50 $\mu\text{g/mL}$)] 1 hora antes do estímulo com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$ – Sigma-Aldrich O55:B5). Após 24h, a placa foi lavada 3x com 1mL de PBS, mantendo a placa sobre o

gelo, seguido da adição de 70 µl/poço de solução de extração gelada (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40) suplementado com coquetel inibidor de protease 1x, mantidas no gelo por quinze minutos com agitação periódica e sonicadas a 4° C por um minuto seguido de centrifugação a 18620 G, 4° C por dez minutos. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (BioRad) (CORREA et al, 2016).

- Etapa 2 – Immuno blot: As amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 1 %; 2-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % e azul de bromofenol 0,001 %) e aquecidos a 90 °C por cinco minutos. Em seguida 30 µg dos lisados totais foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (em gel de poliacrilamida-SDS 11 %) e transferidos para membranas de PVDF em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry), utilizando tampão de transferência (Tris 48 mM e Glicina 39 mM). Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora de Milk 5 % em TBST (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4; NaCl a 150 mM; Tween 20 a 0,1 %) por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas (overnight, a 4° C) com os anticorpos policlonais primários produzidos em cabra para COX-2 (1:10000) e posteriormente com o anticorpo conjugado a HRP anti- IgG de cabra (1:20000). Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBST e duas vezes com TBS. A detecção foi feita usando o Sistema ECL e as membranas expostas a filme de autorradiografia. As membranas então foram extirpadas com NaOH (1N) e então incubadas com o anticorpo policlonal produzido em coelho para β-actina (1:5000) para a detecção das proteínas totais. As bandas foram quantificadas por densitometria usando o software Image J® (domínio público), conforme Correia e colaboradores (2016).

4.11 Preparo das soluções:

- Preparo dos tratamentos: As concentrações do extrato, frações, dexametasona e diclofenaco de sódio foram preparados de acordo com o peso dos animais. O extrato e frações foram ajustados a partir de uma solução estoque pesada em mg em balança analítica (EDUTECH – EEQ9003F-B), e diluída em 1 mL de

tween 80 a 5% fornecido pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal Fluminense. As frações hexânica e diclorometânica foram submetidas ao sonicador (Unique - 1400) por aproximadamente 1 hora para melhor solubilização dos extratos. A dexametasona e o diclofenaco de sódio foram solubilizados em água para injetável. Para os ensaios in vitro, o extrato e frações foram diluídos em 400 µl de DMSO, submetidos ao sonicador por 1 hora, e acrescidos de 900 µl de meio DMEM puro.

- Preparo das soluções para ELISA: Para o tampão de cobertura Pharmingen, 2,68 mg de Na₂PO₄ foram ressuspendidos em 100mL de água MiliQ para manter a solução à 0,1M. O pH foi ajustado para 9,0. A solução de PBS/BSA 1% foi preparada através da dissolução de 1g de albumina sérica bovina para cada 100mL de solução de PBS. A solução PBS/Tween foi feita pela adição de 0,5mL de Tween 20 em 1L de PBS. E por fim para o tampão Perborato/OPD, foi diluído o tampão perborato em água destilada para o volume desejado (12,15mg/mL), seguida da adição de OPD em concentração final de 0,5mg/mL. O tampão foi diluído 10 min antes da revelação, e o OPD foi adicionado no momento do uso, mantendo a solução ao abrigo da luz.
- Preparo dos géis para Immuno blot: O gel de separação 11% foi preparado a partir de 2 mL de tampão do gel de separação, 2,86 mL acrilamida 30%, 1,43 mL de bis-acrilamida 1,6%, 1,6 mL de água deionizada, 100 µl persulfato de amônio (APS) 10%, e 15 µl de tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel de entrada 5% foi preparado com 1mL de tampão do gel de entrada, 650 µl acrilamida 30%, 325 µl de bis-acrilamida 1,6%, 2,025mL de água deionizada, 50 µl PSA 10%, e 8 µl de TEMED.

4.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média, e foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e do teste Newman-Keuls-Student, considerando significativo os valores de $p \leq 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 em sistema operacional Windows 10.

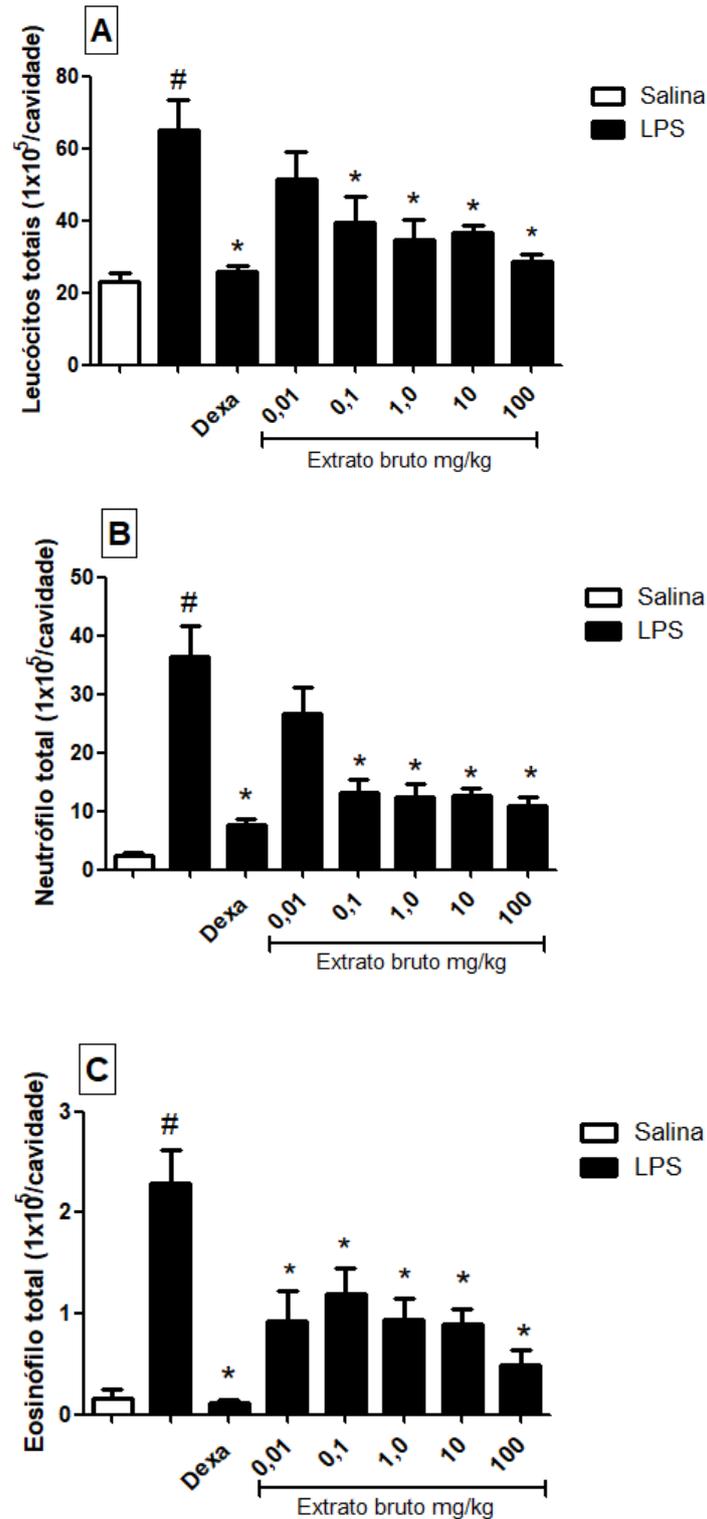
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do extrato bruto de *S. chilensis* na pleurisia induzida por LPS

Com o intuito de verificar qual dose de extrato bruto das inflorescências de *S. chilensis* possui efeito anti-inflamatório, foi realizado o ensaio de pleurisia onde camundongos da linhagem Swiss Webster, previamente tratados com dexametasona (5 mg/kg) e diferentes doses do extrato bruto de *S. chilensis* (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mg/kg), foram estimulados com LPS (12,5 ng/por animal) após 1h. Decorridas 24 horas após o estímulo observou-se um aumento significativo no recrutamento de leucócitos totais e das populações de neutrófilos e eosinófilos no grupo não tratado (LPS), quando comparado com grupo não tratado e não estimulado (Salina), conforme observado na figura 5.

O tratamento prévio com dexametasona reduziu aos níveis basais o infiltrado leucocitário e o recrutamento de células polimorfonucleares (Figura 5). Quanto ao extrato bruto, a partir da dose de 0,1 mg/kg, observou-se uma redução significativa no número total de leucócitos e neutrófilos (Figura 5A e 5B). Já na população de eosinófilos, todas as doses do extrato foram eficazes em reduzir a migração, frente ao grupo não tratado (Figura 5C). Como os resultados entre as doses de 10 e 100 mg/kg do extrato bruto não foram discrepantes em todos os parâmetros, foi escolhida a dose de 10 mg/kg para o ensaio com as frações de *S. chilensis*.

Figura 5: Efeito *in vivo* do extrato bruto de *S. chilensis*



Legenda: Efeito *in vivo* do extrato bruto de *S. chilensis* (0.01. 0.1. 1. 10 e 100 mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais (A) e populações de neutrófilos (B) e eosinófilos (C) na cavidade pleural de camundongos Swiss Webster (n=6) estimulados com LPS (12,5 ng/por animal). Dexametasona (5 mg/kg. i.p.) foi utilizada como droga de referência. Camundongos foram tratados 1h antes do desafio. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0.05$) entre grupo estimulado (LPS) e não estimulado (Salina); * indica diferença estatisticamente significativa entre grupo tratado e não tratado. Fonte: BRITO, 2018.

