



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LAYANA DE SOUSA FERREIRA

**Estudo de estabilidade, análise *in silico* contra alvos da COVID-19 e avaliação da
atividade anti-inflamatória das bradyquinas extraídas das raízes de *Fridericia
platyphylla*.**

SÃO LUIS-MA

2025

LAYANA DE SOUSA FERREIRA

Estudo de estabilidade, análise *in silico* contra alvos da COVID-19 e avaliação da atividade anti-inflamatória das bradyquinas extraídas das raízes de *Fridericia platyphylla*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para a obtenção do título de Mestra em Química.

Orientadora: Profª Drª Cláudia Quintino da Rocha.

São Luís – MA

2025

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ferreira, Layana de Sousa.

Estudo de estabilidade, análise in silico contra alvos da COVID-19 e avaliação da atividade anti-inflamatória das bradydinas extraídas das raízes de *Fridericia platyphylla* / Layana de Sousa Ferreira. - 2025.

98 f.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2025.

1. Bradydinas. 2. Docagem Molecular. 3. Anti-inflamatória. 4. Lps. 5. Citocinas. I. da Rocha, Cláudia Quintino. II. Título.

LAYANA DE SOUSA FERREIRA

**Estudo de estabilidade, análise *in silico* contra alvos da COVID-19 e avaliação da
atividade anti-inflamatória das bradyquinas extraídas das raízes de *Fridericia
platyphylla*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Maranhão para
a obtenção do título de Mestra em Química.

Aprovada em: 28/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Cláudia Quintino da Rocha
(Orientadora – PPGQuim/UFMA)

Prof^ª Dr^ª Mayara Ingrid Sousa Lima
(Membro externo – PPGCS/ UFMA)

Prof. Dr. Cicero Wellington Brito Bezerra
(Membro interno - PPGQuim/UFMA)

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Layana de Sousa Ferreira

Naturalidade: São Luís – MA

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica

Bacharelado em Química (2017.1-2022.2)

Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus Universitário do Bacanga.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Resumos em congressos

FERREIRA, L.S.; ROCHA, C.Q. **Molécula isolada do extrato de *Fridericia platyphylla* com potencial anti-SARS-CoV-2 (COVID-19).** II Simpósio Nacional em Ciências da Saúde e I Simpósio de Animais de laboratório e Ciências da Saúde. 11 a 13 dezembro 2024, São Luís – Maranhão.

FERREIRA, L.S.; ROCHA, C.Q. **Molécula isolada do extrato de *Fridericia platyphylla* com potencial anti-SARS-CoV-2 (COVID-19).** XXVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e III Simpósio Farmácias Vivas do Brasil, 26 a 29 de novembro de 2024, Fortaleza – Ceará.

FERREIRA, L.S.; BRITO, J.A.R.; ROCHA, C.Q. **Molécula isolada do extrato de *Arrabidaea brachypoda* com potencial anti-SARS-CoV-2 (COVID-19).** 1º EPQuim UFMA-IFMA: Encontro de cooperação dos programas de pós-graduação em química, 12 a 15 de março 2024 São Luís – Maranhão.

*MARTINS, M.M.; LIMA, R.F.; SILVA, V.A.; SOUSA, L.; ROCHA, C.Q.; LIMA, J.A.; ANDRADE, M.S.; NASCIMENTO, M.D.S.B. **Efeitos antitumorais do extrato das folhas de *Arrabidaea brachypoda* em linhagens de câncer cervical humano relacionado ao HPV-16 e HPV-18.** V Workshop Internacional em Doenças Crônicas e Negligenciada, 25 a 27 set. 2023.

*(Menção Honrosa)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, saúde, proteção, força e coragem que Ele me concede todos os dias para lutar e realizar meus sonhos com fé e determinação.

Aos meus pais, Aldenir e Lucileia, que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra. Por sempre estarem ao meu lado, me apoiando com amor e suporte incondicional. Obrigada por me ensinarem desde cedo a importância do estudo, da dedicação e do esforço.

Ao amor da minha vida e companheira fiel, Pipoca, que esteve ao meu lado durante toda a escrita desse trabalho, seu amor incondicional e sua presença me trazem alegria e conforto todos os dias.

Ao meu amor, Rafael, por ser meu porto seguro, meu apoio emocional e minha calma no meio do caos. Agradeço por estar sempre ao meu lado, segurando minha mão nos momentos bons e, principalmente, nos difíceis. Seu cuidado e amor são inestimáveis. Obrigada por tanto.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cláudia Quintino, por sua paciência, orientação, ensinamentos e dedicação. Sua jornada e paixão pelos produtos naturais são uma fonte constante de inspiração. Agradeço profundamente por todo o apoio e incentivo ao longo do meu percurso.

Aos meus amigos de longa data, Kassia, David, Daniel, Rosane e Lomas, pela amizade verdadeira, pelo apoio constante e pela torcida. Agradeço pelos encontros que nos proporcionaram risadas até a barriga doer e momentos inesquecíveis de alegria.

As minhas amigas e parceiras do LQPN, Aglaete e Brendha, pelo suporte, torcida e pelos inúmeros momentos bons que compartilhamos. Agradeço por cada risada, abraço e palavra de incentivo.

A toda minha família, tia, madrinha, primos e sobrinho, pelo apoio e suporte constante. Agradeço por estarem presentes, oferecendo amor, encorajamento e força.

À família que me acolheu ao longo da vida: Dona Nairdes, Lena, Juninho, Josenildes, Napoleão, Natalia e Ingrid. Obrigada por tanto apoio, amor, por cada gesto de carinho, cada palavra de incentivo e momentos bons.

Ao Laboratório de Estudo de Inflamação Pulmonar da Universidade Federal de São Paulo, especialmente à Profa. Dra. Carla Prado, Juliana, Pablo, Stephanie e Vitória pelo acolhimento durante os meses em que estive com vocês, pela parceria nos experimentos, inúmeros conhecimentos compartilhados e a grande amizade, minha gratidão. Vocês foram fundamentais para o sucesso desse trabalho.

Ao Núcleo de Combustível, Catalise e Ambiental da Universidade Federal do Maranhão, especialmente à Profa. Rafaely e à Camila, pela valiosa ajuda nos experimentos de fotoestabilidade e, além disso, pela amizade.

A todos os laboratórios parceiros, pela colaboração nos experimentos e disponibilidade.

Ao programa de pós-graduação em Química, por proporcionar todas as experiências enriquecedoras durante este mestrado. Agradeço pelos recursos oferecidos e pelo ambiente acadêmico que contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao projeto Eletrotreat aprovado pela CAPES, pelo apoio financeiro, desde a bolsa de estudos até o auxílio moradia, que me permitiu a realização do estágio na UNIFESP. Esse suporte foi indispensável para a concretização deste trabalho e sou imensamente grata pela oportunidade.

*“Se você não gosta do seu destino, não o aceite.
Em vez disso, tenha a coragem de mudá-lo do jeito
que você quer que ele seja.”*

Naruto Uzumaki

RESUMO

A COVID-19 é uma infecção respiratória viral associada a complicações inflamatórias graves, como a lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Embora anti-inflamatórios sejam usados no tratamento, seus efeitos colaterais reforçam a busca por terapias alternativas mais seguras. Produtos naturais, como *Fridericia platyphylla*, tradicionalmente usada contra inflamações, destacam-se pelo potencial biofarmacológico. Além disso, a avaliação da estabilidade das moléculas bioativas é essencial para garantir sua eficácia terapêutica e segurança. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a estabilidade das brachydinas, isoladas da fração diclorometânica, avaliar o potencial *in silico* dessas substâncias frente ao SARS-CoV-2, e avaliar potencial anti-inflamatório em lesão pulmonar aguda da fração contendo as brachydinas. As brachydinas foram isoladas a partir da partição com diclorometano do extrato hidroetanólico das raízes de *F. platyphylla* e cromatografia em coluna, e identificadas por espectrometria de massas. Seu potencial anti-SARS-CoV-2 foi avaliado por docagem molecular com diferentes proteínas-alvo. A estabilidade foi investigada por termogravimetria, análise de gases evoluídos e fotoestabilidade. Em células A549, avaliou-se a citotoxicidade frente à fração diclorometânica (Fr. DCM). Em modelo celular e murino de LPA induzida por LPS, foi analisada a atividade anti-inflamatória da Fr. DCM, onde após 6 horas de instilação, fez-se o tratamento com duas doses de Fr. DCM e após 24 horas da instilação, foram coletados pulmões e fluido do lavado broncoalveolar para análises de células inflamatórias, citocinas e edema. A partir da espectrometria de massas, foram identificadas três brachydinas (BrA, BrB e BrC). A análise termogravimétrica indicou perfis distintos de degradação, com maior perda de massa para BrA na etapa 6 (21,94%) e para BrB e BrC na curva 2 (38,86% e 38,50%). As diferenças sugerem variações nos mecanismos de degradação. A energia de ativação (E_a) variou de 135,8 a 159,4 kJ/mol, com BrA apresentando o maior valor, possivelmente devido a interações por ligação de hidrogênio. BrC exibiu maior estabilidade estimada (4 a 5 anos). Em teste de fotoestabilidade, a Fr. DCM apresentou 32,8% de degradação em 14 h de exposição à luz, intensificada para 52,9% com TiO_2 . Na docagem molecular, BrC teve melhor afinidade com a proteína Spike e BrA com ECA2, sugerindo potencial para bloquear a entrada viral. Em células A549, a Fr. DCM manteve viabilidade celular de 85% na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, observando diferenças significativas apenas em doses a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$, sendo essas consideradas ideais para os ensaios subsequentes. Nessas mesmas concentrações, sob condição de inflamação induzida por LPS, a Fr. DCM só não foi significativa na dose de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou grande redução da viabilidade, principalmente em doses maiores de LPS. Em camundongos BALB/c Fr. DCM reduziu significativamente as células inflamatórias e citocinas no fLBA, obtendo resultados próximos ao grupo controle e dexametasona, o edema também foi reduzido pela Fr. DCM nas duas doses testadas. Esses resultados evidenciam o potencial de *F. platyphylla* como fonte de substâncias bioativas, com destaque para as brachydinas, que combinam estabilidade com atividade anti-inflamatória, reforçando a relevância do estudo de compostos naturais no combate a doenças com elevada mortalidade.

Palavras-chave: Brachydinas; Docagem molecular; Anti-inflamatória; LPS; Citocinas; Estabilidade.

ABSTRACT

COVID-19 is a viral respiratory infection associated with severe inflammatory complications, such as acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Although anti-inflammatory drugs are commonly used in treatment, their side effects underscore the need for safer alternative therapies. Natural products such as *Fridericia platyphylla* traditionally used to treat inflammation, stand out for their biopharmaceutical potential. Furthermore, assessing the stability of bioactive molecules is essential to ensure their therapeutic efficacy and safety. Therefore, the aim of this study was to evaluate the stability of brachydins isolated from the dichloromethane fraction, assess their *in silico* potential against SARS-CoV-2, and investigate the anti-inflammatory potential of the fraction containing brachydins in a model of acute lung injury. Brachydins were isolated from the dichloromethane partition of the hydroethanolic extract of *F. platyphylla* roots using column chromatography and identified by mass spectrometry. Their anti-SARS-CoV-2 potential was assessed through molecular docking with various target proteins. Stability was evaluated using thermogravimetric analysis, evolved gas analysis, and photostability testing. In A549 cells, cytotoxicity of the dichloromethane fraction (Fr. DCM) was assessed, and in both cellular and murine models of LPS-induced ALI, the anti-inflammatory activity of Fr. DCM was analyzed. Six hours after LPS instillation, mice were treated with two doses of Fr. DCM, and after 24 hours, lungs and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected to analyze inflammatory cells, cytokines and edema. Mass spectrometry identified three brachydins (BrA, BrB, and BrC). Thermogravimetric analysis revealed distinct degradation profiles, with the highest mass loss for BrA in stage 6 (21.94%) and for BrB and BrC in stage 2 (38.86% and 38.50%, respectively), suggesting differences in degradation mechanisms. Activation energy (E_a) ranged from 135.8 to 159.4 kJ/mol, with BrA exhibiting the highest value, possibly due to hydrogen bonding interactions. BrC showed the greatest estimated stability (4 to 5 years). In photostability testing, Fr. DCM exhibited 32.8% degradation after 14 h of light exposure, which increased to 52.9% in the presence of TiO₂. In molecular docking, BrC showed the best affinity for the Spike protein, while BrA had the highest affinity for ACE2, suggesting potential to block viral entry. In A549 cells, Fr. DCM maintained 85% cell viability at 12.5 $\mu\text{g/mL}$, with significant reductions only observed at concentrations of 25 $\mu\text{g/mL}$ or higher, which were selected for further experiments. At these concentrations, under LPS-induced inflammatory conditions, Fr. DCM was not effective at 12.5 $\mu\text{g/mL}$, but showed a strong reduction in cell viability at 25 $\mu\text{g/mL}$, especially with higher LPS doses. In BALB/c mice, Fr. DCM significantly reduced inflammatory cells and cytokines in BALF, showing results comparable to the control and dexamethasone groups. Edema was also reduced at both tested doses. These findings highlight *F. platyphylla* as a promising source of bioactive compounds, particularly brachydins, which combine chemical stability with antiviral and anti-inflammatory activities, reinforcing the relevance of studying natural compounds in the fight against high-mortality diseases.

Keywords: Brachydins; Molecular docking; Anti-inflammatory; LPS; Cytokines; Stability.

Integração da dissertação aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) compõem a Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU), com 17 metas globais para erradicar a pobreza, proteger o meio ambiente e promover qualidade de vida para todos. Esta dissertação se alinha especialmente ao ODS 3: Saúde e Bem-Estar, ao investigar as brachydinas (BrA, BrB e BrC) e a fração diclorometânica de *Fridericia platyphylla* como potenciais agentes terapêuticos para inflamação pulmonar causada pela COVID-19 e outras doenças, integrando análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. A pesquisa também está alinhada ao ODS 9: Indústria, Inovação e Infraestrutura, por aplicar estratégias computacionais avançadas, como docagem molecular, visando acelerar a descoberta de fármacos, com foco na geração de um produto acessível para todos e no fortalecimento do desenvolvimento tecnológico e da inovação com base em recurso natural nacional. Além disso, relaciona-se ao ODS 12: Consumo e Produção Responsáveis, por adotar abordagens experimentais que reduzem o uso de recursos naturais e a geração de resíduos, promovendo maior eficiência e sustentabilidade no desenvolvimento de novos compostos bioativos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de infecção do SARS-CoV-2.....	24
Figura 2 - Mapa de registro de ocorrência de <i>Fridericia platyphylla</i>	34
Figura 3 - <i>Fridericia platyphylla</i>	34
Figura 4 - Estruturas das brachydina A (1), brachydina B (2) e brachydina C (3).....	36
Figura 5 - Etapas do processamento do extrato das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i>	44
Figura 6 - Etapas do protocolo experimental in vivo.	54
Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração diclorometânica do extrato hidroetanólico das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i> ($\lambda = 254$ nm) e espectros do UV.	56
Figura 8 - Cromatografia em camada delgada dos isolados da fração diclorometânica (Fr. DCM): (a) Substância 1, (b) substância 2 e (c) substância 3.	57
Figura 9 - Cromatogramas das substâncias isoladas da fração diclorometânica: (a) substância 1; (b) substância 2 e (c) substância 3.....	58
Figura 10 - Espectro de massas de brachydina A.....	59
Figura 11 - Proposta de fragmentação de brachydina A.	59
Figura 12 - Espectro de massas de brachydina B.....	60
Figura 13 - Proposta de fragmentação de brachydina B.....	61
Figura 14 - Espectro de massas de brachydina C.....	61
Figura 15 - Proposta de fragmentação de brachydina C.....	62
Figura 16 - Curvas termogravimétricas para BrA, BrB e BrC.....	62
Figura 17 - Primeira derivada das curvas termogravimétricas (dTG) e deconvolução das dTG para a avaliação das etapas de pirólise para (a) BrA, (b) BrB e (c) BrC.	64
Figura 18 - Análise de Gases Evoluídos (EGA/TG-FTIR) obtida da pirólise: (a) BrA, (b) BrB e (c) BrC.....	67
Figura 19 - Valores de α para (a) BrA; (b) BrB; (c) BrC.....	68
Figura 20 - Gráfico de $\text{Log}(\beta)$ vs. $(1/T)$ para determinar a energia de ativação para a pirólise de (a) BrA, (b) BrB e (c) BrC.	69
Figura 21 - Espectro UV-Vis da fração diclorometânica antes (tempo 0) e após 14 horas na presença de luz.	72
Figura 22 - Espectro UV-Vis da fração diclorometânica contendo dióxido de titânio, obtido após 30 minutos de centrifugação, antes da exposição à luz (tempo 0) e após 14 horas de exposição.....	73