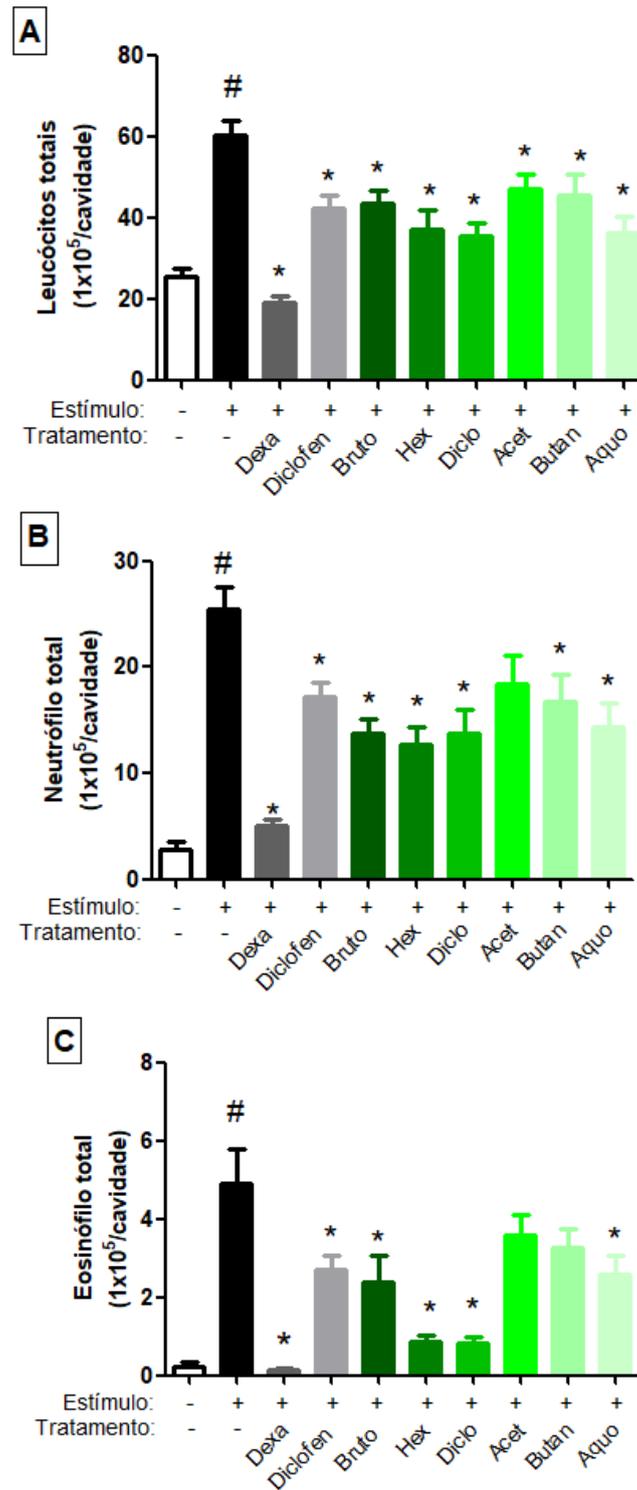
5.2 Efeito das frações de *S. chilensis* na pleurisia induzida por LPS

A partir da dose previamente estipulada de extrato de *S. chilensis* (10 mg/kg), foi realizado um segundo ensaio de pleurisia para determinar se haveria atividade anti-inflamatória diferenciada entre as frações de *S. chilensis*. Camundongos da linhagem Swiss Webster, previamente tratados com dexametasona (5 mg/kg), diclofenaco de sódio (10 mg/kg), extrato bruto e as diferentes frações obtidas de *S. chilensis* (10 mg/kg), foram estimulados com LPS (12,5 ng/por animal por via i.t.) após 1h. Passadas 24 horas após o estímulo observa-se um aumento significativo no recrutamento de leucócitos totais e das populações de neutrófilos e eosinófilos no grupo não tratado, quando comparado com grupo não tratado e não estimulado (Figura 6).

Assim como os grupos tratados com medicamentos de referência, tanto o extrato bruto quanto as frações reduziram significativamente o recrutamento de leucócitos totais no sítio da inflamação induzida (Figura 6A). Analisando o recrutamento neutrofílico, o medicamento de referência, dexametasona, reduziu quase aos níveis basais quando comparado ao grupo não tratado. Já o diclofenaco de sódio, assim como a fração butanólica, apresentaram aproximadamente 19% de redução. O extrato bruto e as frações diclorometânica e aquosa reduziram o recrutamento em torno de 24%, enquanto a fração hexânica apresentou melhor resultado com 28% de inibição. Não houve redução significativa para o grupo tratado com a fração acetálica (Figura 6B).

Quanto a população de eosinófilos, o grupo tratado com dexametasona reduziu o recrutamento praticamente aos níveis basais, enquanto que o diclofenaco de sódio, o extrato bruto e a fração aquosa reduziram em aproximadamente 52%. As frações hexânicas e diclorometânicas apresentaram melhor perfil de inibição com 79%. Já as frações acetálica e butanólica, embora apresentem uma tendência, não obtiveram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo LPS (Figura 6C). Diante dos resultados foram escolhidas junto ao extrato bruto, as frações hexânica, diclorometânica, e aquosa para dar prosseguimento aos estudos.

Figura 6: Efeito *in vivo* do extrato bruto e de diferentes frações de *S. chilensis*



Legenda: Efeito *in vivo* do extrato bruto e de diferentes frações de *S. chilensis* (10mg/kg) quanto ao recrutamento de leucócitos totais (A) e populações de neutrófilos (B) e eosinófilos (C) na cavidade pleural de camundongos Swiss Webster (n=6) estimulados com LPS (12,5 ng/por animal). Dexametasona (5 mg/kg. i.p.) e diclofenaco de sódio (10 mg/kg) foram utilizados como drogas de referência. Camundongos foram tratados 1h antes do desafio. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0.05$) entre grupo estimulado (LPS) e não estimulado (Salina); * indica diferença estatisticamente significativa entre grupo tratado e não tratado. Fonte: BRITO, 2018.

5.3 Efeito das frações de *S. chilensis* na produção total de proteínas e de mediadores inflamatórios quimiotáticos

A partir dos resultados observados no recrutamento leucocitário em lavados pleurais de camundongos desafiados com LPS (Figura 6), o sobrenadante dos lavados dos grupos tratados com extrato bruto e as frações hexânica, diclorometânica e aquosa (10mg/kg) foram selecionados para realizar a dosagem de proteínas totais, através do reagente de Bradford, e a dosagem da citocinas; TNF- α , KC, CXCL2 e Eotaxina-1, pelo método de ELISA sanduíche. Após 24 horas do estímulo com LPS, pôde ser observado um aumento significativo na produção total de proteínas e de mediadores inflamatórios no grupo não tratado (LPS), quando comparado com o grupo não tratado e não estimulado (Figura 7).

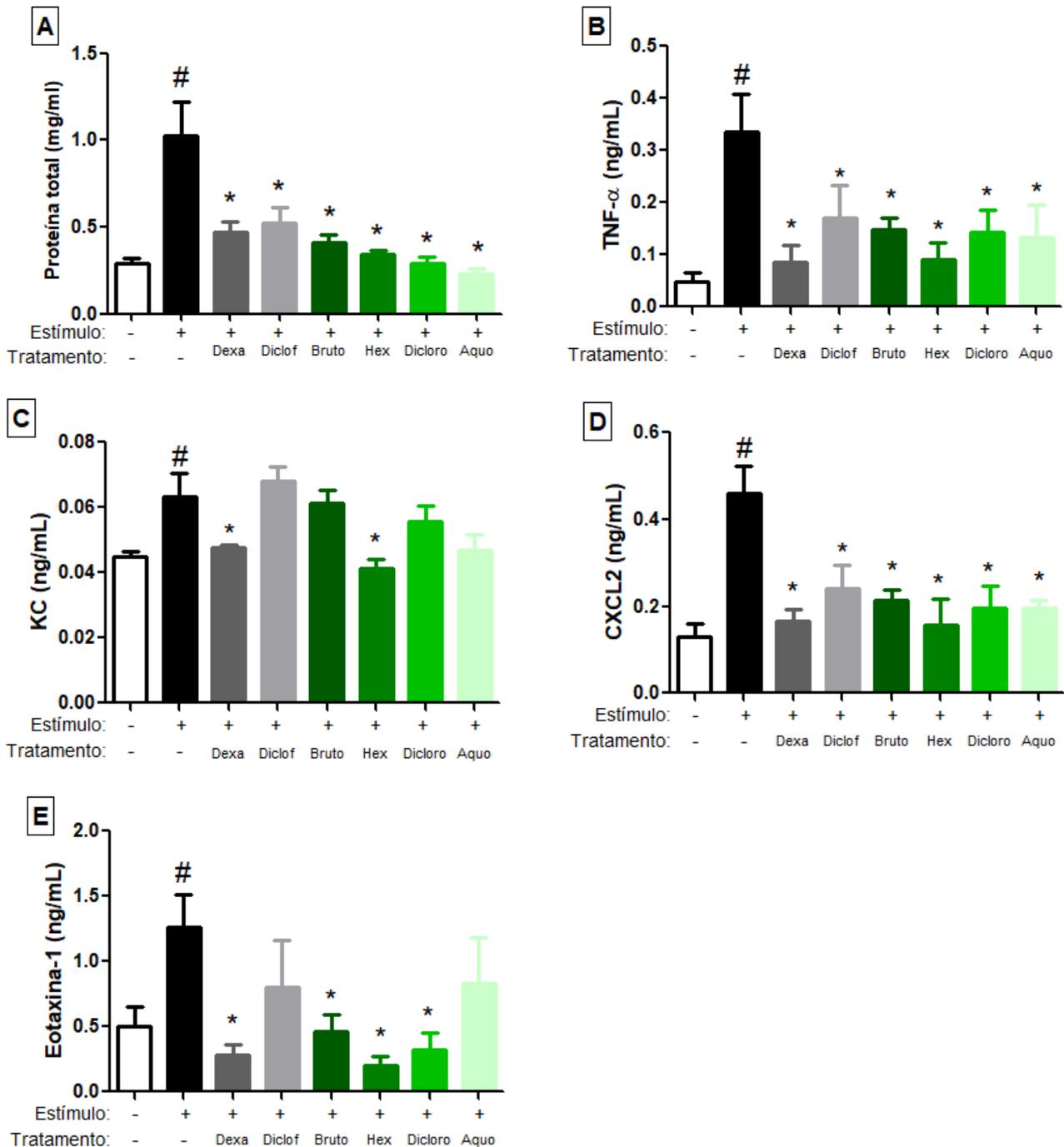
Os grupos tratados com os medicamentos de referência reduziram em aproximadamente 29% a produção total de proteínas. O extrato bruto e as frações, de forma estatisticamente significativa, também foram eficazes na inibição deste parâmetro, de forma mais acentuada até mesmo do que os medicamentos de referências (Figura 7A). Na quantificação do mediador TNF- α , observou-se uma redução significativa em todos os grupos tratados, quando comparados ao não tratado (LPS). Os grupos dexametasona e fração hexânica apresentaram os melhores perfis de inibição com 73%, aproximadamente (Figura 7B).

Foram ainda determinados os níveis das quimiocinas KC e CXCL2 presente no sobrenadante dos lavados. Apenas a dexametasona e a fração hexânica obtiveram relevância estatística na modulação de KC (Figura 7C). Já na determinação dos níveis de CXCL2, tanto os grupos tratados com os medicamentos de referência, quanto os tratados com o extrato bruto e as frações apresentaram inibição superior a 33% (Figura 7D). Os resultados da análise de CXCL2 estão em consonância com observado no recrutamento neutrofílico demonstrado na figura 6B.