Figura 23 - Viabilidade de células A549 com diferentes concentrações da fração diclorometânica de <i>Fridericia platyphylla</i> . Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. (ns: não significativo; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).....	76
Figura 24 - Viabilidade de células A549 com lipopolissacarídeo e tratadas com fração diclorometânica de <i>Fridericia platyphylla</i> . Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. (ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).....	77
Figura 25 - Contagem de células totais no fluido do lavado broncoalveolar de camundongos. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. (**** $p < 0,0001$).	78
Figura 26 - Diferentes campos microscópicos observados sob objetiva de 100x no fluido do lavado broncoalveolar: (a) neutrófilos e macrófagos; (b) neutrófilos predominantes; (c) macrófagos e linfócitos.....	79
Figura 27 - Contagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $p < 0,0001$	80
Figura 28 - Contagem de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. ns: não significativo; **** $p < 0,0001$	81
Figura 29 - Contagem de linfócitos no fluido do lavado broncoalveolar. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $p < 0,0001$	82
Figura 30 - Curvas padrão: (a) Interleucina-6 (IL-6); (b) Interleucina-8 (IL-8).	83
Figura 31 - Quantificação de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar: (a) interleucina-6; (b) interleucina-8. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. ns: não significativo; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$	84
Figura 32 - Relação peso úmido/peso seco do pulmão após 24 horas. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $p < 0,0001$	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema dos grupos e seus respectivos tratamentos.....	51
Tabela 2 - Perda de massa e faixa de temperatura para cada etapa determinada a partir das áreas sob as curvas dTG deconvoluídas.	65
Tabela 3 - Energia de ativação e os coeficientes de correlação linear da reação de pirólise na fase inicial de BrA, BrB e BrC.....	69
Tabela 4 - Constante pré-exponencial de Arrhenius (A), pk e vida útil para $\alpha = 10\%$ para BrA, BrB e BrC.	70
Tabela 5 - Parâmetros de afinidade molecular das brachydinas com proteínas do SARS-CoV-2.....	73
Tabela 6 - Comparação dos valores de energia de ligação das brachydinas e fármacos com proteínas relacionadas ao SARS-CoV-2.	74

LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

[M+H]⁺	Modo de ionização positivo
A549	Células epiteliais basais alveolares humana
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BrA	Brachydina A
BrB	Brachydina B
BrC	Brachydina C
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
dTG	Derivada das curvas termogravimétricas
Dx	Dexametasona
Ea	Energia de ativação
ECA2	Enzima Conversora De Angiotensina 2
EGA	Análise de gases evoluídos
fLBA	Fluído do Lavado Broncoalveolar
F_iO₂	Fração inspirada de oxigênio
FWO	Flynn-Wall-Ozawa
Fr. DCM	Fração diclorometânica do extrato das raízes de <i>Fridericia platyphylla</i>
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFNγ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LBA	Lavado broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
m/z	Razão massa/carga
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-di-fenil tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde

P_aO₂	Pressão parcial arterial de oxigênio
RDA	Reação Retro-Diels-Alder
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
TLR2	Receptor Toll-like 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Processo infeccioso do SARS-CoV-2	23
3.2 Mecanismos inflamatórios e imunológicos envolvidos na COVID-19.....	25
3.2.1 Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda.....	26
3.2.2 Síndrome do desconforto respiratório agudo	27
3.3 Uso e potencial terapêutico de plantas medicinais.....	30
3.3.1 <i>Fridericia platyphylla</i> (sin. <i>Arrabidaea brachypoda</i>).....	32
3.3.1.1 Potencial terapêutico das brachydinas isoladas de <i>Fridericia platyphylla</i>	35
3.4 Estudos de estabilidade de biomoléculas.....	37
3.5 Docagem molecular de biomoléculas.....	39
3.5.1 Alvos moleculares do SARS-CoV-2 comumente utilizados em estudos de docagem.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 Coleta do material vegetal	42
4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico	42
4.3 Obtenção da fração diclorometânica (Fr. DCM).....	42
4.4 Fracionamento de Fr. DCM	43
4.5 Identificação dos constituintes químicos.....	44
4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	44
4.5.2 Espectrometria de Massas.....	45
4.6 Estudos de estabilidade.....	45

4.6.1	Análise termogravimétrica	45
4.6.2	Análise de gases evoluídos	47
4.6.3	Fotoestabilidade	47
4.7	Docagem molecular.....	48
4.8	Estudos <i>in vitro</i>	49
4.8.1	Cultura de células	49
4.8.2	Citotoxicidade de Fr. DCM.....	49
4.8.3	Lesão pulmonar aguda.....	50
4.9	Estudos <i>in vivo</i>	50
4.9.1	Animais.....	50
4.9.2	Protocolo de instilação de LPS e salina.....	50
4.9.3	Tratamento dos animais	51
4.9.4	Fluido do Lavado broncoalveolar (fLBA).....	51
4.9.5	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas inflamatórias no fLBA.....	52
4.9.6	Extração dos pulmões.....	53
4.10	Análise estatística	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	Perfil cromatográfico e identificação dos constituintes químicos	56
5.2	Estudos de estabilidade.....	62
5.3	Docagem Molecular	73
5.4	Estudos <i>in vitro</i>	75
5.4.1	Citotoxicidade Fr. DCM	75
5.4.2	Lesão pulmonar aguda.....	77
5.5	Estudos <i>in vivo</i>	78
5.5.1	Células no Fluido Lavado broncoalveolar (fLBA)	78
5.5.2	ELISA de citocinas no fLBA	83

5.5.3 Relação Peso úmido/peso seco	86
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, surtos de doenças virais têm causado aumento das taxas de mortalidade. Diversas infecções endêmicas evoluíram para pandemias, ameaçando a população globalmente. A mais recente pandemia foi causada pelo SARS-CoV-2, o terceiro coronavírus de origem animal a infectar humanos nos últimos 20 anos (Christy *et al.*, 2020).

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, apresentou impacto mundial sem precedentes, tornando-se uma emergência de saúde pública de interesse internacional devido ao seu potencial de dispersão, número de casos graves e óbitos (Bezerra *et al.*, 2021). Foi identificada pela primeira vez em Wuhan, na China, em dezembro de 2019, e até o final de 2022, foram confirmados 660.300.641 casos e 6.599.916 óbitos no mundo, enquanto no Brasil foram 36.331.281 casos e 693.853 óbitos, no Maranhão 488.093 casos e 11.034 óbitos. Mostrando assim, a gravidade e a proporção mundial da doença (Albuquerque, 2024).

A gravidade clínica da COVID-19 está relacionada, em grande parte, à resposta inflamatória exacerbada desencadeada pela infecção, e os sintomas incluem febre alta, tosse persistente e dificuldade respiratória (Zhang *et al.*, 2020).

A inflamação é uma resposta fisiológica complexa do sistema imunológico frente a patógenos ou lesões. Quando a resposta inflamatória é eficiente e equilibrada, resulta em uma evolução benigna da doença, contudo, quando excessiva, desencadeia um aumento dos mecanismos inflamatórios e uma “tempestade” de citocinas (Brandão *et al.*, 2020). Nos casos graves de infecção pelo coronavírus, essa resposta exacerbada levam ao quadro de lesão pulmonar aguda (LPA) associada a disfunções cardiovasculares e eventos tromboembólicos, podendo evoluir para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), condição que requer ventilação mecânica e apresenta taxa de mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de aproximadamente 40–45% (Wang *et al.*, 2020; Máca *et al.*, 2017; Munshi *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços no suporte clínico para aliviar os sintomas, ainda não há tratamento específico comprovadamente eficaz para LPA e SDRA (Brandão *et al.*, 2020). As terapias atuais, como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticosteroides e opioides, embora amplamente utilizados para modular a resposta inflamatória, estão associados a efeitos adversos graves, como toxicidade gastrointestinal, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (De Matos, 2024).

Uma abordagem terapêutica complementar que tem ganhado destaque é a imunoterapia, considerada uma via promissora para mitigar os desafios impostos pela COVID-19. A imunoterapia busca modular o sistema imunológico de forma direcionada, oferecendo a

oportunidade de alterar a resposta do hospedeiro ao otimizar as defesas antivirais e, ao mesmo tempo, controlando a inflamação (Velikova *et al.*, 2024). Pode ser aplicada de forma ativa, por meio de vacinas, ou passiva, com o uso de anticorpos, como os anticorpos monoclonais (mAbs). Estes representam uma estratégia promissora no tratamento de doenças infecciosas, como a COVID-19, ao fornecerem uma resposta imune contra alvos específicos do patógeno (Deb *et al.*, 2021).

Apesar do seu potencial terapêutico, os mAbs enfrentam limitações, como o alto custo de produção, a complexidade e alta heterogeneidade genética dos vírus, além da ocorrência de inflamações graves, fatores que dificultam o desenvolvimento de terapias mAb eficazes e duradouras (Deb *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Diante dessas limitações, cresce o interesse por abordagens terapêuticas inovadoras, especialmente pela busca de novas moléculas com propriedades anti-inflamatórias que sejam mais seguras, eficazes e com menos efeitos colaterais. Os produtos naturais, utilizados há muitos anos para tratar diversas doenças, apresentam um vasto potencial farmacológico, incluindo para tratamento de doenças inflamatórias. Dentre as espécies de plantas com potencial biofarmacológico, destacam-se as pertencentes à família Bignoniaceae (Salgado *et al.*, 2020).

Fridericia platyphylla, pertencente a essa família, conhecida popularmente como “cervejinha do campo” é empregada na medicina popular para tratar pedra nos rins e dores nas articulações. Possui propriedades farmacológicas promissoras devido à sua composição química, que inclui diversos metabólitos secundários, entre eles os flavonoides (Monteiro *et al.*, 2020). Rocha *et al.* (2014) isolaram pela primeira vez flavonoides diméricos incomuns, nomeados como brachydinas, presentes na fração diclorometânica do extrato das raízes de *F. platyphylla*. Na literatura são descritas propriedades antivirais, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária para essas moléculas (Ribeiro *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, propõe-se investigar o potencial terapêutico das brachydinas, utilizando ferramentas computacionais como a docagem molecular para triagem de moléculas capazes de interagir com proteínas-alvo, e modelos experimentais, como o lipopolissacarídeo (LPS), muito utilizado para reproduzir a LPA e SDRA *in vitro* e *in vivo* (Pinheiro *et al.*, 2019). Além disso, é fundamental avaliar a estabilidade de biomoléculas, para garantir a eficácia e segurança nos tratamentos, pois podem ser sensíveis à temperatura e luz, levando a degradação e perda da atividade, resultando em efeitos adversos (Silva, Andrade, Oliveira, 2024). Dessa forma, o entendimento da estabilidade e das atividades biológicas das brachydinas podem abrir caminhos para novas terapias de doenças inflamatórias graves, com menor risco de efeitos colaterais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial anti-inflamatório da fração diclorometânica de *Fridericia platyphylla*, investigar a estabilidade e atividade anti-SARS-CoV-2 das brachydinas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a estabilidade térmica e fotoestabilidade das brachydinas presentes na fração diclorometânica do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla*;
- Realizar o estudo *in silico* para avaliar o potencial anti-SARS-CoV-2 dessas moléculas frente a diferentes receptores;
- Investigar, em modelos *in vitro* (células A549) e *in vivo* (camundongos BALB/c), a toxicidade, e o efeito terapêutico da fração diclorometânica no contexto de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Processo infeccioso do SARS-CoV-2

A migração, viagens globais e a urbanização aumentaram a incidência de infecções virais, tornando-as uma das principais causas de doenças em todo o mundo (Lima *et al.*, 2024). Na última década, diversos vírus afetaram a população mundial, resultando em sérias consequências para a saúde física e mental, como H1N1, HIV, dengue, hepatite, febre amarela, Chikungunya e o Coronavírus (Moreira; Feitosa; Abreu, 2022).

Os coronavírus são vírus de RNA de fita simples, envelopados e de sentido positivo que infectam mamíferos e aves. Em humanos, são conhecidos quatro coronavírus de circulação sazonal, o HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1, que causam sintomas leves, semelhantes ao resfriado comum. No entanto, há os que causam doenças respiratórias graves podendo ser letais, como o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 causador da COVID-19, que levou a uma pandemia global em 2019 (Lima *et al.*, 2024; Steiner *et al.*, 2024).

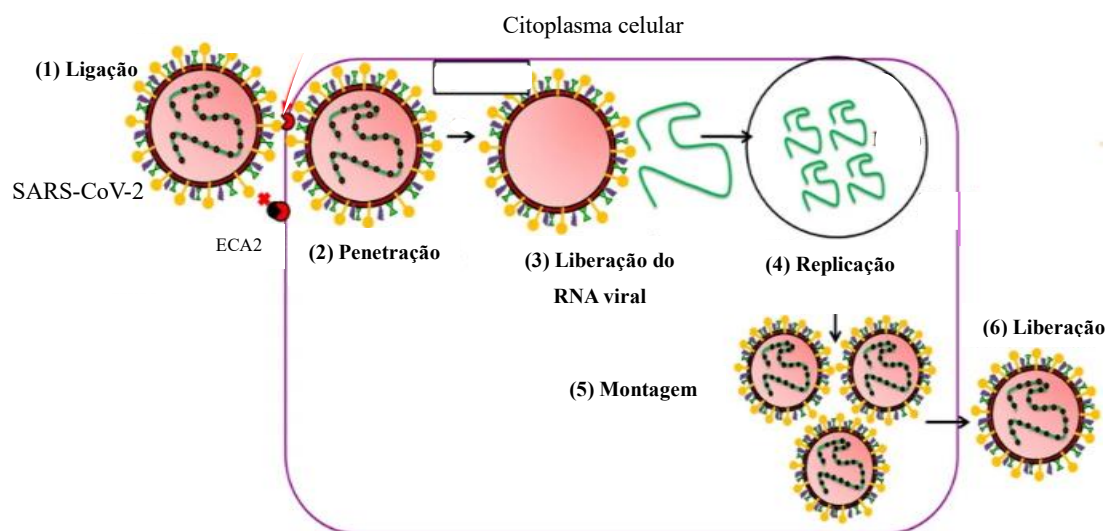
O SARS-CoV-2, para infectar células no hospedeiro, interage com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), uma proteína de membrana tipo I expressa em células dos rins, coração, vasos sanguíneos e, principalmente, em células epiteliais alveolares AT2 pulmonares, que são propensas a infecções virais. A infecção inicia-se quando a proteína Spike (S) do vírus se liga ao receptor ECA2, processo facilitado pela protease TMPRSS2, que cliva a Spike, expondo o peptídeo de fusão (Steiner *et al.*, 2024).

Uma vez no citoplasma, o genoma de RNA viral é liberado e imediatamente traduzido pelas ribossomos do hospedeiro para a produção das proteínas não estruturais (nsps), que formam o complexo de replicação. Esse complexo sintetiza novas cópias do RNA viral e transcreve subgenomas para a produção das proteínas estruturais (S, E, M e N). A proteína N se associa ao RNA genômico formando o nucleocapsídeo, enquanto S, E e M se inserem na membrana do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A montagem dos novos vírions ocorre no interior dessas organelas, e a liberação se dá por exocitose, reiniciando o ciclo infeccioso, sendo constituída como a principal causa da alta imunogenicidade do vírus (V'kovski *et al.*, 2020; Pascoal *et al.*, 2020).

O ciclo infeccioso do SARS-CoV-2 está representado na Figura 1, que ilustra as principais etapas: (1) ligação da proteína Spike ao receptor ECA2; (2) penetração do vírus na célula hospedeira; (3) desencapsidamento para liberação do RNA viral no citoplasma; (4)

replicação do genoma; (5) montagem dos novos vírions; e (6) liberação por exocitose (Asif *et al.*, 2020).