Como pode ser observado na figura 7E, houve uma redução significativa na produção de eotaxina-1 do grupo dexametasona, para o grupo não tratado (LPS). O extrato bruto e a fração diclorometânica apresentaram um perfil de redução parecido entre si, enquanto que a fração hexânica obteve um comportamento mais acentuado na redução. Os resultados corroboram o achado no recrutamento de eosinófilos observado na figura 6C. Os grupos tratados com diclofenaco de sódio e com a fração aquosa não obtiveram significância estatística (Figura 7E).

A fração hexânica foi a única que modulou todos os parâmetros analisados na figura 7. Seus efeitos são mais proeminentes do que as demais frações, e isso pode ser claramente observado na quantificação de TNF- α , KC, e eotaxina-1. Esta fração foi capaz ainda de reduzir os níveis de CXCL-2, enquanto a fração diclorometânica, assim como o extrato bruto, modularam os níveis de TNF- α , CXCL2 e eotaxina-1, e a fração aquosa reduziu apenas os valores de TNF- α e CXCL-2 nos lavados pleurais (Figura 7B-E).

Figura 7: Efeito *in vivo* do extrato bruto e de diferentes frações de *S. chilensis* na geração de mediadores inflamatórios.



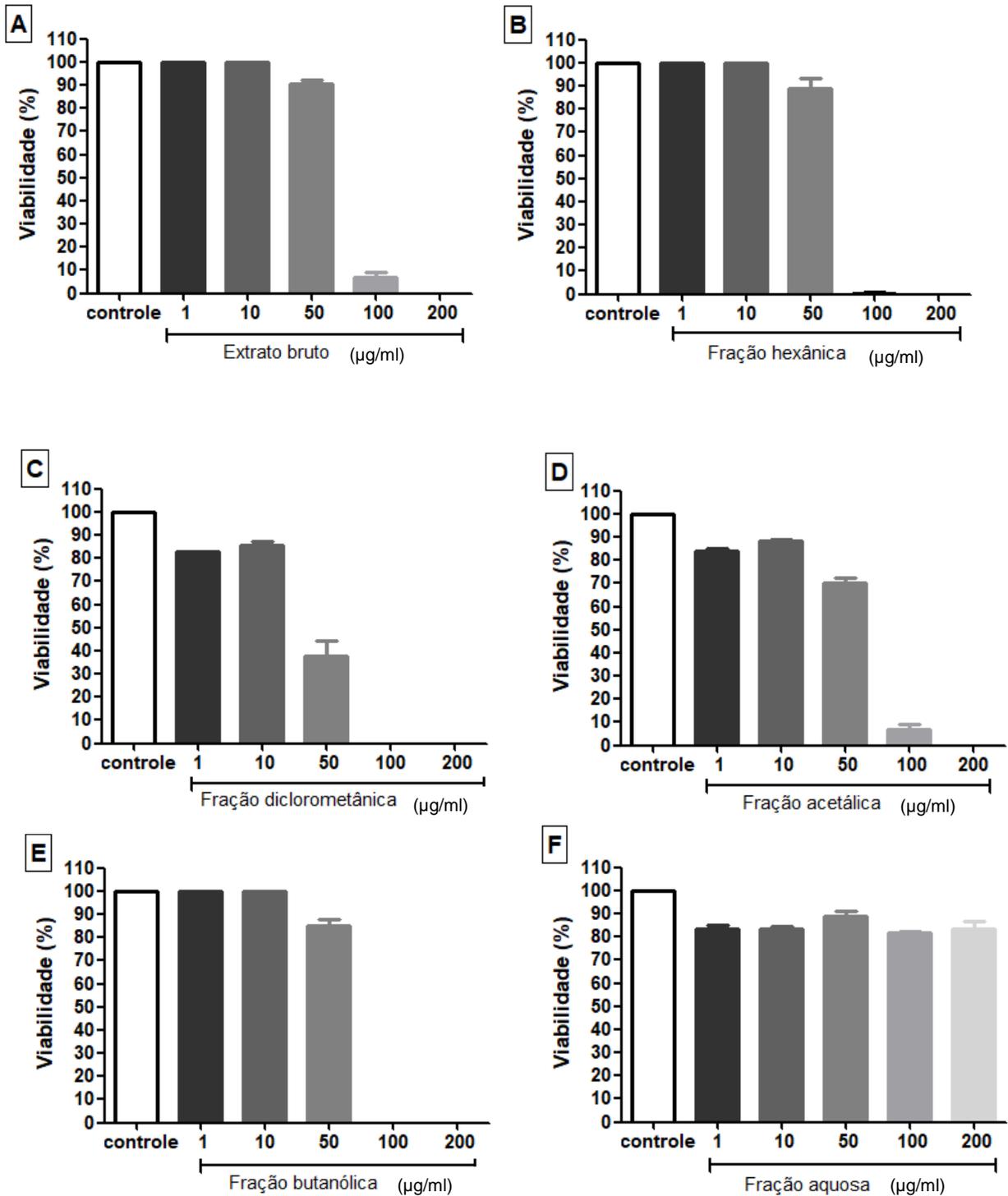
Legenda: Efeito *in vivo* do extrato bruto e de diferentes frações de *S. chilensis* (10mg/kg) na geração dos mediadores TNF- α (B). KC (C). CXCL2 (D) e Eotaxina-1 (E) no lavado pleural de camundongos Swiss Webster (n=5) desafiados com LPS (12,5 ng/por animal). Dexametasona (5 mg/kg. i.p.) e diclofenaco de sódio (10 mg/kg. i.p.) foram utilizados como drogas de referência. Os níveis de proteína (A) foram determinados através do reagente de Bradford no lavado pleural recolhido 24h após desafio. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p < 0.05$) entre grupo estimulado e não estimulado; * indica diferença estatisticamente significativa entre grupo tratado e não tratado. Fonte: BRITO, 2018.

5.4 Efeito citotóxico do extrato bruto e frações de *S. chilensis* em linhagem J774A.1

Com o objetivo de verificar se o extrato bruto ou as frações de *S. chilensis* possuem algum efeito citotóxico que inviabilizasse a população celular utilizada ao longo do estudo, foi realizada uma análise da viabilidade celular com células da linhagem de macrófagos murinos J744A.1, tratadas com diferentes concentrações (1, 10, 50, 100, e 200 µg/mL) do extrato e das frações por 24h. A fluorescência mensurada de acordo com a metabolização da resazurina pode ser observada nos gráficos de viabilidade expressos em porcentagem na Figura 8.

Assim como o extrato bruto, a maioria das frações foram citotóxicas para quase 100% da população celular nas concentrações de 100 e 200 µg/mL (Figura 8A-E). A exceção foi para a fração aquosa, que mesmo na dose mais alta, manteve em torno de 80% da população celular viável (Figura 8F). A fração diclorometânica e a acetálica, na dose de 50 µg/mL, inviabilizaram 60 e 30% da população, respectivamente (Figura 8C e 8D). Diante desses resultados, foi escolhida a dose de 10 µg/mL, por apresentar uma margem de segurança superior a 70% de viabilidade tanto no extrato, quanto em todas as frações (Figura 8), para dar seguimentos aos ensaios *in vitro* em modelo de inflamação.

Figura 8: Efeito citotóxico do extrato bruto e das frações de *Solidago chilensis* em linhagem de macrófagos murino J774A.1.



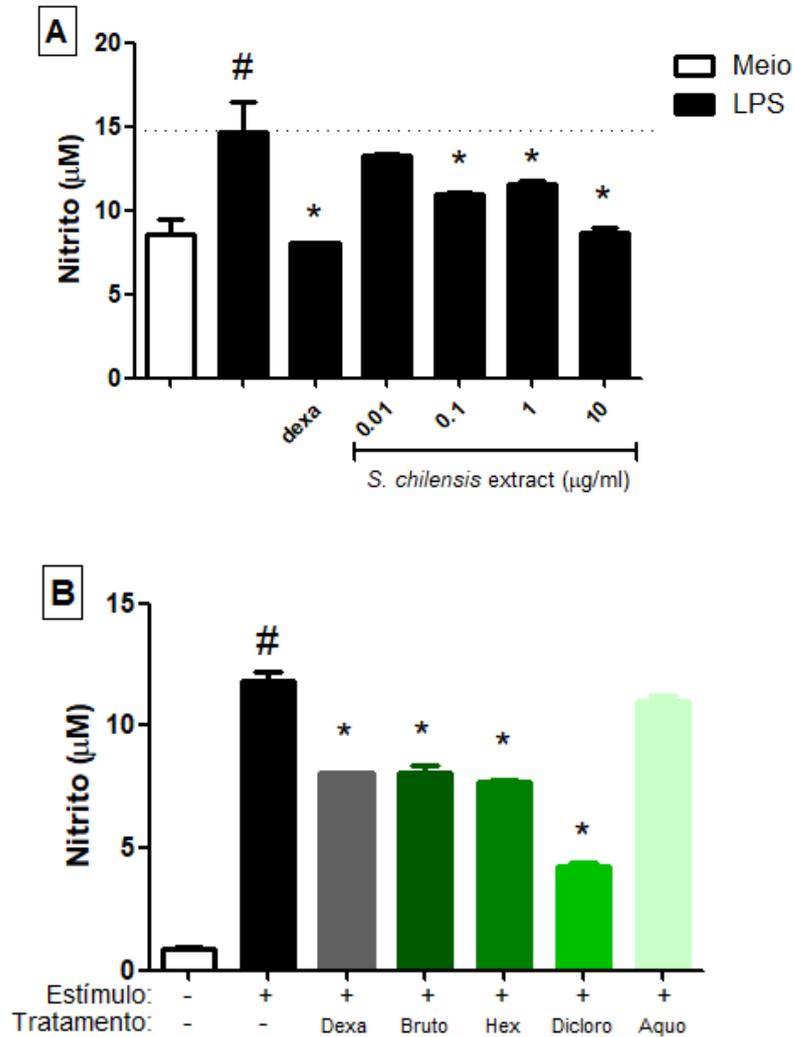
Legenda: Efeito citotóxico do extrato bruto (A) e das frações hexânica (B), diclorometânica (C), acetálica (D), butanólica (E) e aquosa (F) da *Solidago chilensis* em linhagem de macrófagos murino J774A.1 (n=4) expresso em porcentagem. Fonte: BRITO, 2018.