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de infecção do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Asif *et al.* (2020)

Ao infectar o corpo, rapidamente os mecanismos de defesa imunológica são instaurados, incluindo respostas imunes específicas e inespecíficas, com células T CD4⁺ desempenhando um papel antiviral significativo, buscando o equilíbrio do combate ao patógeno e o risco de desenvolver autoimunidade ou inflamação prejudicial. O SARS-CoV-2 é detectado pelo receptor Toll-like 2 (TLR2) ativando as células T CD4⁺, o que resulta na indução das citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interferon gama (IFN γ) e macrófagos. Por isso, nos casos extremos, os pacientes com COVID-19 apresentam um aumento dramático nos níveis de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, uma condição conhecida como "tempestade de citocinas", levando ao desenvolvimento da SDRA, choque séptico, acidose metabólica, disfunção da coagulação e até mesmo morte (Steiner *et al.*, 2024; Asif *et al.*, 2020; Pascoal *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2024).

Diversas abordagens de tratamento para a COVID-19 foram tentadas, incluindo a inibição da entrada do vírus na célula hospedeira, bloqueio da RNA polimerase dependente de RNA e aumento do pH das células pulmonares e endossomos, além das vacinas produzidas. Contudo, a rápida evolução e mutação do SARS-CoV-2 ameaçam continuamente comprometer a eficácia dessas opções preventivas e terapêuticas, destacando a importância de estudar novos

mecanismos e medicamentos para o combate da infecção e inflamação causadas por vírus (Asif *et al.*, 2020; Steiner *et al.*, 2024).

3.2 Mecanismos inflamatórios e imunológicos envolvidos na COVID-19

A inflamação está envolvida em muitas doenças, tais como contusões, infecções respiratórias, asma e doenças autoimunes. Pode ser desencadeada por vários fatores, incluindo agentes físicos, químicos e biológicos, como vírus, bactérias, fungos e parasitas. Embora a reação inflamatória se manifeste localmente, ela afeta o organismo como um todo, com o envolvimento dos sistemas nervoso e endócrino na regulação do processo e aparecimento de manifestações gerais. Em nível macroscópico, a inflamação é caracterizada por quatro sinais clínicos característicos, que são edema, vermelhidão, calor e dor (Freitas *et al.*, 2019; Etienne, Viegas, Junior, 2021).

O processo inflamatório é uma resposta complexa do organismo a uma lesão tecidual, infecciosa ou não. É um mecanismo fisiológico básico e a magnitude da resposta inflamatória é crucial, uma resposta inflamatória insuficiente resulta em imunodeficiência, enquanto uma resposta inflamatória excessiva pode causar morbidade e mortalidade, provocando lesões adicionais nos tecidos e respostas indesejáveis (Etienne, Viegas, Junior, 2021). A inflamação pode ser dividida em aguda ou crônica, segundo a idade, duração ou tempo de evolução do processo. A aguda inicia-se rapidamente e tem curta duração, tendo como principais características o edema e a migração de leucócitos (neutrófilos). Já a inflamação crônica tem como características uma maior duração, presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos, fibrose e necrose (Veridiano, 2017).

Os vírus são agentes que podem desencadear processos inflamatórios. Quando infectam células humanas, o sistema imunológico reage produzindo citocinas, que são cruciais para a modulação da resposta imune. As citocinas, ao se ligarem a receptores específicos, influenciam a proliferação, ativação e diferenciação celular de maneira positiva ou negativa, além de mediar as reações imunológicas e promover ou inibir a produção de outras citocinas. Há citocinas com funções anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, e um equilíbrio entre elas é essencial para o funcionamento adequado do sistema imunológico (Cardoso, Rocha, Laurindo, 2019).

Nos estágios iniciais da infecção por SARS-CoV-2, os macrófagos exibem um fenótipo pró-inflamatório (M1), produzindo substâncias como óxido nítrico, interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), espécies reativas de oxigênio (ROS), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que defendem

o hospedeiro contra o vírus, mas também promovem lesão pulmonar. O TNF- α é o principal iniciador da inflamação, mediando a morte celular, diferenciação e modulação imunológica (Meeran *et al.*, 2021; Steiner *et al.*, 2024).

Respostas inflamatórias anormais e hiperativas ao SARS-CoV-2 são propostas como as principais causas da gravidade e morte em pacientes com COVID-19. Este estado hiperinflamatório está associado a níveis aumentados de citocinas circulantes, linfopenia profunda e infiltração substancial de células mononucleares nos pulmões e outros órgãos, como coração, baço, linfonodos e rins. A resposta inflamatória exacerbada faz com que os pacientes mostrem aumento da produção de citocinas responsáveis pela ativação neutrofílica, promoção da coagulação e produção de febre. O IFN- γ induz atividade macrofágica para destruir o patógeno e amplifica a liberação de citocinas (Merad e Martin, 2020; Pascoal *et al.*, 2020).

As respostas inflamatórias e imunológicas do corpo são importantes para eliminar a infecção, mas podem impactar significativamente a patogênese do SARS-CoV-2 e podem desempenhar um papel na expressão clínica da doença. A liberação anormal de citocinas e moléculas pró-inflamatórias está associada à lesão pulmonar, sendo observadas anormalidades pulmonares em quase todos os pacientes com COVID-19, conforme evidenciado pela radiografia de tórax, enquanto complicações graves, como SDRA e morte, ocorrem em um subgrupo de pacientes (Meeran *et al.*, 2021; Merad e Martin, 2020).

3.2.1 Fisiopatologia da lesão pulmonar aguda

Lesões pulmonares diretas resultam de agressões primárias ao tecido pulmonar, como infecções que evoluem para pneumonia de origem bacteriana, viral ou fúngica. Já as lesões pulmonares indiretas decorrem de processos inflamatórios sistêmicos, sendo comuns em casos de sepse grave associada a infecções extrapulmonares, como a peritonite (Bernardo, 2022).

Nesse contexto, destaca-se a lesão pulmonar aguda (LPA), uma condição inflamatória que provoca a ruptura das barreiras endotelial e epitelial dos pulmões. Sua patogênese é frequentemente caracterizada por inflamação pulmonar difusa, obliteração alvéolo-capilar, hipóxia, edema pulmonar não cardiogênico e diminuição da complacência pulmonar (Huang e Wang, 2017).

Embora existam várias definições clínicas, a LPA foi recentemente reclassificada como SDRA moderada ou leve. A forma mais grave de insuficiência respiratória é denominada de SDRA, enquanto a forma mais branda ficou denominada como LPA. A definição baseia-se na razão entre pressão parcial arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio P_aO_2 / F_iO_2 (leve

≤ 300 mm Hg, moderada ≤ 200 mm Hg e grave ≤ 100 mm Hg) (Mowery; Terzian; Nelson, 2020).

Pacientes com COVID-19 geralmente apresentam dificuldade respiratória aguda, levando a lesões pulmonares agudas caracterizadas por níveis elevados de IL-6, correlacionados com a gravidade da doença, prognóstico e mortalidade (Meeran *et al.*, 2021). A agressão inicial aos pulmões ativa células pulmonares, como macrófagos alveolares e pneumócitos, que são capazes de liberar diversos mediadores. Os neutrófilos, em particular, são a marca registrada da LPA e o número de neutrófilos no fluido de lavagem broncoalveolar (FLBA) do paciente está positivamente correlacionado com a gravidade da doença. Neutrófilos ativados liberam substâncias, incluindo ROS, citocinas pró-inflamatórias como IL1 β , IL6 e TNF- α . Essas citocinas atuam no endotélio vascular aumentando a expressão de moléculas de adesão como selectinas e integrinas, que permitem o influxo de leucócitos, principalmente de neutrófilos. Além disso, essas moléculas aumentam a permeabilidade vascular, levando a um quadro de exsudação proteica e formação de edema intersticial, sendo este parâmetro um marco fisiopatológico da LPA (Bernardo, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Uma forma de estudar a lesão pulmonar aguda em modelos animais e celular é utilizando a instilação de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um constituinte principal da parede celular de bactérias Gram-negativas e é considerado um potente indutor biológico de neutrófilos, sendo um agente adequado para induzir LPA em células e animais experimentais. Ele estimula a ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB), que estimula a superprodução de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8. Consequentemente, a produção excessiva desses mediadores inflamatórios induz inflamação sistêmica, levando ao desenvolvimento de LPA e SDRA (Huang e Wang, 2017; Cardoso, Rocha, Laurindo, 2019).

A LPA induzida por LPS em camundongos é um modelo bem aceito para investigar a SDRA, pois imita alterações inflamatórias e histológicas. Quando administrado por via intratraqueal, endovenosa ou intraperitoneal, o LPS pode reproduzir lesão à membrana alvéolo-capilar, com alterações pulmonares funcionais e morfológicas semelhantes à SDRA em humanos (Pinheiro *et al.*, 2019).

3.2.2 Síndrome do desconforto respiratório agudo

A SDRA é um agravamento da LPA que causa insuficiência respiratória. É caracterizada pela perturbação de células epiteliais e endoteliais nos pulmões, resultando no aumento da permeabilidade vascular e densidade pulmonar, com perda de tecido aerado. Patologicamente,

é identificada por um dano alveolar difuso, e fisiopatologicamente, pelo desenvolvimento de edema pulmonar não cardiogênico devido ao aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar pulmonar (Bernardo, 2022; Pinheiro *et al.*, 2017).

A lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar ocorre por diferentes mediadores pró-inflamatórios, especialmente pelas citocinas. Essas citocinas intensificam a cascata inflamatória, ativando neutrófilos e estimulando a produção de outras citocinas, como IL-8 que está fortemente relacionada a quimiotaxia de neutrófilos e ao aumento do metabolismo oxidativo local. A lesão epitelial alveolar afeta a membrana basal e os pneumócitos tipos I e II, reduzindo a quantidade e alterando a funcionalidade do surfactante, resultando em maior tensão superficial alveolar, ocorrência de atelectasias e redução da complacência pulmonar (Guerreiro, 2015).

A lesão no endotélio capilar é associada a eventos inflamatórios, como recrutamento, sequestro e ativação de neutrófilos, formação de radicais de oxigênio e ativação do sistema de coagulação, levando à trombose microvascular e recrutamento de células mesenquimais, com a produção de procolágeno (Mendes *et al.*, 2020; Amato *et al.*, 2007). Consequentemente, ocorre exsudação de líquido rico em células e proteínas plasmáticas, aumentando a permeabilidade entre os alvéolos e os capilares que os recobre. Esse processo desencadeia uma resposta inflamatória local com presença de leucócitos, plaquetas e fibrina, contribuindo para a formação de membrana hialina e subsequente fibrose alveolar (Etienne, Viegas, Junior, 2021).

A SDRA resulta de intensa resposta inflamatória aguda nos alvéolos, impedindo a troca gasosa fisiológica de oxigênio e gás carbônico. Isso causa sintomas característicos como intensa dispneia e baixa saturação de oxigênio sanguíneo (Munshi *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2020). A SDRA causa quase 75.000 mortes anualmente e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, com mais de 3 milhões de casos anuais em todo o mundo, representando 10% das admissões na UTI. Pacientes que sobrevivem enfrentam permanência prolongada na UTI e apresentam limitações funcionais significativas, afetando a atividade muscular e qualidade de vida, que persistem por pelo menos um ano após a alta hospitalar (Pinheiro *et al.*, 2019; Amato *et al.*, 2007).

Os principais sinais e sintomas da SDRA são hipoxemia refratária e opacidades radiológicas bilaterais, associadas ao aumento da mistura venosa de sangue, aumento do espaço morto fisiológico, e diminuição da complacência pulmonar (Guerreiro, 2015; Pinheiro *et al.*, 2019). Avaliações histopatológicas de pulmões de pacientes que morreram com SDRA mostraram intensa resposta inflamatória, exsudato fibrinoso, edema alveolar com o colapso

alveolar e deposição de fibras colágenas nas paredes alveolares, sugerindo remodelamento importante da matriz extracelular (Guerreiro, 2015).

A Síndrome Respiratória Aguda Grave causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, resultou em mais de 6 milhões de mortes em menos de 3 anos (Wang *et al.*, 2023). Segundo um estudo de Guan *et al.* (2020) em Wuhan, de 1099 pacientes com COVID-19, glicocorticoides sistêmicos foram administrados a 204 pacientes (18,6%), com maior porcentagem entre os casos graves do que os não graves (44,5% vs. 13,7%). Destes 204 pacientes, 33 (16,2%) foram admitidos na UTI, 17 (8,3%) necessitaram de ventilação invasiva e 5 (2,5%) morreram. Durante a admissão hospitalar, a maioria foram diagnosticados com pneumonia (91,1%), seguido por SDRA (3,4%) e choque (1,1%).

O uso de glicocorticoides em pacientes com pneumonia por COVID-19 pode modular a resposta inflamatória, reduzindo o risco de desenvolver SDRA. Em Hong Kong, o tratamento padrão da SDRA incluiu a combinação de esteroides e Ribavirina. Os corticosteroides atuam como imunomoduladores, reduzindo a ação dos leucócitos e a liberação das citocinas inflamatórias, diretamente relacionada a fisiopatologia da SDRA (Mendes *et al.*, 2020). Alguns estudos relataram que glicocorticoides juntamente com IFN- α podem reverter rapidamente anormalidades na imagem pulmonar e melhorar a saturação de oxigênio. No entanto, há controvérsia sobre o uso em pacientes com COVID-19 com o intuito de amenizar as inflamações e reduzir as chances de evolução da doença, pois pode afetar a eliminação do SARS-CoV-2 e aumentar os riscos de infecções bacterianas oportunistas, elevando a mortalidade (Asif *et al.*, 2020; Meneguzzo *et al.*, 2020).

As abordagens terapêuticas atuais para SDRA concentram-se no uso de corticosteroides, tratamento da doença de base e no suporte ventilatório. A ventilação mecânica protetora, com pressões positivas, baixos volumes e altas doses de oxigênio, é a mais eficaz. Entretanto, estudos mostram que a própria ventilação pode aumentar os danos pulmonares, gerando força que tem impacto direto sobre o aparelho respiratório, podendo alterar propriedades funcionais e morfológicas e levar à falência de órgãos como coração, rins e fígado, além de anormalidades hematológicas, como anemia e trombocitopenia, resultando na morte do paciente (Guerreiro, 2015; Bernardo, 2022).

A LPA e a SDRA são frequentemente associadas a baixas taxas de sobrevivência (35% a 50%) em pacientes graves. A morbidade e mortalidade associadas a essa doença crítica permanecem muito altas e não há tratamento farmacológico eficaz. Portanto, novos medicamentos ou tratamentos seguros e eficazes são urgentemente necessários (Huang e Wang, 2017). Entre as inúmeras vias terapêuticas a serem exploradas, os produtos naturais têm

recebido atenção devido às suas propriedades farmacológicas. São fontes importantes de novos compostos antimicrobianos, anti-inflamatórios e imunomoduladores. Por isso, é essencial a pesquisa por novas moléculas para o tratamento da lesão pulmonar aguda.

Plantas medicinais oferecem uma solução promissora, pois contêm uma diversidade de moléculas e apresentam efeitos colaterais menores em comparação aos métodos atuais (Meeran *et al.*, 2021).

3.3 Uso e potencial terapêutico de plantas medicinais

As plantas têm sido utilizadas ao longo da história da humanidade para diversos fins, desde venenos até curas, sendo consideradas uma das práticas terapêuticas mais antigas. O uso de plantas medicinais possui registros datando desde 60.000 anos a.C, estando presentes em culturas, como a Egípcia, Hindu, Persa, Grega e os povos da América pré-colombiana (Rocha *et al.*, 2015).

Na pré-história, seu uso estava fortemente ligado a uma perspectiva mágico-simbólica, onde os espíritos e elementos da natureza eram considerados responsáveis pelas doenças. Durante esse período, era comum o uso de plantas medicinais em rituais religiosos, com o objetivo de aproximar o ser humano do divino e buscar a cura para doenças (Da Rocha *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas do Século XX, o uso de plantas medicinais foi reconhecido como um recurso terapêutico válido, iniciando-se discussões sobre a sua incorporação nos sistemas de saúde pública, aumentando a importância e os investimentos em pesquisas nesta área (Rocha *et al.*, 2015). Segundo o Ministério da Saúde, plantas medicinais são aquelas que contêm substâncias com propriedades medicinais em suas partes (folhas, flores, raízes, cascas) e que tem efeitos terapêuticos no organismo humano, sendo usadas para tratamento ou alívio de doenças, sintomas ou condições de saúde.