5.5 Avaliação da capacidade inibitória do extrato bruto e das frações de *S. chilensis* na produção de óxido nítrico *in vitro*

Com o intuito de verificar qual concentração de extrato bruto das inflorescências de *S. chilensis* possui efeito anti-inflamatório *in vitro*, foi realizado um ensaio de quantificação de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos murinos J744A.1 estimulados com LPS (1 µg/mL), e previamente tratados com dexametasona (20 pg/mL) e diferentes concentrações do extrato bruto (0,01; 0,1; 1 e 10 µg/mL). Após 24 horas do estímulo, observou-se um aumento significativo na produção do metabólito estável do NO (nitrito) no grupo não tratado (LPS), quando comparado com grupo não tratado e não estimulado (Meio) (Figura 9A). A dexametasona foi eficiente em reduzir aproximadamente 50% da formação do nitrito, enquanto apenas a dose de 0,01 µg/mL do extrato não obteve significância estatística nesta redução (Figura 9A). Por apresentar uma resposta similar a dexametasona, e estar dentro da margem de segurança de 70% de viabilidade celular, visto na figura 6, a dose de 10 µg/mL foi escolhida para dar continuidade ao ensaio *in vitro* com as frações.

Um segundo ensaio de dosagem de óxido nítrico no sobrenadante da linhagem J744A.1 foi feito nas mesmas condições que o anterior. Porém, junto ao extrato bruto de *S. chilensis* (10 µg/mL), as células foram tratadas com as frações hexânica, diclorometânica e aquosa (10 µg/mL), para determinar possíveis efeitos anti-inflamatórios diferenciados também *in vitro*. As frações para esse ensaio foram escolhidas a partir dos resultados observados no recrutamento leucocitário na figura 6. O grupo não tratado apresentou um aumento significativo na produção de NO, ao ser comparado com o grupo não tratado e não estimulado. A dexametasona, o extrato bruto e a fração hexânica, apresentaram um percentual, de aproximadamente, 32% de inibição da produção do mediador NO, enquanto a fração diclorometânica obteve o melhor perfil de redução com 59%. A fração aquosa não obteve resultado com relevância estatística (Figura 9B).

Figura 9: Produção de NO em células da linhagem J774.A1 estimuladas com LPS e tratadas com extrato bruto de *S. chilensis* e as diferentes frações.



Legenda: A produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess através do sobrenadante recolhido 24h após a simulação com LPS em células tratadas ($n=4$) com extrato bruto de *S. chilensis* em diferentes concentrações (A) e as frações (10 µg/mL) (B). Dexametasona (20 pg/mL.) foi utilizada como droga de referência. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). # indica diferença significativa estatisticamente ($p \leq 0.05$) entre grupo estimulado (LPS) e não-estimulado (Meio); * indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre grupo tratado e não-tratado estimulado (LPS). Fonte: BRITO, 2018.

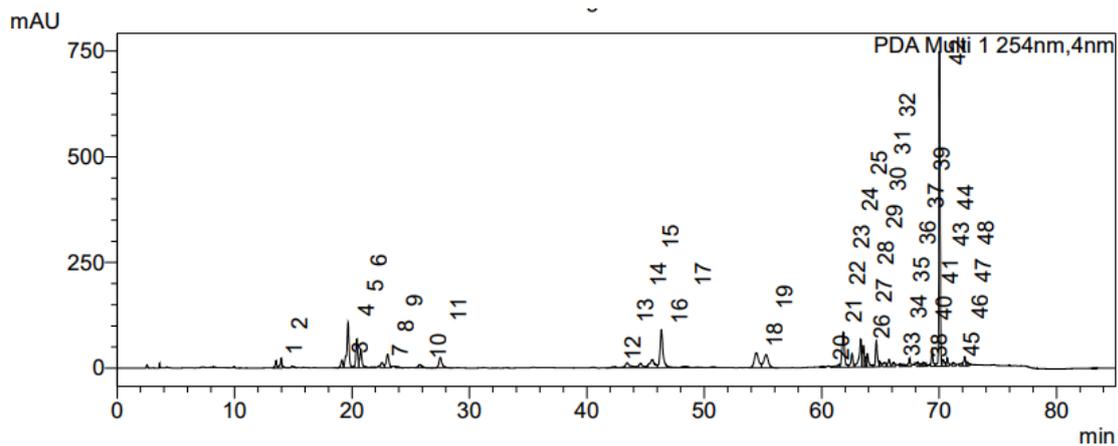
5.6 Fitoconstituintes da *Solidago chilensis* Meyen

5.6.1 Extrato Bruto

Por ter modulado a migração leucocitária total e de granulócitos, e ainda ter sido capaz de inibir a produção de quase todos os mediadores avaliados nesse trabalho, com exceção do KC, o extrato bruto teve seus constituintes avaliados pelo método de CLAE-UV-DAD. Utilizando a metodologia validada no LaQMed para a investigação de terpenos, foi identificado na figura 10 um sinal (42) no tempo de retenção de 70,03 min com área de 23,1% em 254 nm, coerente com o sinal característico de solidagenona achado por Valverde e colaboradores (2009) utilizando a mesma metodologia.

A análise por CLAE-UV-PDA mostrou que o EB é constituído por 39,1% de flavonoides derivados da quercetina e do kaempferol, entre agliconas e glicosídeos, conforme a análise dos espectros de UV para as agliconas presentes.

Figura 10: CLAE-UV- DAD do extrato bruto de *Solidago chilensis* para a caracterização de terpenos.



Legenda: CLAE-UV- DAD do extrato bruto de *Solidago chilensis* para a caracterização de terpenos. Condições cromatográficas: Temperatura = 30^o C. vazão = 1.0 mL min⁻¹. λ = 254 nm. V_{inj} = 10 μ L. sistema de eluição isocrático; ácido trifluoracético 0.05% (54.94 mL) e acetonitrila (27.06 mL). Fonte: BRITO, 2018.

5.6.2 Fração Hexânica

Por ter apresentado modulação no infiltrado leucocitário total e na população de células polimorfonucleares dos lavados pleurais, bem como a redução nos níveis de todos os mediadores inflamatórios avaliados neste trabalho, a fração hexânica de *S. chilensis* foi submetida à análise em CG-EM para identificação de seus constituintes. Foram caracterizadas nove substâncias, consideradas a partir de 80% de presença e detecção na fração hexânica, perfazendo um total de 39,33 % do seu total. Na tabela 1, podem ser observadas a presença de ceras e outras substâncias graxas, do diterpeno solidagenona, do sesquiterpeno guaieno, além de acetato de exabornila e estigmasta-7,25-dien-3 β -ol.

Tabela 1 - Fitoconstituintes caracterizados por CG-EM na fração hexânica de *Solidago chilensis*. Temp. do injetor = 260° C. temp. da ionização de chama = 260° C. vazão = 2 mL/min com H₂. Rampa de temperatura = 60° C (10 min); 60-120° C (6° C/min); 120-290° C (15° C/min); 290° C (17min).

T.R. (min)	Area %	Constituinte	CAS	Semelhança %
12,586	0,50	Acetato de exabornila	125-12-2	91
20,448	0,42	Guaieno	88-84-6	89
22,522	2,20	Solidagenona	40883-07-6	91
23,523	0,97	Heptacosano	593-49-7	98
24,695	4,25	Hentriacontano	630-04-6	91
26,307	23,66	Hexatriacontano	630-06-8	95
27,344	1,39	11-decildocosano	55401-55-3	83
28,623	5,36	Pentadecano	1560-93-6	91
28,800	0,58	Estigmasta-7,25-dien-3 β -ol	6785-58-6	95

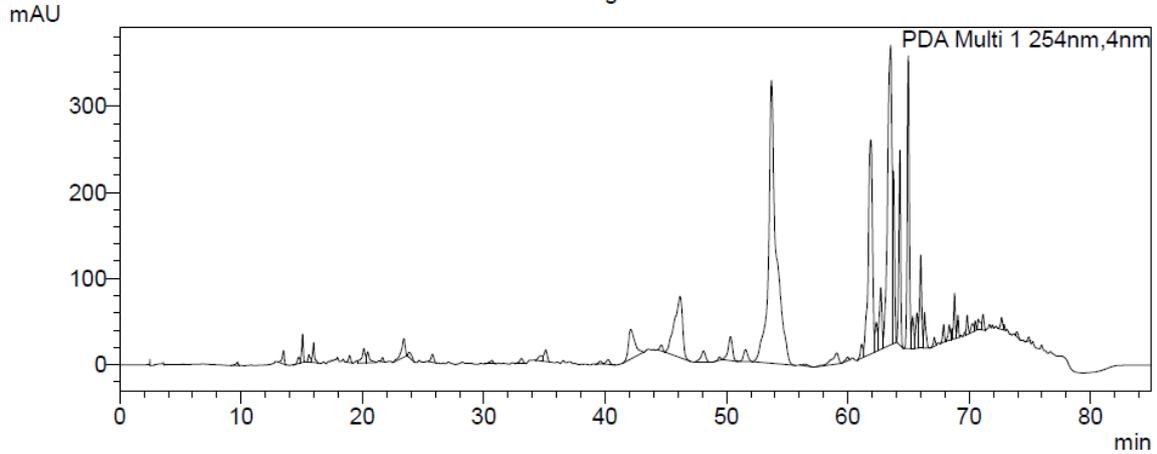
Fonte: BRITO. 2018.

5.6.3 Fração diclorometânica

Por ter modulado a migração leucocitária total e de granulócitos, e ainda ter sido capaz de inibir a produção de quase todos os mediadores avaliados nesse trabalho, com exceção do KC, a fração diclorometânica teve seus constituintes avaliados pelo método de CLAE-UV-DAD. A metodologia validada no LaQMed para a investigação de extratos e frações de média polaridade provenientes de *S. chilensis*, não identificou a presença do diterpeno labdânico solidagenona, que apresenta tempo de retenção entre 71 a 72 min na faixa de absorvância de 254 nm. Porém aos 53,71 min, observa-se um sinal com 26,6% de área de uma substância desconhecida, que para caracterizá-la seria necessário fazer seu isolamento (Figura 11).