O Brasil possui seis biomas continentais: a Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa. A Amazônia é o maior bioma, ocupando quase metade do território brasileiro, enquanto o Pantanal é o menor, com menos de 2% (IBGE). O Brasil detém a maior biodiversidade do mundo, com cerca de 20% da flora mundial, abrangendo plantas com potenciais farmacológica. Entre elas, atividade antifúngica, antimicrobiana antiespasmódica, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, analgésica, antioxidante, fotoprotetora, entre outras (De Matos, 2024). Como resultado da utilização e reconhecimento da importância das plantas medicinais, em 2009 foi elaborada a Lista nacional de Plantas Medicinais, que apresenta 71

espécies de plantas medicinais com potencial para gerar produtos ao Sistema Único de Saúde Brasileiro (Da Rocha *et al.*, 2021; Braga e Da Silva, 2021; RENISUS, 2009).

Fatores culturais influenciam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos. Na cultura popular, o uso de plantas é comum na forma de remédios caseiros, cujo preparo é feito na própria casa. Estima-se que 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta em busca de alívio para sintomas ou dores. Uma pesquisa realizada por Braga e Da Silva (2021), a partir de um questionário online para pessoas em diversos lugares do Brasil, das 151 respostas obtidas, 90,1% afirmaram utilizar plantas medicinais de alguma forma, sendo que 56,3% o fazem no mínimo duas vezes por semana, isso enfatiza que há um hábito muito forte em utilizar este tipo de produto pela população. 47% responderam que consomem por indicação de amigos ou familiares, indicando como o conhecimento é passado por gerações. Quando perguntadas quais plantas faziam uso, observou-se que muitas delas encontram-se na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS).

Um exemplo de planta medicinal de uso popular que se tornou um produto farmacêutico é o Acheflan, o primeiro medicamento com desenvolvimento clínico 100% nacional, registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e comercializado pelo Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. O Acheflan contém *Cordia verbenacea*, conhecida popularmente como erva baleeira, é indicado para o tratamento de processos inflamatórios de uso local e tópico, como tendinites e dores musculares, além de traumas, entorses e contusões. A *Cordia verbenacea* pertence à família Boraginaceae e possui flavonoides e óleo essencial com atividade anti-inflamatória (Oliveira *et al.*, 2021).

Revisões sobre o uso de produtos naturais com ação anti-inflamatórios, como a de Asif *et al.* (2020), mostram estudos utilizando óleos essenciais, como eugenol, mentol, eucalipto e tratamentos com eucaliptol em monócitos e macrófagos em resposta à inflamação de infecções pulmonares, onde os tratamentos reduziram a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Huang e Wang (2017), demonstraram os efeitos protetores do cinamaldeído em camundongos com LPA induzida por LPS, o tratamento reduziu significativamente a proporção de pulmão úmido/seco e o edema pulmonar nos camundongos. E também inibiu os neutrófilos, macrófagos e o número total de células no fluido de lavagem broncoalveolar. Além dos níveis de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-13 e IL-1 β .

Entre as classes de compostos revisadas por De Matos (2024), os compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides, destacaram-se em relação a outras classes como alcaloides, cumarinas, saponinas e quinonas, pela ação anti-inflamatória, regulação de

citocinas e sinalização dependente de insulina, atuando de forma concisa em outros distúrbios que têm a inflamação como relação.

Diversos outros estudos presentes na literatura (Moudgil *et al.*, 2022; Ghandi *et al.*, 2021; Zulhendri *et al.*, 2022), têm se dedicado à busca por novos agentes anti-inflamatórios, principalmente em função dos efeitos colaterais associados aos medicamentos sintéticos atualmente utilizados, como os glicocorticoides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

Os glicocorticoides são utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, alérgicas e imunológicas, no entanto, sua toxicidade e os efeitos adversos limitam seu uso clínico (Pinheiro, 2024). Já os AINEs são comumente utilizados no manejo da febre, dor e inflamação, mas seu uso prolongado tem sido associado a um aumento no risco de doenças cardiovasculares e hepáticas. Um exemplo notório é o rofecoxibe (Vioxx®), retirado do mercado em 2004 após evidências de aumento significativo na incidência de eventos cardiovasculares entre os usuários do medicamento (Coutinho *et al.*, 2009). Outro caso relevante é o da nimesulida, cujo uso contínuo tem sido relacionado ao desenvolvimento de lesão hepática aguda, em alguns casos resultando em transplante de fígado ou até mesmo em óbito por insuficiência hepática fulminante (Kwon *et al.*, 2019).

Esses eventos adversos graves evidenciam a necessidade urgente de se desenvolver novos fármacos anti-inflamatórios que aliem eficácia terapêutica a um melhor perfil de segurança.

3.3.1 *Fridericia platyphylla* (sin. *Arrabidaea brachypoda*)

No contexto do uso de plantas medicinais, a seleção de espécies com base no conhecimento popular tem contribuído para a síntese de novos produtos farmacêuticos (Da Rocha *et al.*, 2021). Entre as plantas com potencial biofarmacológico, destacam-se as pertencentes à família Bignoniaceae, que inclui 120 gêneros e aproximadamente 800 espécies (Salgado *et al.*, 2020). No Brasil, existem 56 gêneros e cerca de 340 espécies, incluindo muitos táxons endêmicos (Do Nascimento *et al.*, 2022).

As espécies dessa família são utilizadas para diversos fins, como na horticultura, madeira, tinturas e medicina. Suas propriedades biológicas são atribuídas a diversidade de classes de metabólitos como: lignanas, flavonoides, iridoides, triterpenos, xantonas, naftoquinonas, ácidos cinâmicos, benzoicos e seus derivados (Rozatto, 2012).

O gênero *Arrabidaea*, pertencente a essa família, é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo na América tropical, do México à Argentina. No Brasil está presente em várias regiões, predominantemente no bioma do Cerrado, abrangendo estados como Rondônia, Bahia, Minas Gerais, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão, São Paulo, Tocantins, Paraná e Piauí (Rosário, 2023). Muitas espécies do gênero *Arrabidaea* são amplamente usadas na medicina tradicional (Do Nascimento *et al.*, 2022). Diversas atividades biológicas foram descritas para esse gênero, como propriedades antiviral, cicatrizantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiangiogênicas, antitumorais e antioxidantes.

Extratos hidroalcóolicos e aquosos da Bignoniaceae demonstraram atividades contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas, capazes de inibir o crescimento das bactérias (Torres *et al.*, 2013). Brandão *et al.* (2010) relataram que, das nove espécies de Bignoniaceae analisadas com atividade antiviral, cinco pertenciam ao gênero *Arrabidaea*, incluindo *A. brachypoda*. Esta espécie, atualmente reclassificada como *Fridericia platyphylla* (DC.) Bureau, demonstrou atividades antivirais contra alguns vírus humanos, como o HSV-1 e HSV-2, mostrando atividade citotóxica (Brandão *et al.*, 2010).

Fridericia platyphylla, anteriormente conhecida como *Arrabidaea brachypoda*, é um arbusto nativo e não endêmico encontrado em vários estados, principalmente no Cerrado brasileiro (Figura 2), com 1,0 a 2,0 m de altura, abundantemente ramificado, folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (Figura 3) (Rosário, 2023). No Brasil, é conhecida como “cervejinha do campo”, “tintureiro” e “cipó una”, amplamente utilizada na medicina popular para tratar pedra nos rins e dores nas articulações, através do elixir produzido pela maceração de suas cascas em água (Monteiro *et al.*, 2020).

Figura 2 - Mapa de registro de ocorrência de *Fridericia platyphylla*



Fonte: SiBBR (2020)

Figura 3 - *Fridericia platyphylla*



Fonte: Mauricio Mercadante (2015)

Atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e cicatrizante são descritas na literatura para essa espécie (Zorn *et al.*, 2001; Pauletti *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2006).

Segundo Alves e Pereira (2011), os extratos etanólicos de raiz, caule e folhas de *Fridericia platyphylla* apresentam atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O extrato de caule e frutos dessa espécie também revelou atividade antiviral (Brandão *et al.*, 2010). Estudos *in vivo* com o extrato etanólico da raiz de *Fridericia platyphylla* também demonstraram ação anti-inflamatória em ratos e atividade antinociceptiva em camundongos, justificando seu uso na medicina popular para alívio de dores, cálculos renais e algumas condições inflamatórias (Rocha *et al.*, 2011).

Além disso, o extrato hidroetanólico da raiz de *Fridericia platyphylla* demonstrou atividade farmacológica *in vitro* contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e atividade antiparasitária foi observada na fração diclorometânica (Rocha *et al.* 2014).

O potencial biológico de *Fridericia platyphylla* está diretamente relacionado à sua composição química, que inclui diversos metabólitos secundários, como C- glucosilxantonas, fenilpropanóides, flavonoides, antocianidinas, derivados de alantoínas, chalconas, cumarinas, taninos, glicosídeos cardiotônicos, esteróides, saponinas e triterpenos (Rocha *et al.*, 2019). Estudos baseados em métodos espectroscópicos conseguiram isolar e caracterizar dezenove substâncias a partir de folhas, flores, partes aéreas e raízes do extrato hidroetanólico de *Fridericia platyphylla*, no qual os flavonoides e triterpenos são os principais constituintes (Do Nascimento *et al.*, 2022).

Os flavonoides, presentes em praticamente todas as partes da planta (folhas, flores, raízes), são responsáveis por diversas atividades biológicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica e hormonal, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Algumas dessas atividades biológicas descritas para *Fridericia platyphylla* (Santos; Rodrigues, 2017).

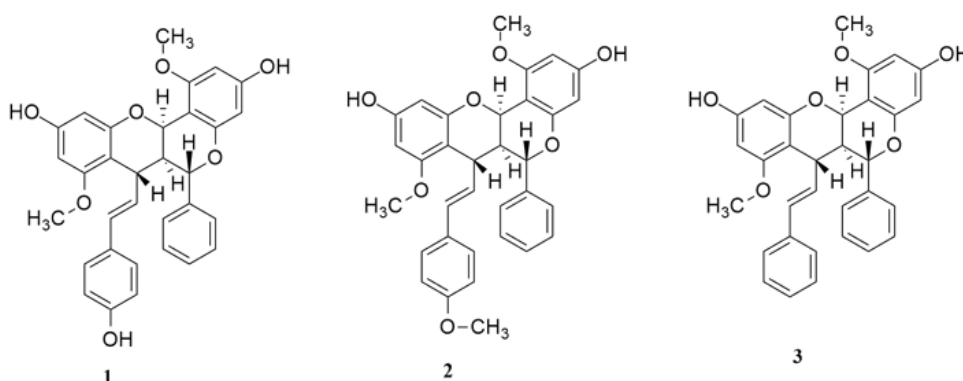
Entre os flavonoides presentes nessa espécie, pode-se citar flavonoides diméricos inéditos denominados brachydinas encontrados no extrato hidroetanólico das raízes, sendo reportados pela primeira vez na família Bignonaceae.

3.3.1.1 Potencial terapêutico das brachydinas isoladas de *Fridericia platyphylla*

Em 2014, Rocha *et al.* isolaram pela primeira vez uma classe incomum de flavonoides diméricos. Essas substâncias foram obtidas a partir da fração diclorometânica (Fr. DCM) do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* e identificadas por meio de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. As substâncias, classificadas como flavonoides diméricos glicosilados, foram nomeadas de brachydinas.

Foram identificadas três moléculas na fração diclorometânica denominadas de brachydina A (BrA), brachydina B (BrB) e brachydina C (BrC). Suas estruturas são compostas por quatro anéis independentes e dois anéis benzopiranos fundidos, diferenciando-se apenas pelos grupos substituintes em um dos anéis (Figura 4) (Rocha *et al.*, 2014).

Figura 4 - Estruturas das brachydina A (1), brachydina B (2) e brachydina C (3).



Fonte: Rocha *et al.* (2014)

Na literatura são descritas propriedades antivirais, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária para essas moléculas (Ribeiro *et al.*, 2022). Rocha *et al.* (2019) demonstrou a atividade antileishmaniana dessas moléculas utilizando as espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Os promastigotas de *Leishmania* foram submetidos ao tratamento com as substâncias em concentrações variando de 0,25 a 20 μM por 72 horas. Brachydina A não foi ativa contra nenhuma espécie de *Leishmania* nas concentrações testadas, enquanto as brachydinas B e C apresentaram potência semelhante e foram ativos contra todas as três espécies de *Leishmania*. Além disso, BrB foi tóxica para amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

No mesmo estudo, foram realizados testes *in vivo* em camundongos BALB/c geneticamente suscetíveis, infectados na derme da orelha com *L. amazonensis* e tratados por via oral com BrB. O resultado obtido foi satisfatório pois a substância reduziu significativamente a espessura da orelha na segunda semana de tratamento.

A fração diclorometânica das raízes revelou que esses três flavonoides diméricos glicosilados apresentam altas atividades *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma cruzi*, o parasita responsável pela doença de Chagas (Rocha *et al.*, 2014). Para a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, BrA era inativa, enquanto BrB e BrC exibiam atividade potente, o estudo demonstrou também que em testes usando camundongos BALB/c fêmeas, BrB foi capaz de reduzir a parasitemia sanguínea e a mortalidade quando comparado aos controles.

Experimentos para verificar o efeito antinociceptivo da fração diclorometânica de *Fridericia platyphylla* foram realizados por Rodrigues *et al.* (2017). No teste de formalina, os resultados mostraram que na fase neurogênica, a morfina e a fração diclorometânica reduziram o comportamento nociceptivo em 72% quando comparados com o grupo tratado com veículo. Durante a fase inflamatória, o controle positivo e a fração reduziram a lambertura da pata

traseira em 47,2%. Os resultados mostram que, em contraste com o extrato polar bruto de *Fridericia platyphylla* que apresenta atividade antinociceptiva apenas durante a segunda fase (dor inflamatória), a fração pode induzir efeitos antinociceptivos durante ambas as fases da dor (neurogênica e inflamatória), contribuindo assim para o alívio da dor aguda em camundongos.

O estudo de Rocha *et al.* (2011) com ratos demonstrou as propriedades anti-inflamatórias do tratamento oral com o extrato etanólico de *Fridericia platyphylla*. O pré-tratamento de animais com o extrato reduziu a resposta de contorção induzida por ácido acético, apresentando um efeito analgésico semelhante ao dos medicamentos de referência. O efeito antinociceptivo do extrato na segunda fase do teste de formalina indicou uma provável atividade anti-inflamatória. Para confirmar essa atividade, foi avaliada a peritonite induzida por LPS. Os resultados mostraram que o extrato reduziu significativamente o número de células recrutadas, indicando que esse extrato contém agentes anti-inflamatórios ativos, com flavonoides como principais constituintes. Isso ressalta o potencial das moléculas presentes na *Fridericia platyphylla*, particularmente, as brachydinas, para o controle farmacológico de processos inflamatórios.

O uso de extratos e frações de plantas, sem a necessidade de isolar os princípios ativos introduz uma perspectiva interessante na busca por fármacos eficazes e de baixos custo de produção. Diversos estudos demonstraram atividades biológicas variadas para as brachydinas isoladas, na fração diclorometânica e no extrato das raízes de *Fridericia platyphylla*, onde todos contem essas moléculas em diferentes quantidades. Esses estudos indicam o alto potencial farmacológico dessas substâncias. Portanto, é estimulado os estudos dessas moléculas quanto ao seu potencial antiviral e anti-inflamatório para verificar a possibilidade de desenvolvimento de futuros fármacos para o tratamento da inflamação causada pela infecção de vírus e outros agentes.

3.4 Estudos de estabilidade de biomoléculas

O desenvolvimento de fármacos está intimamente ligado às ações de controle de estabilidade durante o processo de produção, armazenamento e uso, a fim de garantir a segurança no consumo. Quando se trata de fármacos que têm o potencial de substituir medicamentos já validados no mercado, é essencial priorizar a eficácia e, principalmente, o baixo custo de produção. Algumas moléculas derivadas de plantas medicinais podem ser facilmente degradadas quando isoladas, perdendo assim sua atividade farmacológica (Neiva, Trevisan, 2021). Quando um medicamento não possui estabilidade adequada, o paciente pode

correr riscos devido à diminuição do efeito terapêutico ou efeitos adversos e toxicidade devido a formação de produtos de degradação (Silva, Andrade, Oliveira, 2024).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os estudos de estabilidade são classificados como acelerados, longa duração, acompanhamento, de degradação forçada e de estabilidade em uso (Brasil, 2019). A degradação forçada é uma metodologia empregada na análise da estabilidade de compostos farmacêuticos com o objetivo de identificar produtos e compreender os mecanismos de degradação. Para acelerar e observar a degradação do fármaco, esses estudos expõem a substância a condições extremas de estresse (Silva, Andrade, Oliveira, 2024).

A estabilidade dos medicamentos é influenciada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem interações entre fármacos, interações entre fármacos e excipientes ou solventes, tamanho das partículas, pH do meio e qualidade da embalagem, entre outros. Os fatores extrínsecos, também conhecidos como ambientais, abrangem as condições que podem alterar o fármaco, como temperatura, luz e umidade (Facci *et al.*, 2020).

A temperatura desempenha um papel crucial na estabilidade dos medicamentos, afetando diretamente os processos de degradação química e física. O aumento da temperatura pode provocar a quebra de ligações químicas, resultando em reações de degradação como a descarboxilação e a desidratação. Os grupos químicos nos fármacos mais sensíveis a essas reações incluem carboxilas, álcoois e polióis. Por isso, é fundamental controlar a temperatura de exposição para evitar essas degradações (Silva, Andrade, Oliveira, 2024).

A luz é outro fator que pode induzir a degradação dos fármacos, pois pode desencadear reações fotoquímicas que levam à degradação dos componentes ativos. A luz ultravioleta, em particular, é conhecida por causar danos significativos, alterando as estruturas moleculares dos medicamentos e produzindo produtos indesejados (USP, 2020). Testes de fotoestabilidade são realizados para avaliar a resistência de um medicamento à luz. Essas pesquisas simulam os efeitos da luz solar e artificial, expondo um produto farmacêutico à luz intensa com fontes que emitem luz visível e ultravioleta (Facci *et al.*, 2020). Após a exposição, as amostras são analisadas para identificar mudanças químicas, como a degradação do fármaco e a formação de produtos de degradação, além de mudanças físicas, como alterações de cor ou odor. Os resultados desses estudos ajudam a definir as condições adequadas de armazenamento e, se necessário, a criação de embalagens que protejam o medicamento da luz (Brasil, 2019). Muitos medicamentos podem conter substâncias fotossensíveis que, ao serem aplicados na pele, tornam o indivíduo sensível à luz, gerando efeitos graves (Neiva, Trevisan, 2021).

A garantia da estabilidade do fármaco é promovida através de técnicas analíticas, como os métodos cromatográficos e espectrofotométricos que visam garantir que o medicamento seja seguro, eficaz e estável para consumo, além de determinar por quanto tempo é propício ao uso (Facci *et al.*, 2020).

Entre as técnicas mais comuns, destacam-se as técnicas termoanalíticas de termogravimetria (TG). As técnicas termoanalíticas são aquelas que determinam as propriedades físicas e químicas das substâncias em função de uma variação programada de temperatura aplicada ao sistema, permitindo inferir sobre o comportamento térmico do material. Os principais eventos observados durante as análises térmicas incluem fusão, decomposição, dessolvatação, desidratação, transições de fase e cristalização. As análises de TG medem a perda de massa em função da temperatura, sendo importantes para determinar a estabilidade térmica de uma amostra (Facci *et al.*, 2020).

Assim, o estudo da estabilidade assegura que o produto farmacêutico mantém suas qualidades iniciais, dentro dos limites estabelecidos, ao longo de seu período de validade. Considerando a diversidade climática das diversas regiões do Brasil, o estudo da estabilidade dos fármacos torna-se essencial para garantir a eficácia terapêutica e a segurança do paciente.

3.5 Docagem molecular de biomoléculas

Antes de ser comercializado em qualquer país, um novo produto medicinal deve apresentar evidências de segurança, eficácia e qualidade às agências reguladoras, comprovando que desempenha sua função terapêutica conforme o uso pretendido. Tradicionalmente, essas evidências são geradas por meio de experimentos controlados, como ensaios *in vitro* e *in vivo*, desenvolvidos para simular as condições reais de ação do medicamento (Jose *et al.*, 2022). Contudo, com os avanços da bioinformática e das tecnologias computacionais, as simulações computacionais, conhecidas como ensaios *in silico*, têm se mostrado particularmente útil no fornecimento de evidências para a eficácia de medicamentos fitoterápicos e passaram a ser aceitas pelas autoridades regulatórias como uma ferramenta complementar (Rigby, 2024).

Dentre as metodologias *in silico*, destaca-se a docagem molecular (*molecular docking*), considerada uma das técnicas mais importantes e amplamente empregadas no desenvolvimento de fármacos (Agu *et al.*, 2023). Essa abordagem computacional, também conhecida como ancoragem molecular, tem sido aplicada desde o início da década de 1980 na triagem virtual de interações entre ligantes e receptores (Dassanayake *et al.*, 2022).

Seu objetivo é prever como uma molécula bioativa (ligante) interage com seu alvo molecular (geralmente uma proteína), identificando a melhor conformação e orientação espacial para a formação de um complexo estável. A partir dessa previsão, é possível estimar a afinidade de ligação e a força de interação, priorizando, assim, os compostos com maior potencial, uma vez que, o princípio fundamental da docagem é que compostos que se encaixam corretamente no sítio de ligação do receptor têm maior probabilidade de apresentar atividade biológica do que aqueles que não se ancoram (Stanzione *et al.*, 2021; Rigby, 2024).

A popularização da técnica foi impulsionada pela crescente disponibilidade de estruturas tridimensionais de proteínas e moléculas, bem como pelo avanço na capacidade computacional (Stanzione *et al.*, 2021). Atualmente, há uma ampla variedade de softwares e algoritmos para realização da docagem, tanto gratuitos quanto comerciais, como: AutoDock Vina, AutoDock GOLD, Glide, Discovery Studio, DOCK, , FlexX, LeDock, entre outros. Destes, AutoDock Vina, Glide e GOLD são amplamente reconhecidos por sua precisão e eficiência (Agu *et al.*, 2023; Dassanayake *et al.*, 2022).

Para um estudo de docagem molecular, é necessário obter as estruturas 3D tanto da proteína-alvo quanto dos ligantes. As proteínas são geralmente obtidas por técnicas como cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear (RMN) ou criomicroscopia eletrônica (cryo-EM), e estão disponíveis em bancos de dados como o Protein Data Bank (PDB). Já os ligantes, são moléculas potencialmente ativas e frequentemente derivadas de compostos naturais com base em usos tradicionais ou literatura científica, com suas estruturas podendo ser obtidas de bases como o PubChem (Rigby, 2024; Stanzione *et al.*, 2021).

Após o preparo das estruturas tridimensionais, a etapa de simulação computacional consiste na geração de diversas conformações e orientações (poses) do ligante dentro do sítio de ligação da proteína. Essas poses são avaliadas por meio de funções de pontuação (*scoring functions*), que classificam as interações com base na combinação e otimização de variáveis como complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática (Gondim, 2022). Funções de pontuação podem ser empíricas, baseadas em campos de força ou em conhecimento estatístico, e a pose com a maior afinidade geralmente corresponde àquela com a energia livre de ligação mais negativa (Rigby, 2024).

Além de acelerar a descoberta de novos fármacos, as ferramentas de docagem molecular são essenciais para entender as bases moleculares dos efeitos farmacológicos, funcionando como aliadas na substituição, refinamento e redução de experimentos com animais. Embora não substituam completamente os ensaios clínicos, as abordagens *in silico* oferecem evidências

científicas robustas, com menor custo, maior agilidade e menor impacto ético (Gondim, 2022; Jose *et al.*, 2022).

3.5.1 Alvos moleculares do SARS-CoV-2 comumente utilizados em estudos de docagem

Durante a pandemia da COVID-19, a docagem molecular ganhou destaque como uma alternativa eficiente para a triagem de compostos com potencial antiviral devido a rapidez dos resultados. Nesse contexto, é essencial compreender os principais alvos utilizados em estudos de docagem voltados à COVID-19.

A proteína Spike é a maior proteína codificada pelo genoma do SARS-CoV-2, sendo responsável por mediar a entrada do vírus nas células hospedeiras. Sua principal função é se ligar ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), desencadeando o processo de fusão entre as membranas viral e celular (Gupta *et al.*, 2021). Após essa ligação, o RNA viral é liberado no interior da célula, iniciando o ciclo de replicação do vírus. Devido à sua relevância funcional, a proteína Spike é o principal alvo de várias vacinas desenvolvidas para prevenção da COVID-19, uma vez que sua neutralização pode impedir a infecção (Basu *et al.*, 2020).

A ECA2, por sua vez, é uma enzima expressa principalmente nas células epiteliais do trato respiratório. Essa proteína atua como receptor de entrada para o SARS-CoV-2, apresentando alta afinidade pela proteína Spike, podendo influenciar a susceptibilidade à infecção, reforçando sua relevância como alvo terapêutico indireto (Gupta *et al.*, 2023).

Outro alvo relevante é o complexo Spike/ECA2, formado durante a interação entre a proteína viral e o receptor humano. Uma proteína pode conter dois sítios de ligação distintos: o sítio funcional (ativo), responsável pela atividade fisiológica da proteína, e o sítio regulador (alostérico), onde a ligação de uma molécula moduladora pode alterar a conformação da proteína e, consequentemente, sua atividade (Basu *et al.*, 2020). No caso do complexo formado entre a proteína Spike e a ECA2, esse tipo de modulação pode interferir diretamente no processo de entrada do vírus na célula hospedeira. Assim, ligantes em sítios reguladores pode modificar a conformação da proteína, alterando a afinidade e a eficácia da ligação funcional (Gupta *et al.*, 2023).

Por fim, destaca-se a protease principal do vírus (Mpro), uma enzima essencial para o processamento das poliproteínas virais e para o ciclo de vida do vírus com a função de replicação do genoma viral na célula (Gupta *et al.*, 2021b). Por ser altamente conservada entre os coronavírus e não possuir homólogos em humanos, a Mpro tem sido amplamente explorada como alvo terapêutico em estudos de docagem (Gonçalves *et al.*, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material vegetal

As raízes de *Fridericia platyphylla* foram coletadas em agosto de 2023, na região do cerrado do estado de Minas Gerais, na fazenda Sant'Ana da Serra, localizada no município de João Pinheiro (latitude 17°44'33" Sul e longitude 46°10'21" Oeste).

A identificação taxonômica foi realizada pela professora Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias, vinculada ao Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto, onde a amostra foi registrada sob o número 17.935. A coleta do material vegetal foi devidamente autorizada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com o número de cadastro A451DE4.

4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico

As raízes foram inicialmente secas em estufa a 40 °C e, em seguida, trituradas utilizando um moinho de facas. O pó obtido (400 g) foi submetido a um processo de extração exaustiva por percolação, utilizando uma mistura de etanol/água na proporção de 7:3 como solvente. Após o término da extração, o material vegetal residual foi descartado, e o líquido extraído foi concentrado por rotaevaporação sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 40 °C.

O extrato bruto foi então liofilizado para garantir a completa remoção dos solventes. Como resultado, obteve-se 68,59 g do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla*, correspondendo a um rendimento de 17,15%.

4.3 Obtenção da fração diclorometânica (Fr. DCM)

O extrato bruto foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, no qual 15 g do extrato foram dissolvidos em 400 mL de uma mistura de água/metanol na proporção 7:3. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas com 200 mL de diclorometano, retirando-se a fase diclorometânica após cada adição, e adicionando mais 200 mL do solvente para repetição do processo. As coletas da fase orgânica foram realizadas nos intervalos de 24, 30 e 48 horas.

Esse procedimento foi repetido três vezes, visando obter uma fase diclorometânica (fase de interesse) o mais purificada possível. No final, todas as frações diclorometânicas obtidas foram reunidas. Após a evaporação do solvente, obteve-se 5,30 g de Fr. DCM, com um rendimento equivalente a 11,78%.

4.4 Fracionamento de Fr. DCM

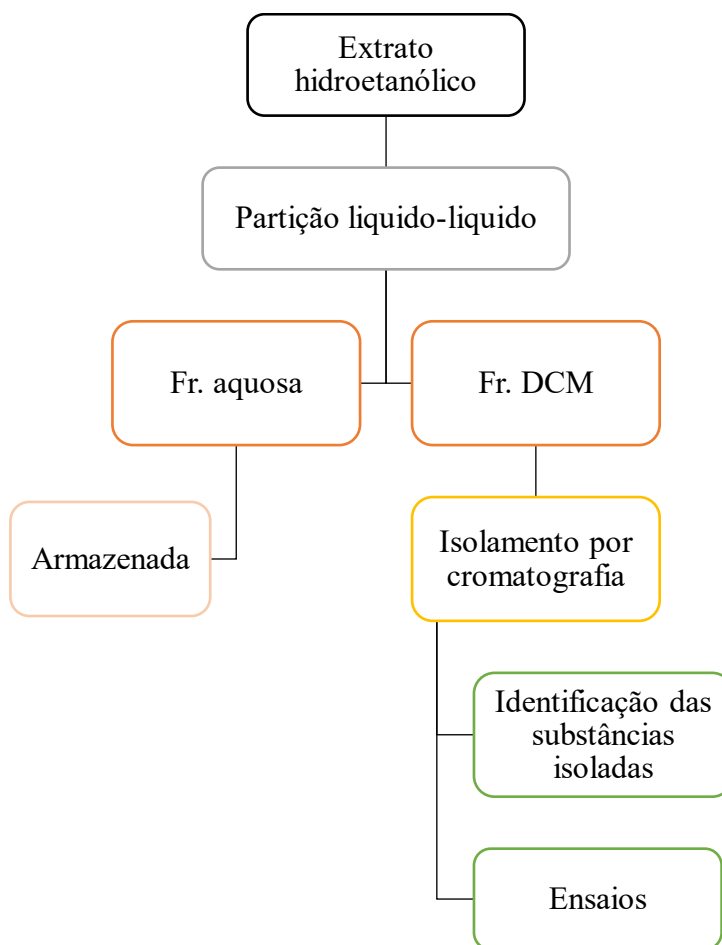
A fração obtida com diclorometano (Fr. DCM) foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna aberta, com o objetivo de isolar os compostos presentes. Utilizou-se uma coluna de vidro com dimensões de 60 × 14 cm, preenchida com sílica gel (0,063–0,200 mm) como fase estacionária. A coluna foi inicialmente empacotada com hexano 100%, e 3,5 g da amostra foram aplicados cuidadosamente no topo da coluna.

A eluição foi conduzida com um gradiente de polaridade crescente, utilizando misturas de hexano e acetato de etila como fase móvel, iniciando com hexano puro (100%) até alcançar a proporção de 64:36 (hexano:acetato de etila).

As frações foram coletadas com taxa de fluxo de 30 gotas por minuto. Cada fração foi submetida à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e agrupadas com base na similaridade de seus perfis, utilizando a mistura diclorometano/metanol (9,5:0,5) como fase móvel. As placas foram reveladas com solução de ácido sulfúrico-p-anisaldeído para visualização dos perfis químicos.

A Figura 5 apresenta um fluxograma com as principais etapas do fracionamento e direcionamento das frações obtidas a partir do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla*.

Figura 5 - Etapas do processamento do extrato das raízes de *Fridericia platyphylla*.



Fonte: Autora (2025)

4.5 Identificação dos constituintes químicos

4.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As substâncias isoladas da Fr. DCM, bem como a própria fração, foram dissolvidas em metanol grau HPLC na concentração de 5 mg/mL. As soluções foram filtradas utilizando filtros Millex com porosidade de 0,22 μm . Aliquotas de 20 μL foram injetadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), equipado com um módulo de injeção de solventes com bomba binária e um detector UV-Vis (SPA 10A), ajustado para 254 nm e uma coluna Luna C18 (5 μm , 100 Å, 250 mm $\times$ 4,6 mm).

A fase móvel consistiu em (A) água deionizada e (B) metanol acidificado com 0,01% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi programado de 70% a 100% de B ao longo de 35 minutos, com fluxo constante de 1 mL/min. Os dados cromatográficos foram adquiridos e processados por meio do software *LC Solution 2.3* (Shimadzu).

4.5.2 Espectrometria de Massas

Foram realizados em LCQ Equipamento de frota (Thermo Scientific) equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo (FIA). A amostra foi analisada por ionização por eletrospray (ESI), a fragmentação em múltiplos estágios (MS², MS³ e MSⁿ) foi realizada em uma interface de prisão de íon (IT). O modo positivo foi selecionado para a geração e análise dos espectros de massa para primeira ordem (MS) e para demais experimentos multi estágios nas seguintes condições: tensão capilar, 25 V; Voltagem spray, 5 kV; e temperatura capilar, 275 °C. Um gás de arraste (N₂) com um fluxo de 8 unidades arbitrárias (A.U.), e o gás de colisão foi o hélio (He). A aquisição da faixa foi *m/z* 100-2000. Os dados foram processados utilizando o software *Xcalibur* versão 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, MA).