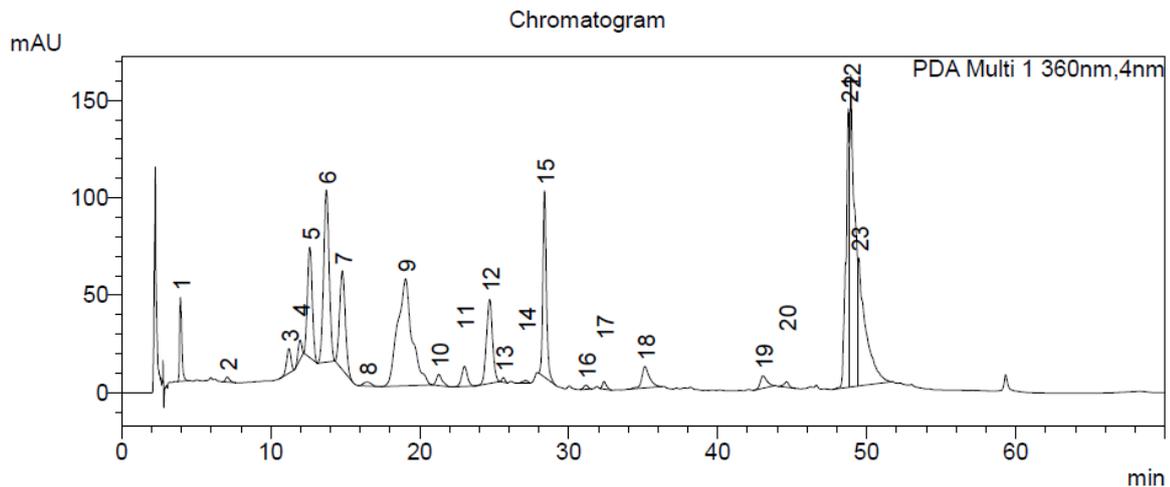
De acordo com o método desenvolvido por Apáti (2002) e validado por Oliveira e colaboradores (2017b), foi possível identificar a presença de ácido clorogênico, quercetina, e seus derivados. Dentre eles, foram encontrados os flavonoides isoquercitrina, quercitrina, afzelina, além de uma substância desconhecida na literatura, para a metodologia desenvolvida, cujo espectro de UV coincide com o da quercetina, podendo ser um flavonoide derivado desta (Figura 12 e 11; Tabela 2). É possível ainda, observar alguns sinais (21, 22 e 23) que não puderam ser identificados por falta de substâncias padrão e parâmetros de comparação na literatura, sendo assim necessário, realizar o isolamento para uma posterior identificação (Figura 12).

Figura 11 - CLAE-UV-DAD da fração diclorometânica de *Solidago chilensis* para a caracterização de terpenos



Legenda: CLAE-UV-DAD da fração diclorometânica de *Solidago chilensis* para a caracterização de terpenos. Condições cromatográficas: Temperatura = 30° C. vazão = 1.0 mL min⁻¹. λ = 254 nm. V_{inj} = 10 μ L. sistema de eluição isocrático; ácido trifluoracético 0.05% (54.94 mL) e acetonitrila (27.06 mL). Fonte: BRITO, 2018.

Figura 12: CLAE-UV- DAD da fração diclorometânica de *Solidago chilensis* para a caracterização de flavonoides



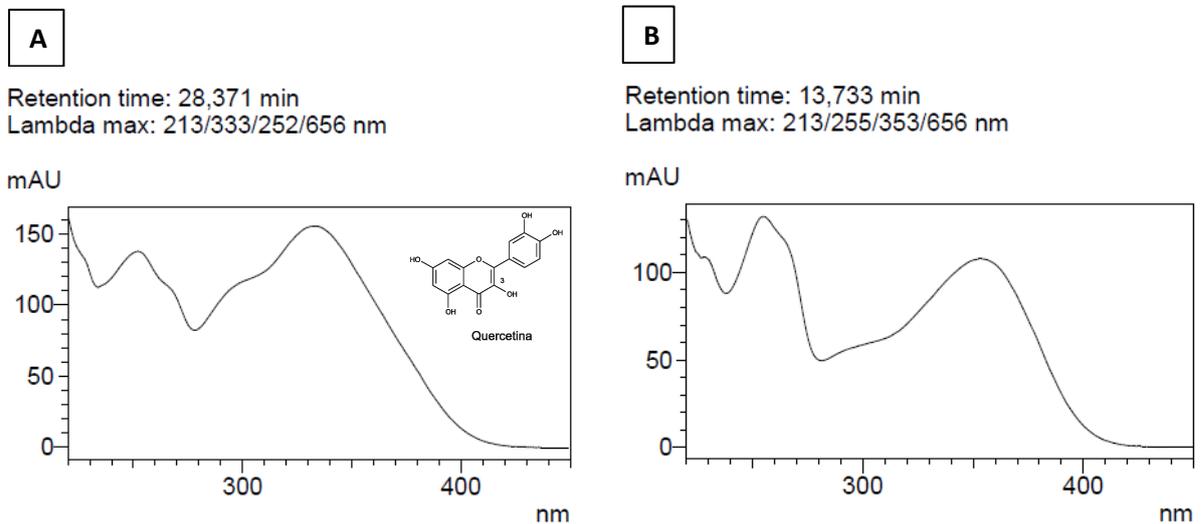
Legenda: CLAE-UV- DAD da fração diclorometânica de *Solidago chilensis* para a caracterização de flavonoides. Condições cromatográficas: Temperatura = 25° C. vazão = 1.0 mL min⁻¹. λ = 360 nm. V_{inj} = 10 μ L. Gradiente linear de eluição; acetonitrila (eluyente A) e ácido acético: água (1:40) (eluyente B). Nos 15 primeiros min usou-se 14% do eluyente A e 84% do eluyente B. 35% do eluyente A nos 30 min seguintes. e 100 % do eluyente A nos 2 últimos minutos. Fonte: BRITO, 2018.

Tabela 2 - Flavonoides e ácido clorogênico caracterizados por CLAE-UV-PDA na fração diclorometânica de *S. chilensis*.

Sinal	Rt (min)	Área %	Constituinte
1	3,94	2,1	Ác. Clorogênico
4	11,98	0,8	Isoquercitrina
6	13,73	10,4	—
8	16,45	0,4	Quercitrina
9	19,05	17	Afzelina
15	28,37	7,2	Quercetina

Fonte: BRITO, 2018.

Figura 13: Espectro UV da quecetina e do flavonoide não identificado.

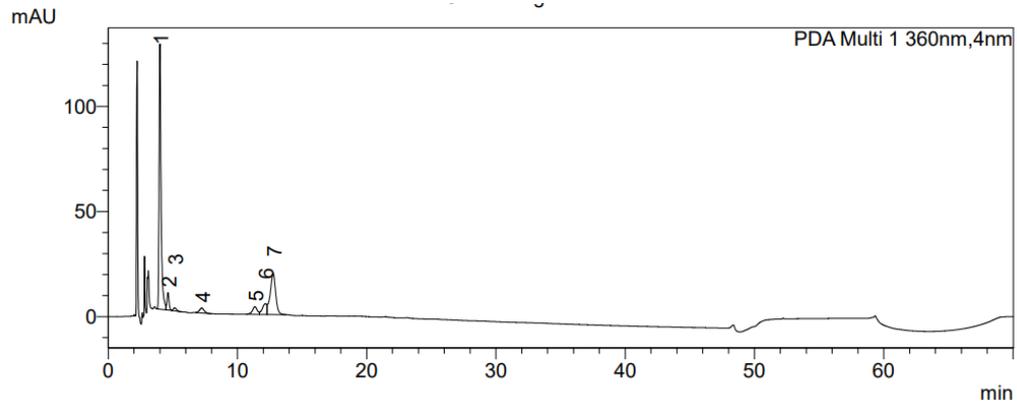


Legenda: Espectro UV da quecetina (A) e do flavonoide não identificado (B) no tempo de retenção 13.73 min. absorvidos a 360 nm. Fonte: BRITO, 2018.

5.6.4 Fração Aquosa

Por ter modulado a migração leucocitária total e de células polimorfonucleares, em lavado pleural de animais desafiados com LPS, e ainda ter sido capaz de inibir a produção de alguns mediadores inflamatórios avaliados nesse trabalho, a fração aquosa teve seus constituintes avaliados pelo método de CLAE-UV-DAD. Foi possível caracterizar, o tempo de retenção, a absorbância em 360 nm, e fazendo comparações com a literatura (APÁTI et al, 2002; OLIVEIRA et al, 2017b), a presença de ácido clorogênico, como majoritário (58,2% de área), e isoquercitrina. É possível ainda, observar um sinal (7) de área 25,1% que não pode ser identificado por falta de substância padrão e parâmetros de comparação na literatura, sendo assim necessário, realizar o isolamento para posterior identificação (Figura 14; Tabela 3).

Figura 14: CLAE-UV-DAD da fração aquosa de *Solidago chilensis* para a caracterização de flavonoide



Legenda: CLAE-UV-DAD da fração aquosa de *Solidago chilensis* para a caracterização de flavonoide. Condições cromatográficas: Temperatura = 25^o C. vazão = 1.0 mL min⁻¹. λ = 360 nm. V_{inj} = 10 μ L. Gradiente linear de eluição; acetonitrila (eluyente A) e ácido acético: água (1:40) (eluyente B). Nos 15 primeiros min usou-se 14% do eluyente A e 84% do eluyente B. 35% do eluyente A nos 30 min seguintes. e 100 % do eluyente A nos 2 últimos minutos. Fonte: BRITO, 2018.

Tabela 3 - Fitoconstituintes caracterizados por CLAE-UV- DAD na fração aquosa de *S. chilensis*.

Sinal	Rt (min)	Área %	Constituinte
1	4,00	58,2	Ác. clorogênico
5	4,1	4,1	Isoquercitrina
7	12,76	25,1	—

Fonte: BRITO, 2018.

6 DISCUSSÃO

Há muito se utilizam diversas e variadas preparações a base de plantas como medidas curativas, paliativas e para tratamentos de inúmeras patologias na medicina tradicional popular (AGUIAR, 2014). A *Solidago chilensis*, é uma espécie vegetal utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento, principalmente de patologias de cunho inflamatório, mas com poucas comprovações científicas associando seu efeito terapêutico com os metabólitos presentes (VALVERDE; AZEVEDO, TOMASSINI, 2009; OLIVEIRA, et al 2017a). Com intuito de elucidar a propriedade farmacológica desta planta, este estudo avaliou parâmetros de atividade anti-inflamatória do extrato bruto e de diferentes frações (hexânica, diclorometânica, acetálica, butanólica e aquosa), provenientes das inflorescências de *S. chilensis*, relacionando com os constituintes fitoquímicos encontrados.

Embora a literatura já tenha descrito doses eficazes para a atividade anti-inflamatória de extratos da *Solidago chilensis* em modelos de experimentação animal, esses estudos se basearam em extrações realizadas a partir de rizomas ou de partes aéreas, ou do extrato aquoso de inflorescências (GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008; TAMURA et al, 2009), o que diverge da proposta deste trabalho, onde foram utilizadas apenas as inflorescências em extração com solventes de polaridades diferentes.

A fim de determinar a dose de trabalho para o modelo in vivo, foi realizado um ensaio de dose-resposta no modelo experimental de pleurisia com indução por LPS. Avaliou-se o parâmetro de recrutamento celular de leucócitos totais e de populações de células polimorfonucleares na cavidade pleural de camundongos previamente tratados com dexametasona ou com cinco doses diferentes do extrato bruto (EB) éter-etanólico de inflorescências de *S. chilensis*, administrados por via i.p., uma vez que já foi demonstrado uma possível metabolização de primeira passagem que inviabiliza a ação farmacológica desta planta por via oral (TAMURA et al, 2009).

Das cinco doses testadas, a partir da 0,1 mg/kg foi observada a modulação de leucócitos totais e de populações de neutrófilos e eosinófilos. A partir disso, foi escolhida a dose de 10 mg/kg por ter sido eficiente no modelo proposto, além de estar de acordo com os resultados encontrados por Goulart e colaboradores (2007), que utilizaram o extrato aquoso de *S. chilensis* (10 mg/kg) em um modelo experimental parecido.

Ao determinar a dose de 10 mg/kg, foram testadas todas as frações obtidas da inflorescência, afim de realizar uma comparação da atividade farmacológica destas. Embora todas as frações, assim como o EB, tenham modulado o infiltrado leucocitário, a fração acetálica não foi capaz de reduzir a infiltração da população de células polimorfonucleares, assim como a fração butanólica não foi capaz de inibir a migração de eosinófilos. O fato de algumas frações não apresentarem o mesmo efeito farmacológico que o EB, em todos os parâmetros in vivo analisados, pode ser explicado pelo fato de que os fitocomponentes responsáveis pelos efeitos encontrados no extrato bruto foram separados de acordo com a afinidade dos metabólitos secundários a partir dos solventes utilizados (devido a polaridade), ou pela perda do efeito sinérgico entre essas substâncias durante a partição líquido-líquido (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A mobilização de leucócitos para o tecido com injúria é bastante importante para sistema resolutivo. Mas caso essa mobilização se intensifique, a inflamação pode lesar células do tecido ao redor (SABROE et al, 2005). Como já é conhecida a importância das interações entre leucócitos e as células do endotélio vascular para a migração dos mesmos, as substâncias envolvidas no processo de ativação, rolamento e aderências destas células ao endotélio, têm sido exaustivamente estudadas como alvos farmacológicos (SABROE et al, 2005; LEY et al, 2007). No intuito de aprofundar o entendimento do(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) o extrato bruto, e as frações hexânica, diclorometânica e aquosa de *S. chilensis* foram capazes de modular o infiltrado leucocitário na pleura dos animais estimulados com LPS, alguns mediadores inflamatórios foram dosados: TNF- α , KC, MIP-2, e eotaxina-1, no sobrenadante dos lavados pleurais através do método de ELISA sanduíche.

O TNF- α é responsável pelo aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, permitindo a migração de leucócitos para o sítio da inflamação. Essa citocina é um potente ativador de neutrófilo, mediando quimiotaxia, aderência, degranulação e “burst” respiratório, sendo produzida não só por linfócitos, macrófagos e neutrófilos ativos, mas também por células do endotélio vascular, células natural killer e mastócitos (BORISH; STEINKE, 2003). Os dados apresentados neste trabalho mostram que o EB e as três frações testadas de *S. chilensis*, reduziram significativamente os valores de TNF- α , no lavado dos animais previamente tratados ao estímulo com LPS. Já foi visto que a espécie em estudo possui a capacidade de modular os níveis de TNF- α , bem como a inibição da citocina IL-1 β em modelos de

experimentação em camundongos, com extratos provenientes dos rizomas (GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008). Sugere-se que a modulação associada do TNF- α com a IL-1 β , atribui um mecanismo anti-inflamatório via inibição da produção de moléculas de adesão, e da liberação de citocinas específicas no recrutamento celular, como quimiocinas da família C-X-C (RUTH et al, 2005; GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008).

Os neutrófilos são células efetoras essenciais do sistema imune, sendo considerados a “primeira linha” de defesa contra infecções provenientes de fungos e bactérias. Essas células, porém, podem contribuir para danos teciduais em doenças de processos agudos, como injúria pulmonar aguda, e em fases de agudização de doenças crônicas como a artrite reumatóide. O potencial destrutivo dos neutrófilos depende diretamente do controle de seu recrutamento para os tecidos (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). As quimiocinas KC e MIP-2 são potentes quimioatraentes e ativadoras de neutrófilos, sendo conhecidas por ter um papel crucial na migração destas células dos vasos sanguíneos para os sítios de inflamação (DAY; LINK, 2012). Diante disso, este trabalho investigou se as frações que modularam a migração leucocitária teriam efeito direto sobre o recrutamento de neutrófilo, interferindo na produção de KC ou MIP-2.

De acordo com Filippo e colaboradores (2017) as quimiocinas KC E MIP-2 são produzidas pela ativação de Toll-like receptores (TLRs), principalmente em macrófagos residentes no tecido, mas com uma pequena diferença nas vias de sinalização envolvidas. Ambas as proteínas são produzidas via MyD88, mas MIP-2, também é sintetizado via TRIF. Neste trabalho, foi observada a redução de MIP-2 no EB e em todas as frações testadas, quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento. Porém a fração hexânica, foi a única que modulou a produção de KC. Esse resultado leva a crer, que a fração hexânica seja a única capaz de interferir no recrutamento de neutrófilos pela via MyD88. Já é conhecido, que a infiltração máxima de neutrófilos ocorre quando ambas as quimiocinas estão concomitantemente expressas, e que a inibição de ambas, previne o recrutamento leucocitário (FILIPPO et al, 2017). Sendo assim, a fração hexânica teria o melhor efeito anti-quimiotático de neutrófilos, dentre todas as frações estudadas.

Os eosinófilos são leucócitos de múltipla funcionalidade, atuando na patogênese de inúmeros processos inflamatórios, sendo mais proeminentes nos processos alérgicos e em infecções por helmintos (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Dentre as muitas moléculas envolvidas na quimiotaxia dessa população celular, a eotaxina-1, secretada principalmente por células do epitélio brônquico, células endoteliais, e o próprio eosinófilo, atua como um potente quimioatrante, sendo ela apenas, o suficiente para um recrutamento local eosinofílico (WU et al, 2014; PALOMINO, MARTI, 2015). A inibição de populações eosinofílicas nos lavados de animais tratados com algumas frações específicas (EB e frações hexânica, diclorometânica e aquosa, esta última em menor quantidade) foi um dado inédito deste estudo, visto que os modelos experimentais adotados em outros estudos envolveram a estimulação do processo inflamatório via carragenina, substância que gera infiltrado inflamatório de polimorfonucleares com a presença exclusiva de neutrófilos. Diante disso, estes grupos foram avaliados quanto a modulação dos níveis de eotaxina-1. A modulação da eotaxina-1 foi possível em grupos de camundongos previamente tratados com o EB e as frações hexânica e diclorometânica, indicando que a *S. chilensis* talvez venha a ter uma atividade antialérgica, que não foi anteriormente estudada, mas que não é incomum a família das Asteraceae (OLIVEIRA et al, 2017a; CHANDRASHEKHAR et al, 2011). Embora a fração aquosa tenha sido eficaz ao modular a migração de eosinófilos, os níveis de eotaxina-1 não obtiveram redução com relevância estatística, sendo assim, necessária a investigação de outras vias de modulação, como por exemplo, a presença de leucotrieno B4.

Além dos resultados aqui encontrados, e os disponibilizados na literatura a respeito dos efeitos e mecanismos anti-inflamatórios da *S. chilensis*, investigou-se in vitro a atividade anti-inflamatória da espécie em estudo. Primeiramente, foi realizado um ensaio de viabilidade celular, em linhagem de macrófagos murinos J774A.1, afim de descartar resultados falso negativos, caso a viabilidade celular fosse comprometida pela toxicidade do EB ou das frações, levando então a uma baixa produção de NO, e desta forma sendo erroneamente interpretado como um efeito anti-inflamatório.

Com exceção da fração aquosa, que manteve um perfil de viabilidade celular superior a 80% em todas as concentrações testadas, as demais frações, assim como o EB, apresentaram alta toxicidade nas doses de 100 e 200 µg/mL, com quase 100% de morte celular. A fração diclorometânica foi a única que na concentração de 50 µg/mL inviabilizou mais da metade da população de células, mostrando-se razoavelmente tóxica. No intuito de utilizar células previamente tratadas com as frações de *S. chilensis*, que mantivessem um perfil de viabilidade celular igual ou superior a 70%, foi escolhida a concentração de 10 µg/mL como concentração máxima

de trabalho. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser associados aos achados de Barros e colaboradores (2016), onde a concentração de 10 µg/mL do extrato metanólico das folhas de *S. chilensis*, não apresentou efeito citotóxico em linhagem de fibroblastos murinos L929 (BARROS et al, 2016).

Podendo ser produzido por células do endotélio vascular, da musculatura lisa, monócitos, mastócitos e macrófagos, quando estimulados por citocinas (IL-1β e TNF-α) ou produtos bacterianos (LPS), o NO é uma molécula importante no sistema de defesa, agindo como vasodilatador e agente citotóxico mediado por macrófagos em processos infecciosos (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; JO et al, 2008). Por ser uma molécula instável, a dosagem de NO é feita indiretamente através da quantificação do seu metabólito nitrito. Embora a literatura já tenha descrito a capacidade da *S. chilensis* em modular o NO, este trabalho analisou essa modulação *in vitro* utilizando uma linhagem de macrófago murinos tratados com EB e frações obtidas de inflorescências (GOULART et al, 2007; LIZ et al, 2008). Assim como o ensaio *in vivo*, para o ensaio *in vitro* de quantificação de NO foi construída uma curva dose-resposta com extrato éter-etanólico utilizando a linhagem J774A.1 e respeitando a concentração máxima de 10 µg/mL previamente estipulada. A menor concentração testada (0,01 µg/mL) não apresentou efeito significativo, enquanto as concentrações intermediárias (0,1 e 1 µg/mL), assim como a concentração de 10 µg/mL, apresentaram redução estatisticamente significativa sem discrepantes diferenças entre si. Assim, foi determinada a concentração de 10 µg/mL para realização do ensaio com as frações hexânica, diclorometânica e aquosa, por ser uma concentração de trabalho viável. Os dados apresentados mostraram que apenas o pré-tratamento com a fração aquosa não inibiu a produção de NO, enquanto o EB, fração hexânica e diclorometânica inibiram. Destaca-se o efeito acentuado em que a fração diclorometânica inibiu a produção de NO.