4.6 Estudos de estabilidade

4.6.1 Análise termogravimétrica

Foram realizadas utilizando 2 mg de BrA, BrB e BrC em um cadinho de platina, empregando um analisador termogravimétrico modelo Q5000 da TA Instruments, alocado no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Taxas de aquecimento de 2, 5, 10, 15 e 20 °C min⁻¹ foram aplicadas para determinar os valores da energia de ativação, usando o método não isotérmico livre de modelo de Flynn-Wall-Ozawa (FWO). Os experimentos foram realizados sob atmosfera inerte de N₂ com uma taxa de fluxo de 50 mL min⁻¹.

Para a aplicação do método de Flynn-Wall-Ozawa (FWO), foram utilizados valores de conversão α entre 0,05 e 0,35, conforme a equação:

$$\alpha = \frac{(m_0 - m_t)}{(m_0 - m_f)} \quad \text{Eq. 1}$$

Em que m_0 , m_t e m_f representam, respectivamente, a massa inicial, a massa no tempo t durante o processo de pirólise, e a massa final da amostra (Farid-ul-Haq *et al.*, 2020; Mucha *et al.*, 2016). Os cálculos foram conduzidos a partir da equação cinética geral:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(t)f(\alpha) \quad \text{Eq. 2}$$

Onde k é a constante de velocidade de decomposição, $f(\alpha)$ representa o modelo cinético da reação, t é o tempo, e α é a taxa de conversão. Substituindo-se a equação de Arrhenius (Eq. 3) em $k(t)$, obtém-se:

$$k = A \exp - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq. 3}$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp \left(\frac{-E_a}{RT} \right) f(\alpha) \quad \text{Eq. 4}$$

Onde A representa o fator pré-exponencial de Arrhenius, E_a é a energia de ativação, R é a constante universal dos gases, e T é a temperatura. Na análise não isotérmica, a temperatura varia com o tempo segundo a taxa de aquecimento β . Essa abordagem permite a combinação das equações 4 e 5 para dar a equação 6 (Chen *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2022).

$$\beta = \frac{dT}{dt} \quad \text{Eq. 5}$$

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{\beta} \exp \left(\frac{-E_a}{RT} \right) f(\alpha) \quad \text{Eq. 6}$$

Reescrevendo a equação, tem-se:

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\beta} \int_{T_i}^{T_f} \exp \frac{-E_a}{RT} dT \quad \text{Eq. 7}$$

Definindo que:

$$x = \frac{-E_a}{RT} \quad \text{e} \quad g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)}$$

Aplicando as definições acima na equação 7, tem-se:

$$g(\alpha) = \frac{AE_a}{\beta R} \int_{x_i}^{x_f} \frac{e^x}{x^2} dx \quad \text{Eq. 8}$$

Aplicando a aproximação de Doyle (1962), a integral da equação 8 pode ser expressa pela função $p(x)$:

$$p(x) = -2,153 - 0,4569x \quad \text{Eq. 9}$$

Ao substituir a aproximação proposta por Doyle (Eq. 9) na integral da Eq. 8, obtém-se a expressão logarítmica apresentada na eq. 10:

$$\log(\beta) = \log \frac{AE_a}{Rg(\alpha)} - 2,315 - 0,457 \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq. 10}$$

Convertendo a equação para logaritmo natural, tem-se a forma final expressa na equação 11:

$$\ln(\beta) = \ln \frac{AE_a}{Rg(\alpha)} - 5,3305 - 1,052 \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq. 11}$$

Com base nessa equação, é possível determinar a energia de ativação (E_a) para BrA, BrB e BrC por meio do coeficiente angular da reta obtida no gráfico de $\ln(\beta)$ versus $1/T$ (Mucha *et al.*, 2016; Chatake *et al.*, 2024).

4.6.2 Análise de gases evoluídos

Foram realizadas utilizando um analisador térmico simultâneo - STA6000/Frontier PerkinElmer, com 2 mg de BrA, BrB e BrC em um cadinho de platina, sob uma atmosfera de oxigênio e nitrogênio, com uma taxa de fluxo de gás de 20 mL min⁻¹ e uma taxa de aquecimento (β) de 40 °C min⁻¹ dentro de uma faixa de temperatura de 50 °C a 350 °C. A bomba de vácuo foi configurada para 50 mL min⁻¹ e o tubo de transferência aquecido (zona de aquecimento de hifenização) foi mantido a 300 °C. Para evitar a condensação de substâncias voláteis, a célula de gás FTIR foi aquecida a 330 °C. A análise IR dos gases evoluídos utilizou 4 varreduras por repetição dentro da faixa de 4000-450 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, adquirindo 2 espectros por minuto, resultando em aproximadamente 40 espectros por análise.

A deconvolução da curva da primeira derivada da análise TG (dTG) foi realizada em experimentos utilizando uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, visando avaliar o número potencial de etapas de degradação associadas à perda de massa.

4.6.3 Fotoestabilidade

Sem adição de catalisador

Uma solução de Fr. DCM foi preparada na concentração de 20 ppm em água, submetida a banho ultrassônico por 30 minutos, e pH ajustado para 7. Alíquotas dessa solução foram filtradas e analisadas em espectrofotômetro UV-Vis.

Com o objetivo de simular a exposição à luz solar em condições ambientais, a solução foi exposta à luz visível por 14 horas, sob agitação constante, utilizando-se uma lâmpada de tungstênio de 300 W (Osram®, modelo ULTRA-VITALUX 230V E27/ES). A degradação da amostra foi avaliada com base na variação da absorbância antes e após a exposição à luz, conforme a equação 12, descrita por Dargahi *et al.* (2018):

$$HDE = \frac{(A_o - A_f)}{A_o} \times 100\% \quad \text{Eq. 12}$$

Onde:

A_o é a absorbância inicial;

A_f é a absorbância final após o tratamento.

Com adição de catalisador

Uma nova solução de Fr. DCM a 20 ppm foi preparada em água e submetida a banho ultrassônico por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mg de dióxido de titânio (TiO₂) a 10 mL da solução, com o pH ajustado para 7. O sistema foi novamente submetido ao banho ultrassônico por mais 30 minutos, a fim de assegurar a completa dispersão do catalisador.

Para análise em espectrofotômetro UV-Vis, alíquotas da solução foram coletadas, centrifugadas a 3.600 rpm por 30 minutos, filtradas e analisadas. Posteriormente, a amostra foi exposta à luz visível sob agitação contínua por 14 horas, nas mesmas condições descritas anteriormente. A degradação foi avaliada conforme descrito na equação 12.

4.7 Docagem molecular

As estruturas 3D das proteínas utilizadas e seus respectivos códigos: Spike (6VXX), ECA2 (1R42), Mpro (6LU7) e Spike/ECA2, foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Os cálculos de docagem molecular foram realizados usando o software AutoDock Vina. Os ligantes e proteínas foram preparados para os cálculos com AutoDock Tools (ADT) 1.5.6. Hidrogênios foram adicionados a ambos os receptores e ligantes individualmente. As cargas de Gasteiger foram então calculadas por ADT e os hidrogênios apolares foram fundidos. O tamanho da caixa de grade foi definido para 40 Å para cada eixo. As caixas de grade foram centradas nas coordenadas dos átomos dos resíduos localizados na região do sítio ativo e região de interface. Para as simulações de acoplamento molecular, o número de modos de ligação foi ajustado para 50, permitindo a geração de múltiplas conformações para análise. A exaustividade da busca foi definida como 24, garantindo uma exploração mais ampla do

espaço conformacional. Um total de 140 cálculos de encaixe molecular foram realizados. Os melhores valores de energia de ligação (ΔG_{bind}) foram estabelecidos como critério para a eficiência da interação.

4.8 Estudos *in vitro*

4.8.1 Cultura de células

Foram utilizadas células epiteliais basais alveolares humanas A549 adquiridas em colaboração com a Profa. Dra. Roberta Sessa Stilhano Yamuguchi, da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa. As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco com alta concentração de glicose (DMEM High glucose, Gibco BRL, Co., Grand Island, New York, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco BRL. Co.) e 1% de solução antibiótica contendo penicilina e estreptomicina. As culturas celulares foram incubadas em estufa a 37 °C, sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.8.2 Citotoxicidade de Fr. DCM

A avaliação da viabilidade das células A549 utilizando a Fr. DCM foi realizada por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), obtido da Sigma-Aldrich (M5655). As células foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^3 células por poço.

Após 12 horas de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram tratadas com diferentes concentrações da Fr. DCM (12,5; 25; 50 e 100 µg/mL), preparadas pela diluição da solução estoque (100 mg/mL em DMSO) em meio DMEM, a concentração final de DMSO nas soluções de tratamento variou de 0,0125% a 0,1% (v/v).

Como controle negativo, foram utilizados poços contendo apenas células tratadas com meio DMEM. Para controle do veículo, células foram tratadas com meio DMEM contendo DMSO a 0,1% (v/v), a fim de verificar possível toxicidade do solvente.

A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço. Após nova incubação de 4 horas, o sobrenadante foi novamente retirado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 µL de álcool isopropílico, com agitação por 10 minutos. A absorbância foi então medida em espectrofotômetro (Epoch 2 – Biotek, Vermont, EUA) em comprimento de onda de 595 nm.

4.8.3 Lesão pulmonar aguda

As células A549 foram cultivadas em placas de 96 poços, com uma concentração de 5×10^3 células por poço. Após 12 horas, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, as células receberam tratamento com soluções de Fr. DCM em DMSO, nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL, diluídas em meio DMEM. Após 1 hora de incubação, foi adicionado lipopolissacarídeo (LPS) nas concentrações de 150 µg/mL e 200 µg/mL.

Em seguida, a placa foi incubada por 23 horas a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido esse período, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Para isso, o sobrenadante foi removido e cada poço foi tratado com 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL), permanecendo por 4 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi novamente retirado e os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 µL de álcool isopropílico, com agitação por 10 minutos.

Finalmente, as leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 595 nm.

4.9 Estudos *in vivo*

4.9.1 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/C, machos, com peso médio de 25 gramas e idade entre 6 a 8 semanas, foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME). Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA/UNIFESP), sob nº 1110021224.

Os animais foram mantidos em gaiolas no Biotério da Universidade Federal de São Paulo - Campus Baixada Santista, em ciclos claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a ração e água durante todo o período experimental.

4.9.2 Protocolo de instilação de LPS e salina

Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório (5% para indução, fluxo de oxigênio de 3 L/min) e mantidos com concentração de 1 a 2% durante o procedimento. Foi realizada uma incisão para exposição da traqueia, seguida, da instilação através de uma agulha (0,38x13mm, BD Plastipak) de LPS diluído em salina na dose de 5 mg/kg, nos animais do grupo LPS (Lipopolissacarídeo obtido de *Escherichia Coli* 026:B6/ L3755, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) ou salina no mesmo volume nos animais controle.

Após o procedimento, a incisão foi suturada com linha cirúrgica (nylon 4.0, NPA373, Brasuture), e foi administrada uma gota de lidocaína tópica (Lidovet, Laboratório Bravet Ltda.) no local da incisão, a fim de minimizar a dor.

4.9.3 Tratamento dos animais

Seis horas após a instilação, os animais foram tratados por via intranasal (i.n) com a Fr. DCM, diluída em veículo constituído de DMSO e solução salina (0,9%) na proporção de 7,5:2,5 (v/v) (Bittencourt-Mernak *et al.*, 2017). As doses administradas foram de 25 mg/kg e 50 mg/kg por animal da Fr. DCM. Os grupos controle receberam dexametasona por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 5 mg/kg ou apenas o veículo (i.n). O esquema completo dos grupos experimentais e respectivos tratamentos está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Esquema dos grupos e seus respectivos tratamentos

Grupos	Instilação	Tratamentos	n
Salina	Salina	Veículo (i.n)	7
Salina + Fr. DCM	Salina	Fr. DCM 50 mg/kg (i.n)	5
LPS	LPS	Veículo (i.n)	8
LPS + Fr. DCM 25 mg/kg	LPS	Fr. DCM 25 mg/kg (i.n)	7
LPS + Fr. DCM 50 mg/kg	LPS	Fr. DCM 50 mg/kg (i.n)	8
LPS + DX	LPS	Dexametasona 5 mg/kg (i.p)	7

Fonte: Autora (2025)

4.9.4 Fluido do Lavado broncoalveolar (fLBA)

Após 24 horas da instilação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). Em seguida, foi realizada a abertura da cavidade abdominal para exposição da veia cava inferior, onde foi realizada a eutanásia por exsanguinação.

Para a coleta do fLBA, realizou-se uma traqueostomia, e foram infundidos 0,5 mL de salina por 3 vezes consecutivas (volume total de 1,5 mL) pela cânula traqueal, com o uso de uma seringa de 3 mL (Descarpack, Lifelong Meditech). O fluido foi recuperado e centrifugado a 1800 rpm, a 4°C por 10 minutos (Centrifuge 5424 R, Eppendorf). O sobrenadante foi imediatamente armazenado no -80° C para posterior análise.

O pellet foi ressuspendido em 300 μ L de salina e homogeneizado em vórtex (Quimis Aparelhos Científicos Ltda.). Para a contagem total de células, 10 μ L da suspensão foram misturado a 190 μ L de solução de Turk 1%, e 10 μ L da mistura foram aplicados em uma câmara de Neubauer. A contagem celular foi realizada sob microscópio óptico (Eclipse E200, Nikon) com aumento de 40x, considerando as células presentes nos quatro quadrantes.

Para a contagem diferencial de células, 100 μ L do pellet ressuspendido foram centrifugados em citocentrifuga a 500 rpm, a 4°C, por 6 minutos, com o objetivo de formar o botão celular na lâmina. Posteriormente, as lâminas foram fixadas e coradas por Diff-Quik. A contagem foi realizada sob microscópio óptico, utilizando objetiva de 1000x com óleo de imersão, diferenciando-se as células em macrófagos e neutrófilos até completar um total de 300 células por lâmina.

As leituras foram realizadas de forma cega, de modo que o observador não tinha conhecimento prévio sobre a qual grupo experimental cada lâmina pertencia. Essa abordagem teve como objetivo garantir a imparcialidade na coleta dos dados.

4.9.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de citocinas inflamatórias no fLBA

A dosagem das citocinas inflamatórias, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) foram realizadas no sobrenadante do fLBA por meio do ELISA, utilizando o kit DuoSet® (R&D Systems, Minneapolis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de ELISA foram sensibilizadas com anticorpo de captura específico para cada citocina e incubadas sob agitação por 16 horas. Após esse período as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem, e os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com adição de reagente diluente, sendo então incubadas por 1 hora.

Em seguida, realizou-se nova lavagem e foram adicionadas às placas as amostras (fLBA) e diferentes concentrações das citocinas para construção da curva padrão, e incubou-se por 2 horas. Posteriormente, após nova lavagem, o anticorpo de detecção foi adicionado e as placas incubadas por 2 horas.

Lavou-se novamente as placas, adicionou-se streptavidina e as placas foram incubadas por 20 minutos no escuro. Em seguida as placas foram lavadas e foi adicionado tetrametilbenzidina (TMB), com incubação no escuro por 30 minutos. A reação foi interrompida com adição da solução de parada.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Vermont, EUA), com o software GEN 5.1.1.1 e comprimento de onda de

450 nm. A concentração das citocinas foi determinada com base na curva padrão gerada a partir das concentrações conhecidas.