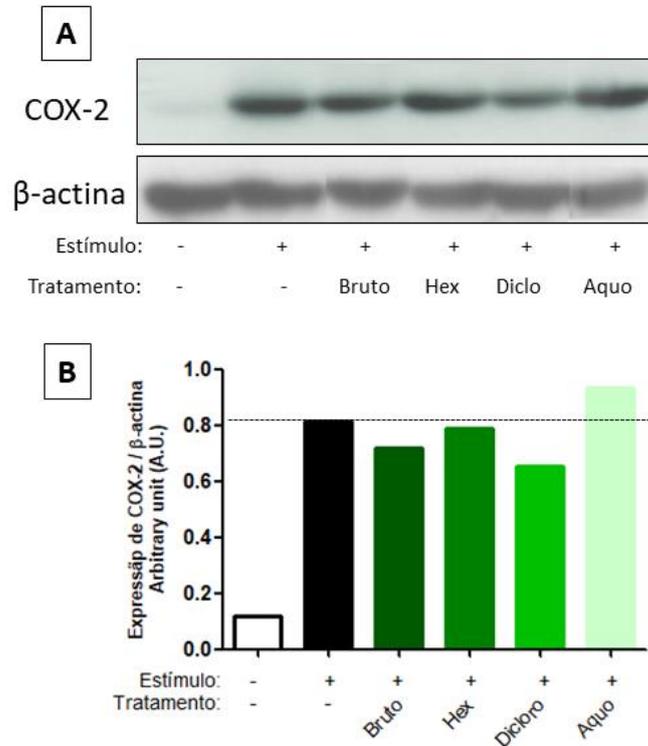
A COX-2 é uma enzima produzida por células residentes envolvidas no processo inflamatório (macrófagos, mastócitos e outras), e é responsável pela síntese de prostaglandinas e tromboxanos, mediante estímulo com IL-1β, TNF-α, endotoxinas e outros. Algumas prostaglandinas são potentes vasodiladoras e reguladoras da atividade quimiotática celular, controlando a adesão de células no endotélio vascular (CARVALHO; CARVALHO; SANTOS, 2004). Outro ineditismo deste trabalho foi investigar se a espécie vegetal *Solidago chilensis* teria a capacidade de modular os níveis de COX-2. Células da linhagem de macrófagos murinos J774A.1, estimuladas

com LPS por 24h, e previamente tratadas com EB e as frações hexânica, diclorometânica e aquosa (10 µg/mL) de *S. chilensis*, foram submetidas ao processo de extração de proteínas para posterior quantificação intracitoplasmática de COX-2, através do método de Western blot. Pode ser observada na figura 15, uma tendência na redução da expressão da enzima COX-2 nas células que foram tratadas com o EB e as frações hexânica e diclorometânica.

A redução da expressão de COX-2 leva a crer que existe alguma atividade de inibição por via gênica, onde a proteína não está sendo sintetizada (YO et al 2016). Mas isso não descarta o fato de que o EB e as frações, até mesmo a aquosa que não apresentou indicativo na redução da expressão, não possam estar inibindo a funcionalidade da enzima, como ocorre no caso do anti-inflamatório não estereoidais, como a aspirina, ou algum seletivo para a COX-2 como o celecoxibe (CARVALHO; CARVALHO; SANTOS, 2004). Este é um dado preliminar que requer novos ensaios para a obtenção de resultados mais conclusivos, mas em face de todos os dados apresentados, pode-se sugerir que grande parte da atividade farmacológica se encontra em fitocomponentes presentes na fração diclorometânica, com principal efeito no nível molecular da expressão da COX-2.

A fim de identificar as substâncias que poderiam estar envolvidas nos resultados farmacológicos encontrados neste trabalho, o EB e as frações hexânica, diclorometânica e aquosa foram submetidas a análises cromatográficas para a investigação de fitoconstituintes. A análise por CLAE-UV-DAD mostrou que tanto o EB quanto a fração diclorometânica são constituídos por uma grande quantidade de flavonoides derivados da quercetina e do kaempferol, entre agliconas e glicosídeos, uma vez que a absorbância observada em UV é característica apenas da aglicona. Quanto à fração aquosa, na mesma metodologia, foi identificada a presença do flavonoide isoquercitrina e uma grande quantidade de ácido clorogênico.

Figura 15 – Efeito da *S. chilensis* na produção de COX-2 após estimulação com LPS.



Legenda: Efeito da *S. chilensis* na produção de COX-2 após estimulação com LPS. Os níveis da proteína COX-2 foram determinados em extratos de macrófagos murinhos J744A.1 previamente tratados com EB e frações hexânica, diclorometânica e aquosa (10 μ g/mL) e estimulados com LPS por 24h a 37° C e 5% CO₂. A análise densitométrica é mostrada (B). Estes resultados são representativos de um único experimento. Fonte: BRITO. 2018.

Embora as substâncias majoritárias não tenham sido totalmente identificadas a maioria possui a quercetina como esqueleto flavonoídico com forte atividade antioxidante ali representada, e já bem descrita na literatura (KUMAR; PANDEY, 2013). Essa capacidade antioxidante dos flavonoides poderia explicar a modulação dos níveis de NO encontrados no EB, e na fração diclorometânica. Barros e colaboradores (2016) demonstraram o potencial antioxidante da quercitrina e da afzelina isolada de *S. chilensis* em ensaio com DPPH, assim como também já foi visto a capacidade do flavonoide quercitrina galato (derivado da quercetina) em modular os níveis de NO através da inibição da produção, em nível de transcrição gênica, da enzima responsável pela sua síntese (iNOS) em linhagem de macrófagos RAW 264.7 (KIM et al, 2005).

Rao-Manjeet e Ghosh (1999) demonstraram o potencial da quercetina em modular os níveis de TNF- α em linhagem de macrófagos RAW 264.7, indo de acordo

com os achados deste estudo no EB e na fração diclorometânica. A quercetina já é descrita por possuir atividade anti-inflamatória através da redução de leucotrieno B₄, prostaglandina E₂ (PGE₂), das quimiocinas KC, MIP-2, RANTES e CXCL8, todos com propriedades quimioatraentes de leucócitos (MORIKAWA, et al 2003; SOUTO et al 2011; KUMAR; PANDEY 2013). Parte dessa atividade é atribuída a capacidade da quercetina em inibir a formação do complexo de transcrição NF-κB, e de interromper a sinalização entre TLR4 e MyD88 (ENDALE, et al, 2013). O ácido clorogênico, encontrado em grandes quantidades na fração aquosa, também possui atividade anti-inflamatória atribuída a capacidade de suprimir a produção de NO, iNOS, PGE₂, através também do bloqueio de NF-κB (HWANG, et al, 2014; CHEN; WU, 2014).

O diterpeno labdânico solidagenona, é descrito como constituinte principal dos rizomas de *S. chilensis*, e a ele já foi atribuído alguns efeitos farmacológicos como antiulceroso, gastroprotetor e imunomodulador (VALVERDE; AZEVEDO; TOMASSINI, 2009; RODRIGUEZ et al, 2005). Utilizando a metodologia validada por Valverde e colaboradores (2009) para a identificação, principalmente, de grupamentos cetônico ou lactônico através de CLAE-UV-DAD, foi investigado a presença de solidagenona no EB e na fração diclorometânica. O resultado apresentado para o EB converge com o da literatura, onde o extrato éter-etanólico das inflorescências apresentaram uma área de 20,8%, utilizando a mesma metodologia (tempo de retenção 71,6 min em 225 nm) (VALVERDE; AZEVEDO; TOMASSINI, 2009). Quanto à fração diclorometânica, o resultado foi negativo para a presença de solidagenona.

Já na fração hexânica, além da grande quantidade de substância graxa encontrada, características das ceras encontradas nas superfícies de flores, foi identificada através de CG-EM, a presença de solidagenona, acetato de exabornila e guaieno. A literatura descreve pouco sobre as atividades farmacológicas destas substâncias. O acetato de bornila foi descrito por possuir atividade analgésica e anti-inflamatória (WU et al 2004), mas não é garantido de que a baixa porcentagem desta substância na fração estudada seja responsável pela atividade farmacológica observada neste trabalho. O mesmo acontece com a solidagenona.

De acordo com o observado neste estudo, a quercetina e seus derivados seriam ótimos biomarcadores de atividade anti-inflamatória para os extratos provenientes das inflorescências de *Solidago chilensis*. Ela foi encontrada no extrato bruto e na fração diclorometânica em boas proporções (39,1 e 35,8, respectivamente), e já é bem descrita na literatura suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante

(KUMAR; PANDEY, 2013; ENDALE et al, 2013). Embora a fração hexânica tenha apresentado bons resultados nos ensaios imunofarmacológicos (Quadro 2 e 3), novas análises para investigação de fitoconstituintes devem ser realizadas para melhorar o entendimento a respeito de seus efeitos. A solidagenona, apesar de ter sido encontrada em boas proporções no extrato bruto, necessita de novos estudos mais aprofundados e de forma isolada acerca de suas atividades farmacológicas, pois é um metabólito pouco investigado na literatura, sendo um possível alvo de futuros estudos.

Quadro 2 – Compilado de resultados avaliando parâmetros de atividade anti-inflamatória em modelo de experimentação *in vivo*

<i>in vivo</i>	Leucócitos (totais)	Neutrófilos	Eosinófilos	Proteínas (totais)	TNF- α	KC	MIP-2	Eotaxina-1
EB	+	+	+	+	+	-	+	+
FH	+	+	+	+	+	+	+	+
FD	+	+	+	+	+	-	+	+
FA	+	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
FB	+	+	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
FAQ	+	+	+	+	+	-	+	-

Legenda: Compilado de resultados avaliando parâmetros de atividade anti-inflamatória em modelo de experimentação *in vivo* com camundongos Swiss Webster pré-tratados com extrado bruto (EB). e frações: hexânica (FH). diclorometânica (FD). acetálica (FA). butanólica (FB) e aquosa (FAQ) de *S. chilensis* (10 mg/kg). + indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre grupo tratado e não tratado (ocorreu redução nos parâmetros). - indica que não ocorreu diferença estatística. n.a. - não avaliado. Fonte: BRITO, 2018.

Quadro 3 – Compilado de resultados avaliando parâmetros de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade em modelo de experimentação *in vitro*.

<i>in vitro</i> (toxicidade)	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	<i>in vitro</i> (NO)	10 $\mu\text{g/mL}$
EB	----	----	----	▲	▲	EB	+
FH	----	----	----	▲	▲	FH	+
FD	----	----	▲	▲	▲	FD	+
FA	----	----	----	▲	▲	FA	n.a.
FB	----	----	----	▲	▲	FB	n.a.
FAQ	----	----	----	----	----	FAQ	-

Legenda: Compilado de resultados avaliando parâmetros de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade em modelo de experimentação *in vitro* com células de linhagem J774A.1 pré-tratadas com extrado bruto (EB). e frações: hexânica (FH). diclorometânica (FD). acetálica (FA). butanólica (FB) e aquosa (FAQ) de *S. chilensis*. ▲ indica morte celular acima de 30%. ---- indica viabilidade celular a partir de 70%. + indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre grupo tratado e não tratado (ocorreu redução nos parâmetros). - indica que não ocorreu diferença estatística. n.a. - não avaliado. Fonte: BRITO, 2018.