4.9.6 Extração dos pulmões

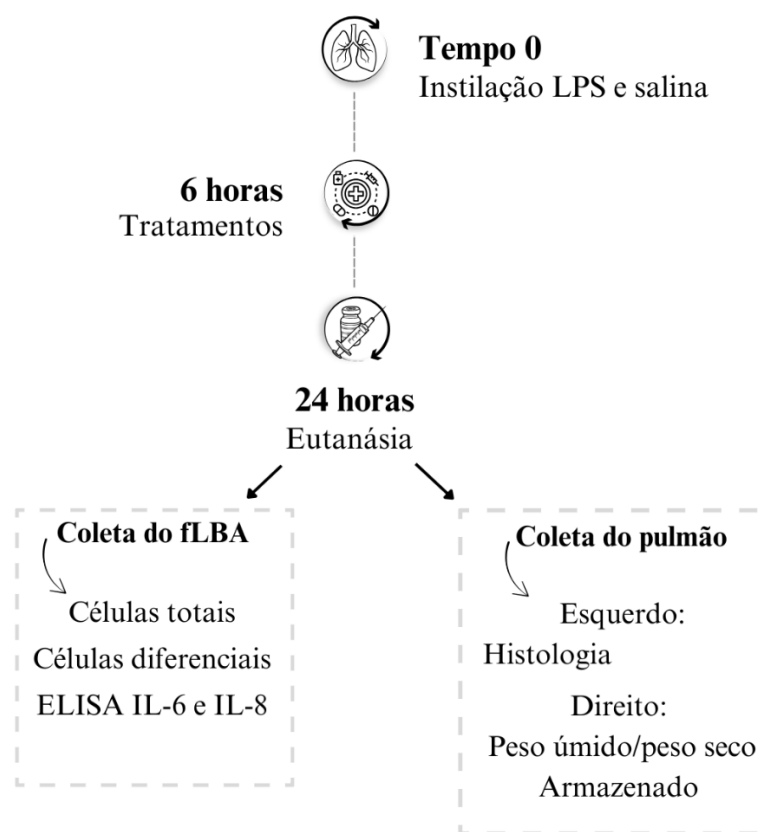
Após a eutanásia e retirada do fLBA, os pulmões foram removidos em monobloco coração-pulmão. O pulmão esquerdo foi fixado em formaldeído 10% por 24 horas, seguido pela transferência para álcool etílico 70%. Posteriormente, foi realizada a inclusão manual do pulmão em parafina, onde o tecido passou por desidratação em concentrações crescente de álcool etílico (80 a 100%), seguida pela diafanização com xilol, e finalizando com a adição em parafina líquida. Após a solidificação da parafina, foi obtido o bloco contendo o tecido pulmonar.

A partir desses blocos foram realizados cortes histológicos com espessura de 5 µm em micrótomo. Os cortes foram colocados em banho-maria (30-40 °C) e depois retirados com lâminas que em seguida foram deixadas para secagem em temperatura ambiente para análises posteriores.

Para a avaliação da relação peso úmido/peso seco do pulmão, um pequeno pedaço do pulmão direito foi removido, imediatamente pesado (peso úmido) e colocado em estufa a 60 °C. O peso seco foi obtido após 24 horas. A relação peso úmido/peso seco foi determinada pela divisão entre os valores obtidos.

O restante do pulmão direito foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer -80 °C para análises posteriores.

Na Figura 6, é apresentado um resumo esquemático da parte experimental do estudo *in vivo* realizado.

Figura 6 - Etapas do protocolo experimental *in vivo*.

Fonte: Autora (2025)

4.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística no programa GraphPad Prism 8. Inicialmente, fez-se um teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliação se os dados eram ou não paramétricos. Os dados foram avaliados quanto à presença de valores outliers utilizando o teste ROUT ($Q = 5\%$). Os valores identificados como outliers foram avaliados separadamente e, quando devidamente justificados, foram excluídos para assegurar a homogeneização dos dados.

Além disso, animais que apresentaram ferimentos visíveis antes da cirurgia experimental foram considerados clinicamente comprometidos e também excluídos da análise, a fim de evitar interferências não relacionadas ao protocolo do estudo. Essa decisão foi tomada para assegurar que os resultados refletissem exclusivamente os efeitos dos tratamentos testados, com a redução do número amostral em alguns grupos ($n = 5$ a 6), a exclusão foi considerada necessária e justificada com base em critérios estatísticos e éticos, visando manter a confiabilidade dos dados obtidos.

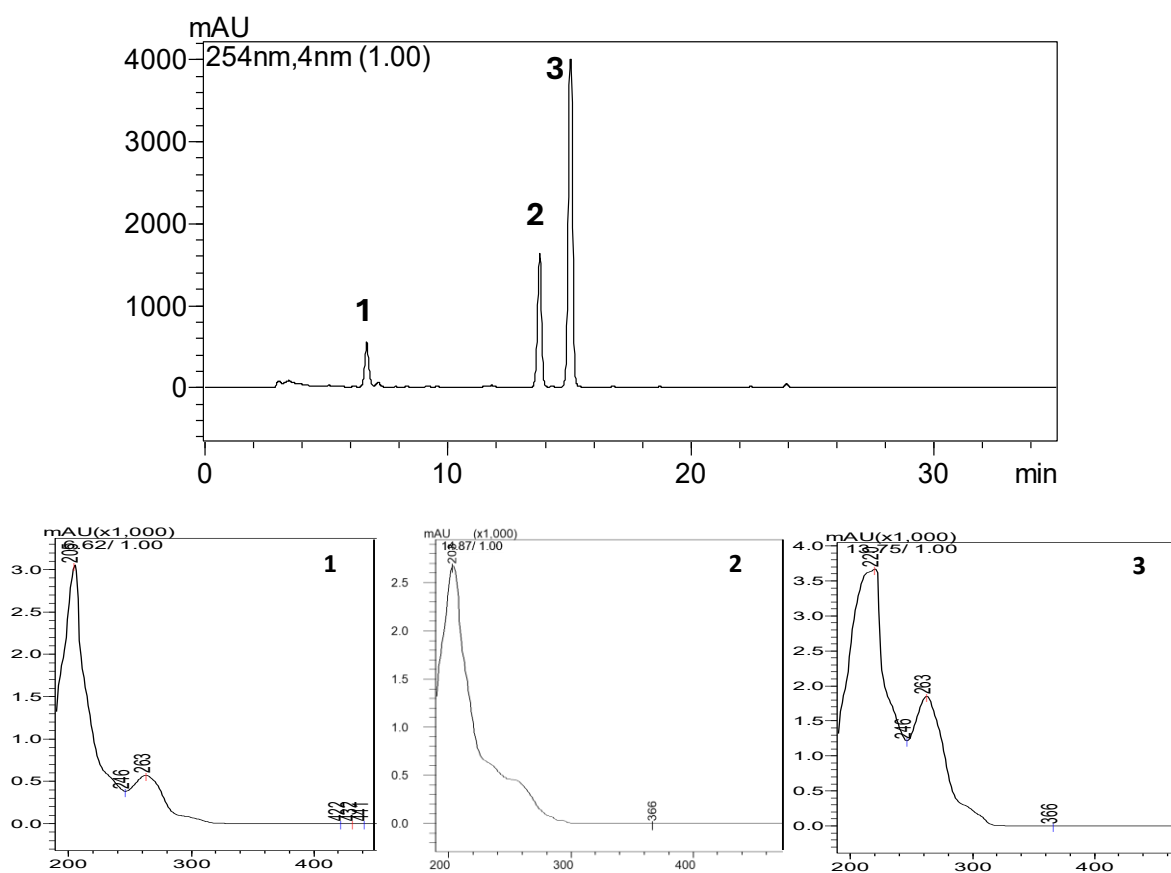
Para análise de comparação entre os grupos utilizou-se análise de Variância One Way ANOVA/ teste não pareado seguido do teste post hoc de Tukey para comparações entre os grupos. Os dados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e foi considerado como significativo os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil cromatográfico e identificação dos constituintes químicos

Para a obtenção das informações sobre a composição química da fração diclorometânica (Fr. DCM) foi realizada uma análise em HPLC-UV/Vis. O perfil cromatográfico, conforme ilustrado na Figura 7, apresentou presença de três picos, correspondentes as três substâncias majoritárias da Fr. DCM e o espectro UV-Vis apresentou bandas de absorção similares indicando que essas moléculas apresentam cromóforos iguais.

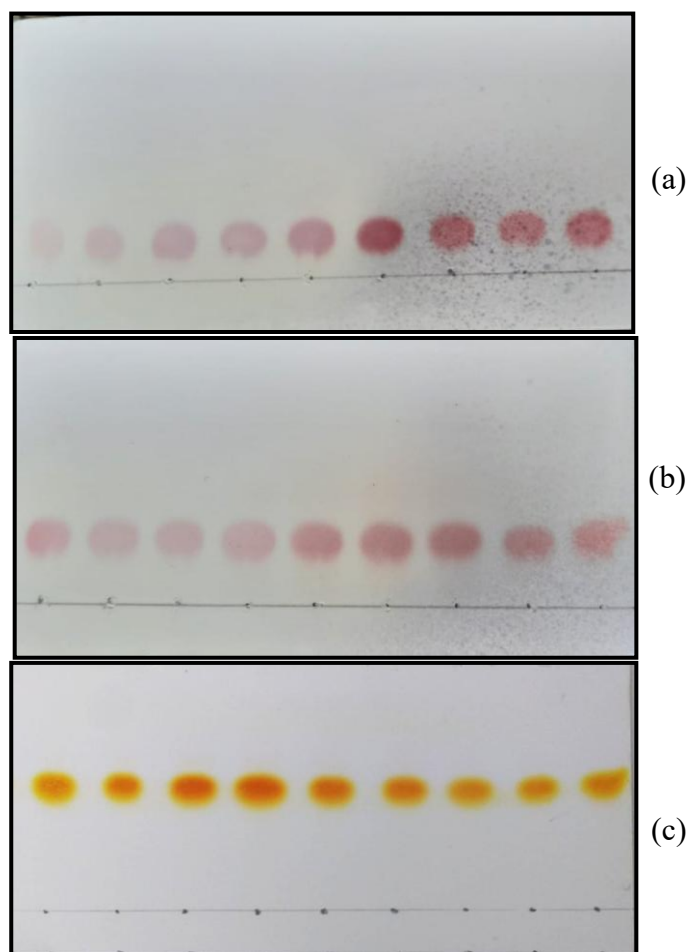
Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração diclorometânica do extrato hidroetanólico das raízes de *Fridericia platyphylla* ($\lambda = 254$ nm) e espectros do UV.



Fonte: Autora (2024)

A partir do fracionamento da Fr. DCM foi possível isolar as três moléculas majoritárias observadas no cromatograma, que foram separadas e agrupadas de acordo com a similaridade da CCD durante o fracionamento (Figura 8).

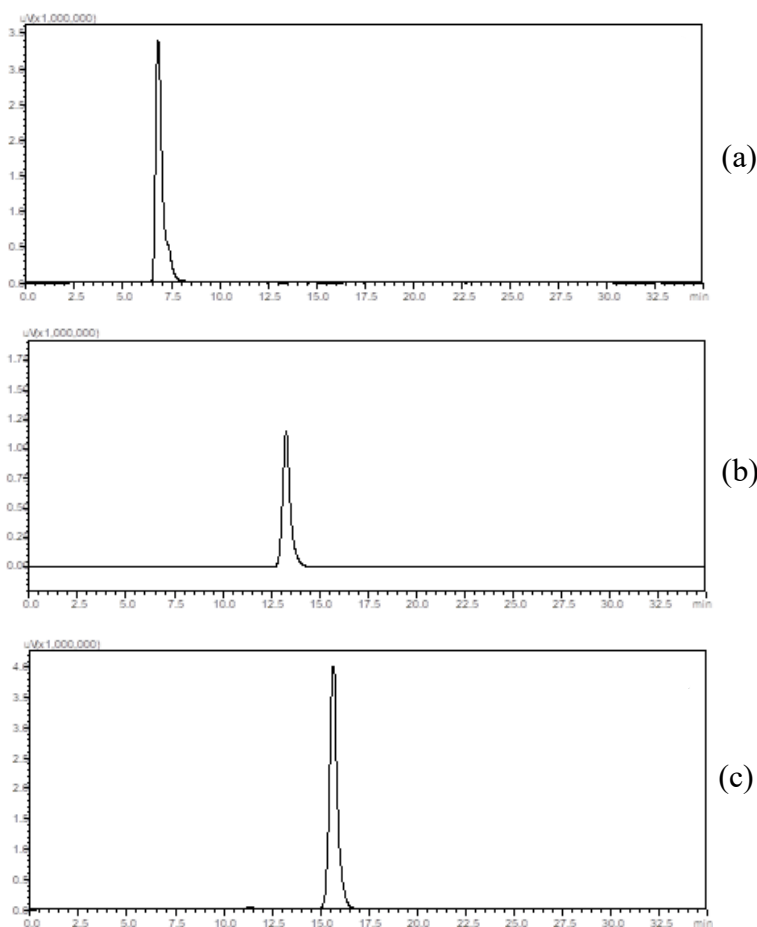
Figura 8 - Cromatografia em camada delgada dos isolados da fração diclorometânica (Fr. DCM): (a) Substância 1, (b) substância 2 e (c) substância 3.



Fonte: Autora (2024)

Para confirmação do isolamento foi realizada uma análise em HPLC-UV/Vis (Figura 9), onde foi possível observar um pico correspondente a cada substância devido os diferentes tempos de retenção.

Figura 9 - Cromatogramas das substâncias isoladas da fração diclorometânica: (a) substância 1; (b) substância 2 e (c) substância 3.



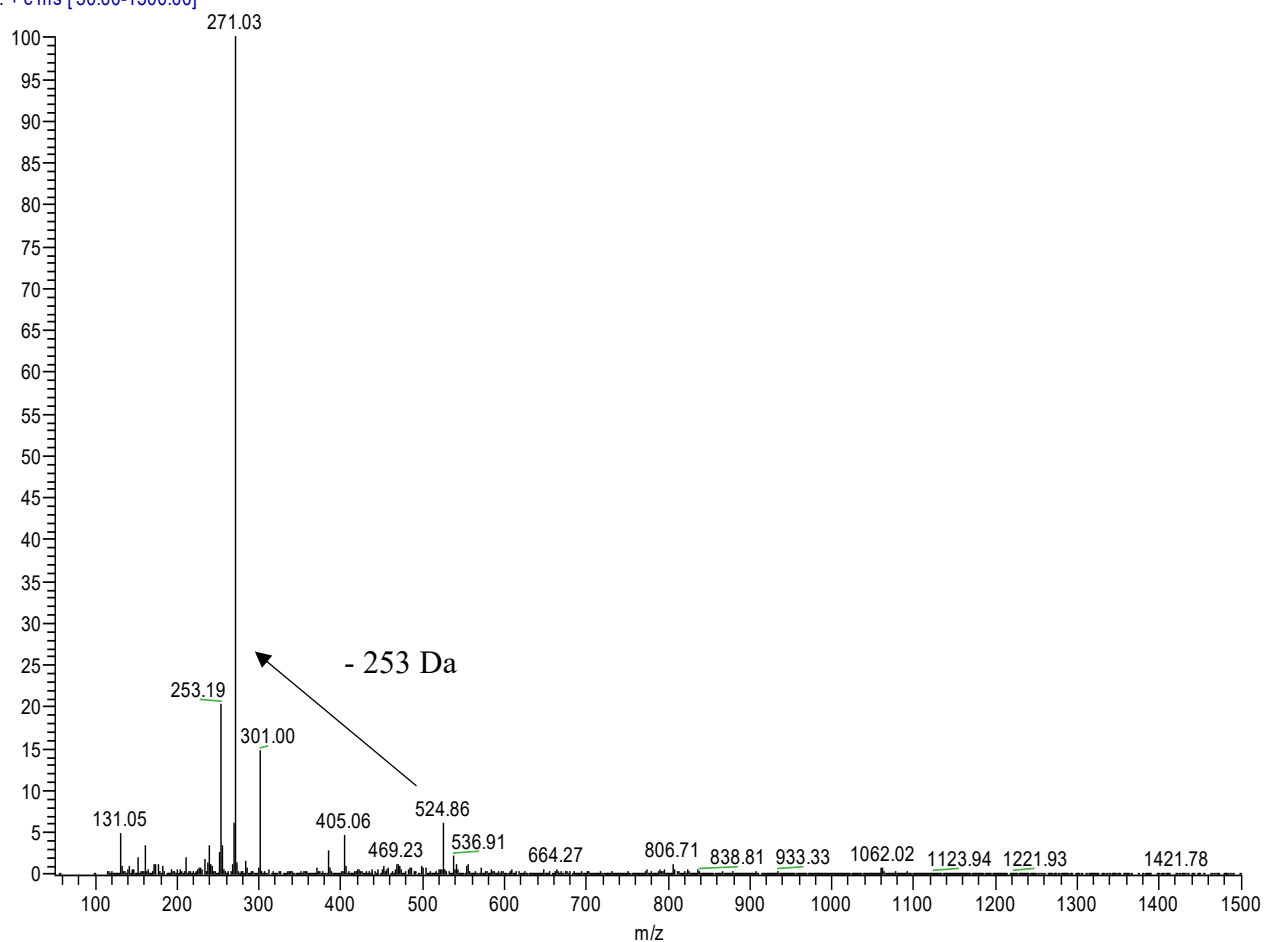
Fonte: Autora (2024)

Rocha *et al.* (2014), identificou moléculas nomeadas de brachydinas em extratos das raízes e fração diclorometânica de *Fridericia platyphylla*. Para fins de desreplicação, a análise das amostras foi aprofundada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS) e o perfil dos metabólitos foram comparados ao de um extrato investigado anteriormente (Rocha *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2017), o que permitiu a identificação das estruturas das substâncias presentes na Fr. DCM, confirmando que se tratava das três brachydinas já descritas anteriormente.