7 CONCLUSÃO

O extrato bruto e as diferentes frações obtidas do extrato éter-etanólico das inflorescências de *Solidago chilensis* apresentaram efeito anti-inflamatório diferenciado nas metodologias propostas para avaliação de parâmetros in vivo e in vitro. E após a investigação fitoquímica, conclui-se que a quercetina (e seus derivados) poderiam ser utilizados como biomarcadores para o controle de qualidade da atividade anti-inflamatória da espécie. Mais estudos devem ser realizados para melhorar o entendimento acerca do mecanismo de ação da propriedade anti-inflamatória de *S. chilensis*, assim como para confirmar, e posteriormente explorar, um possível efeito antialérgico visto neste trabalho, e que não havia sido relatado na literatura.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. L. N. **Contribuição para a avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos no Brasil**. 2014. 213f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

ALONSO. J. **Tratados de fitofármacos y nutraceuticos**. Rosario, Argentina: Corpus Libros, 2004.

APÁTI, P. et al. HPL Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparation from Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis*). **Chromatographia Supplement**, v. 56. p.S65-S68, 2002.

ASSINI, F. L.; FABRÍCIO, E. J.; LANG, K. L. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.130-134, 2013.

BAGATINE, M. D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.632-636, 2009.

BARROS, M. et al. Pharmacological reports about gastroprotective effects of methanolic extract from leaves of *Solidago chilensis* (Brazilian arnica) and its components quercitrin and afzelin in rodents. **Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.389, p.403-4017, 2016.

BORISH, L. C.; STENKI, J. W. Cytokines e and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.11, n.2, p.S460-S475, 2003

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 maio 2014a. Seção 1, p. 52 a 61.

_____. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares – PMNPC**: resumo executivo. Brasília, 2005.

_____. **Relação de Fitoterápicos Oferecidos pelo SUS**. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples/relacao-de-fitoterapicos-oferecidos-pelo-sus/view>>. Acesso em: 05 de jan. 2018.

_____. **Plantas de Interesse ao SUS - RENISUS**. Portal de Saúde SUS. 2014b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 18 de ago. 2017.

_____. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. 2016a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_mediciniais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 22 de ago. 2017.

_____. **Uso de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos Sobe 161%**. Portal Brasil, 2016b. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-mediciniais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em 03 de jan.2018.

BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.2, p.195-202, 2006.

BUCCIARELLI, A. et al. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**. v.48. n.9. p. 1025-1030. 2010.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; SANTOS, F. R. Analgésico inibidores específicos da ciclooxigenase 2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, n.3, p. 448-464, 2004.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.

CHANDRASHEKHAR, V. M. et al. Anti-allergic activity of German chamomile (*Matricaria recutita* L.) in mast cell mediated allergy model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.336-340, 2011.

CHEN, W. P.; WU, L. D. Chlorogenic acid suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory mediators in human chondrocytes. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.7, n.12, p.8797-8801, 2014.

CORREA, L. B. et al. Anti-inflammatory effect of methyl gallate on experimental arthritis: inhibition of neutrophil recruitment, production of inflammatory mediators, and activation of macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 79, p.A-M, 2016.

DAY, R. B.; LINK, D. C. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.69, p.1415-1423, 2012.

DEQUIANG, L. et al. Anticancer Activity and Chemical Composition of Leaf Essential Oil from *Solidago canadensis* L. in China **Advanced Materials Research**, v.347-353, p.1584-1589, 2011.

DERDA, M.; HADAS, E.; THIEM, B. Plant extracts as natural amoebicidal agents. **Parasitology Research**, v.104, n.3, p.705-708, 2009.

DIGEST, R. Segredos e virtudes das plantas medicinais. **Reader's Digest**, São Paulo, SP, 2001.

ENDALE, M. et al. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association. and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B - induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. **Immunobiology**, v.218, n.12, p.1452-1467, 2013.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v.2, p.12-26, 1997.

FILIPPO, K. et al. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct tlr signaling pathways. **The Journal of Immunology**, v.180, p.4308-4315, 2017.

GASTALD, B. et al. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), a medicinal plant from South America, A comprehensive review: ethnomedicinal uses. phytochemistry and bioactivity. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.17, n.1, p.17-29, 2018.

GREEN, L.C. et al. Analyses of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GOULART, S. et al. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n. 2, p. 346-53, 2007.

HWANG, S. J. et al. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v.63. p.81-90, 2014.

JO, H. et al. The inhibitory effect of quercitrin gallate on iNOS expression. Induced by lipopolysaccharide in Balb/c mice. **Journal of Veterinary Science**, v.9, n.3, p. 267-272, 2008.

JUNIOR, W. A. R. et al. Hypolipidemic effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract and its major isolates constituent quercetrin in cholesterol-fed rats. **Pharmaceutical Biology**, v.1, n.8, p.1-8, 2015.

KANIMOZHI, S.; BHAVANI, P.; SUBRAMANIAN, P. Influence of the flavonoid, quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and histopathological changes in hyperammonemic rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.32, n.3, p.275-284, 2016.

KIM, B. H. et al. Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor-kB-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p.1577-1583, 2005.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-16, 2013.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v.7, p.678-689, 2007.

LIZ, R. et al. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal of pharmacy and Pharmacology**, v.60, p.515-521, 2008.

LIZ, R. et al. Evaluation of antimicrobial and antiplatelet aggregation effects of *Solidago chilensis* Meyen. **International Journal of Green Pharmacy**, p.35-39, 2009.

LOBLER, L. **Propagação do metabolismo secundário e genotoxicidade de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae)**. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado em agrobiologia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

MELO, A. M. et al. *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract reduces JNK/I κ B pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Experimental Biology and Medicine**, v.236, p. 1147-1155, 2011.

MORIKAWA, K. et al. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, v.74, p.709–721, 2003.

OLIVEIRA, T. B. de. et al. *Solidago* medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.19, n.2, p.304-310, 2017a.

OLIVEIRA, T. B. de. et al. Caracterização de flavonoides por CLAE-UV-PDA em tintura de inflorescência de *Solidago chilensis* Meyen cultivada em Itaipava. **Revista Fitos**, Supl 1- 126, p. 17-25, 2017b.

OSHIRO. M. C. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Visa Em Debate**, v.4, n.4, p.116-122, 2016.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e Imunidade. **Einstein (São Paulo)**, v.13, n.3, p.469-473, 2015.

PAULA-FREIRE, L. I. G. et al. Evaluation of the acute toxicity of the hydroalcoholic extract of *Solidago chilensis* Meyen (Arnica Do Campo) in Mice. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v.2, n.2, p.217-228, 2014.

PARK, S. M. et al. Combination of *Pelargonium sidoides* and *Coptis chinensis* root inhibits nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, n.20, p.1-13, 2018.

PENIDO, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, v.55, p.457–464, 2006.

- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.
- RAO-MANJEET, K.; GHOSH. B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. **International Journal of Immunopharmacology**, v.21, p.435-443, 1999.
- REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.35, n.5, p.523-534, 2002.
- RODRIGUEZ, J. A. et al. Gastroprotective and ulcer-healing effect of new solidagenone derivastives in human cell cultures. **Life Sciences**, v.77, p.2193-2205, 2005.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN. S. P. The Eosinophil. **Annual Review Immunology**, v.24, p.147-174, 2006.
- RUTH, J. H. et al. Accelerated development of arthritis in mice lacking endothelial selectins **Arthritis Research & Therapy**, v.7, n.5, p.R959-R970., 2005.
- SABIR, S. M. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compound. **Food Chemistry**, v.131, p.741-747, 2012.
- SABROE, I. et al. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. **Immunology**, v.115, p.90-98, 2005.
- SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v.32, n.10, p.452-460, 2011.
- SILVA, A.G. da et al. Evaluation of an extract of Brazilian Arnica (*Solidago chilensis Meyen*) in treating Lumbago. **Phytotherapy Research**, v.24, p. 283-287, 2010.
- SILVA, A. G. et al. A Clinical Trial with Brazilian Arnica (*Solidago chilensis Meyen*) Glycolic Extract in the Treatment of Tendonitis of Flexor and Extensor Tendons of Wrist and Hand. **Phytotherapy Research**, v.29, p.864-869, 2015.

SILVA, M. **Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substância sobre formas taquizoítas de *Toxiplasma gondii* com a avaliação de triterpenos ácidos sobre o parasito**. 2009. 46f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

SOUTO, F. O. et al. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCL8, LTB4 and fMLP: inhibition of actin polymerization. **Journal of Natural Products**, v.74, p.113-118, 2011.

TAMURA, E. K. et al. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, n.3, p. 478-85, 2009.

TELES, A. M.; BORGES, R. A. X. ***Solidago* - lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005503>>. Acesso em: 05 set. 2017.

THIEM, B.; GOSLINSKA, O. Antimicrobial Activity of *Solidago virgaurea* L. from *in vitro* cultures. **Fitoterapia**, v.73, n.6, p. 514-516, 2002.

TORRES, L. M. B.; ROQUE, N. F.; AKISUE, M. K. Diterpenes from the roots of *Solidago microglossa*. **Revista Latinoamericana de Química**, v.20, n.2, p.94-97, 1989.

VAGO, J. P. et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.92, p.1-10, 2012.

VALVERDE, S. S.; AZEVEDO, R. C. S.; TOMASSINI, T. C. B. Utilização de CLAE como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.3, p.196-199, 2009.

VALVERDE, S. S.; OLIVEIRA, T. B.; SOUZA, S. P. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Fitos**, v.7, n.3, p.131-136, 2012.

VILA, R. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of *solidago chilensis*. **Planta Medica**, v.68, p.164-167, 2002.

WILLIAMS, R. B. et al. Diterpenes from the endangered goldenrod *Solidago shortii*. **Journal of Natural Products**, v.77, n.6, p.1438-44, 2014.

WORTHLEY, E. G.; SCHOTT, C. D.; HAUPTMANN, G. A. Toxicity of some goldenrods. **Economic Botany**, v.21, n.3, p.238-242, 1967.

WU, D. et al. CCL11 as a potential diagnostic marker for asthmas? **Journal of Asthma**, v.51, n.8, p.847-854, 2014.

WU, X. et al. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effect of bornyl acetate in volatile oil from *Amomum villosum*. **Zhong Yao Cai**, v.27, p. 438-439, 2004.

YO, Y. et al. DXXK exerts anti-inflammatory effects by inhibiting the lipopolysaccharide-induced NF- κ B/COX-2 signalling pathway and the expression of inflammatory mediators. **Journal of Ethnopharmacology**, v.178, p.199–208, 2016.