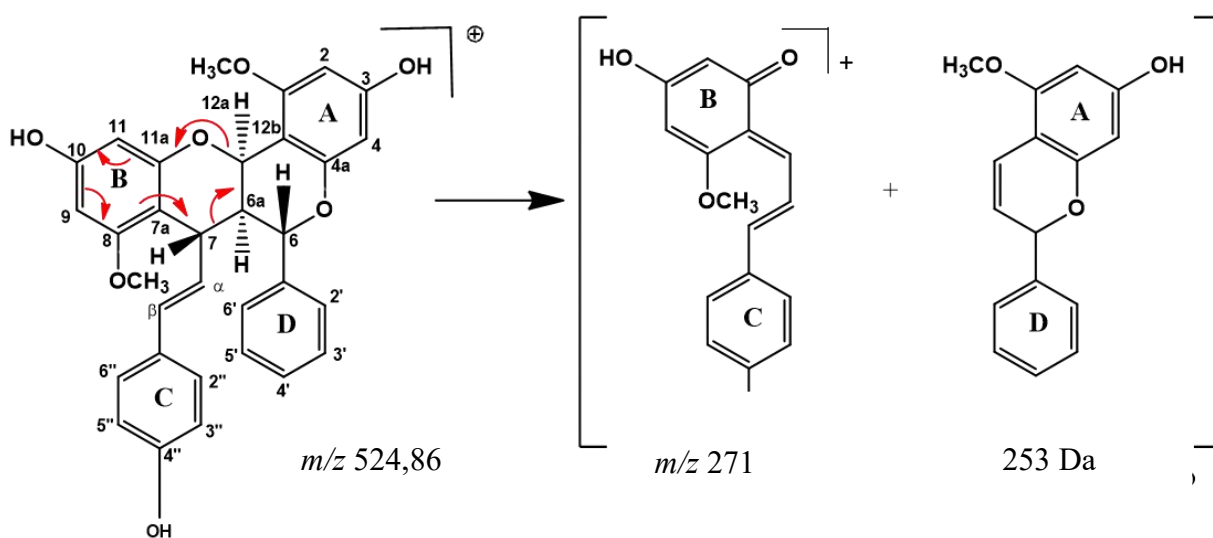
O espectro de massas da substância 1 no modo positivo apresentou pico de íon molecular $[M+H]^+$ m/z 524,86 (Figura 10), correspondente com a fórmula molecular $C_{32}H_{28}O_7$ da brachydina A. O pico com m/z 271,03 vai de acordo com o mecanismo de fragmentação Retro Diels-Alder conforme descrito por Rocha *et al.* (2014), com a clivagem das ligações em C12a e C6a do pirano acoplado ao anel B com a perda de 253 Da (Figura 11).

Figura 10 - Espectro de massas de brachydina A.

APCI90-1 #32-44 RT: 0.72-0.99 AV: 13 SB: 2 0.99, 0.99 NL: 1 86F7
T: + c ms [50.00-1500.00]



Fonte: Autora (2024)

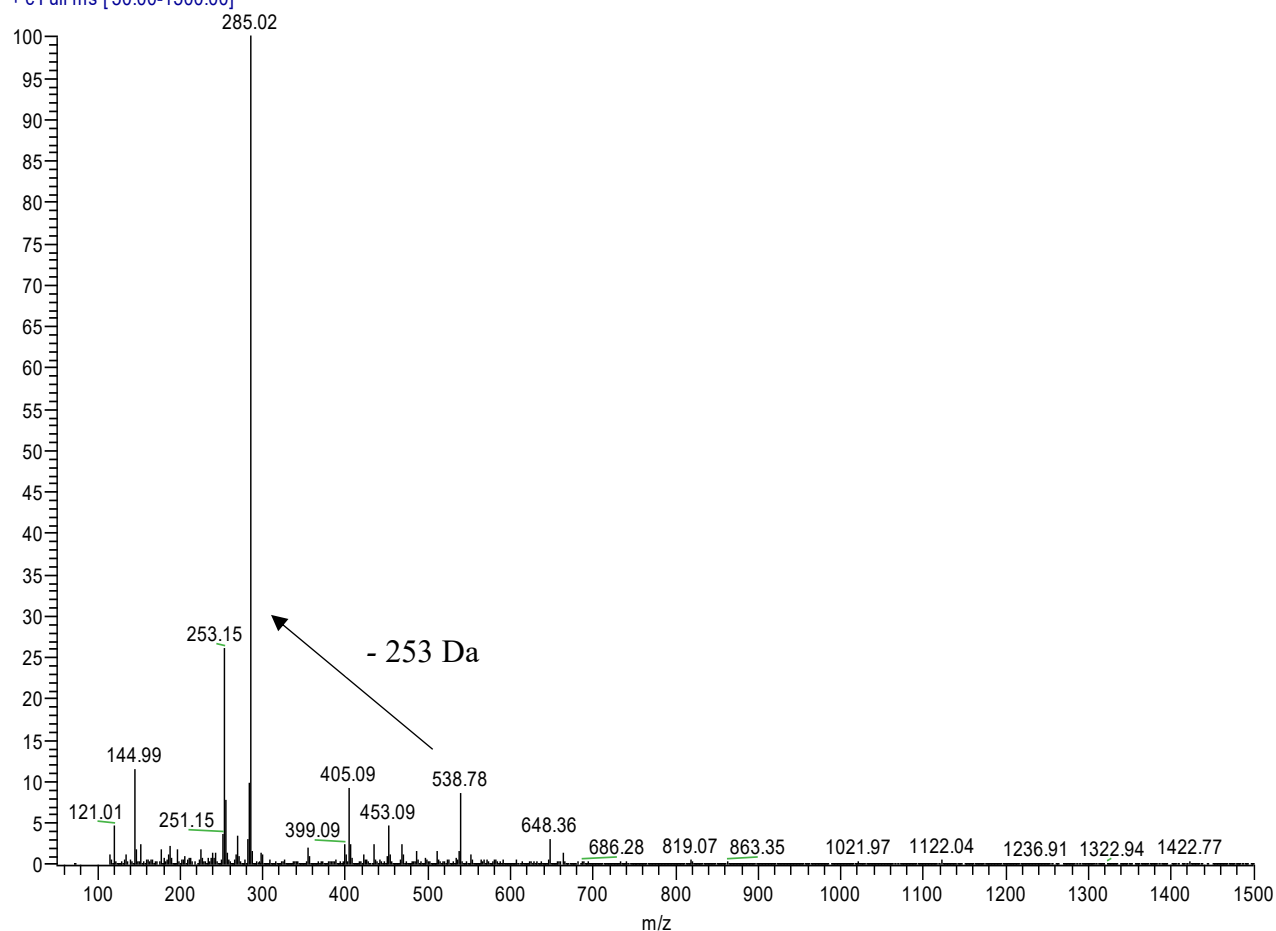
Figura 11 - Proposta de fragmentação de brachydina A.

Fonte: Autora (2024)

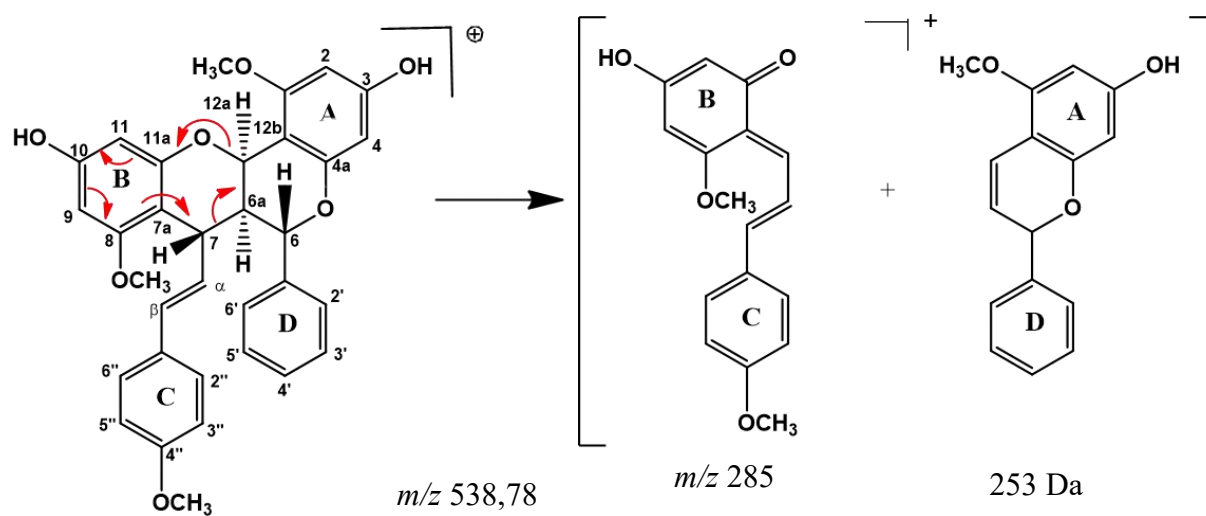
O espectro da substância 2 no modo positivo apresentou pico de íon molecular $[M+H]^+$ m/z 538,78 (Figura 12) correspondente a brachydina B (BrB), e na substância 3 apresentou pico de íon molecular $[M+H]^+$ m/z 508,99 (Figura 14) correspondente a brachydina C (BrC), a fragmentação de ambos são similares ao da brachydina A com a clivagem por Retro Diels-Alder registrando fragmento de m/z 285,02 e m/z 255,04, respectivamente (Figura 13 e 15), conforme descrito por Rocha *et al.* (2014).

Figura 12 - Espectro de massas de brachydina B.

²Cl13-1 #9-23 RT: 0.28-0.62 AV: 15 SB: 2 0.98, 0.98 NL: 4.47E6
+ c Full ms [50.00-1500.00]



Fonte: Autora (2024)

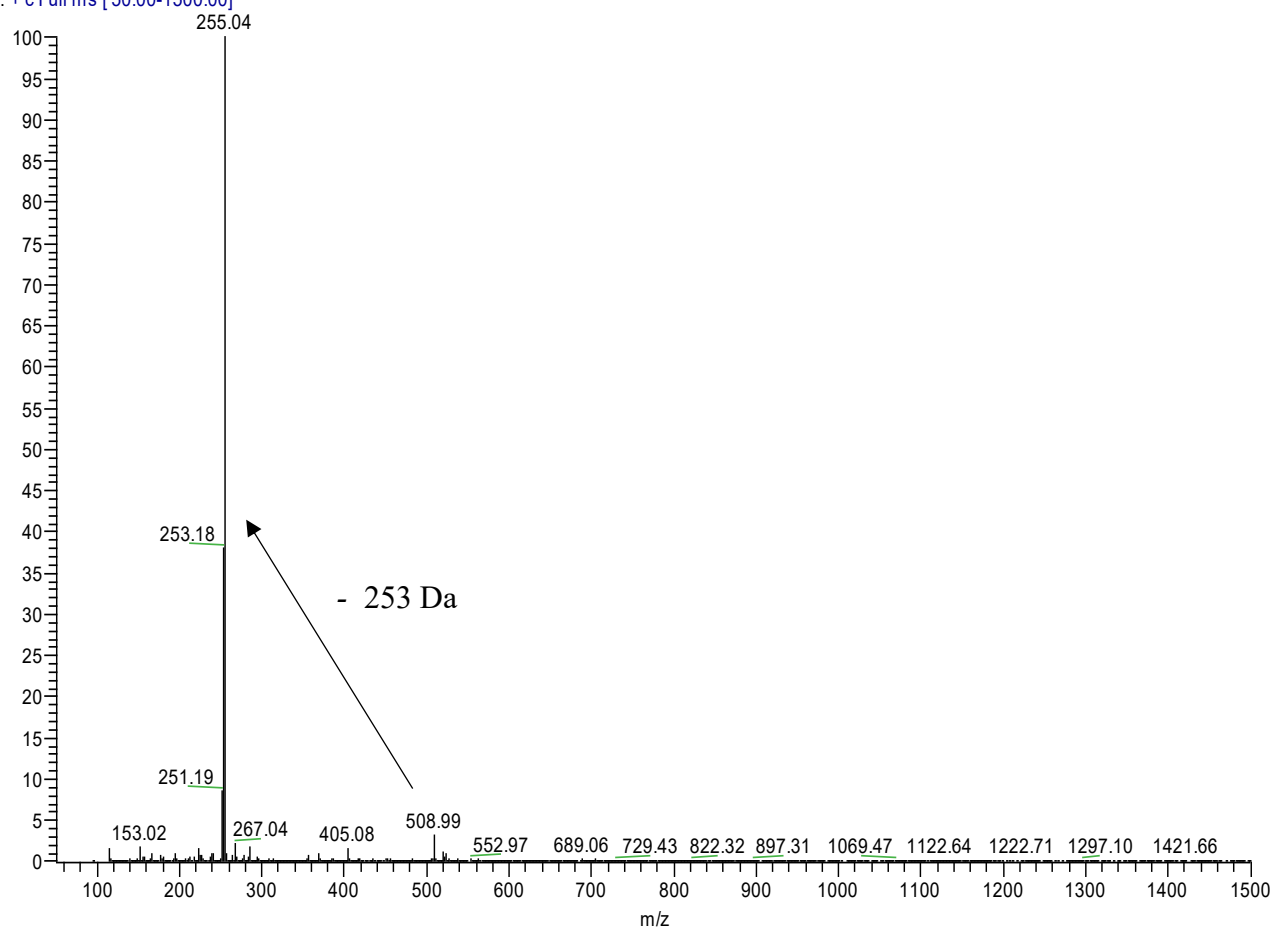
Figura 13 - Proposta de fragmentação de brachydina B.

Fonte: Autora (2024)

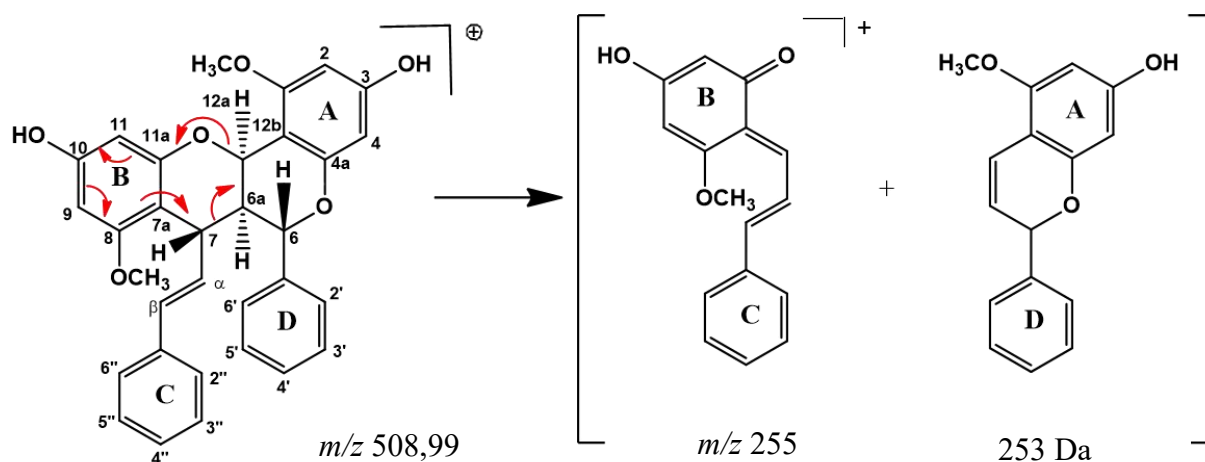
Figura 14 - Espectro de massas de brachydina C.

APCI15-2 #8-20 RT: 0.23-0.53 AV: 13 SB: 2 0.70, 0.70 NI: 6 13F6

T: + c Full ms [50.00-1500.00]



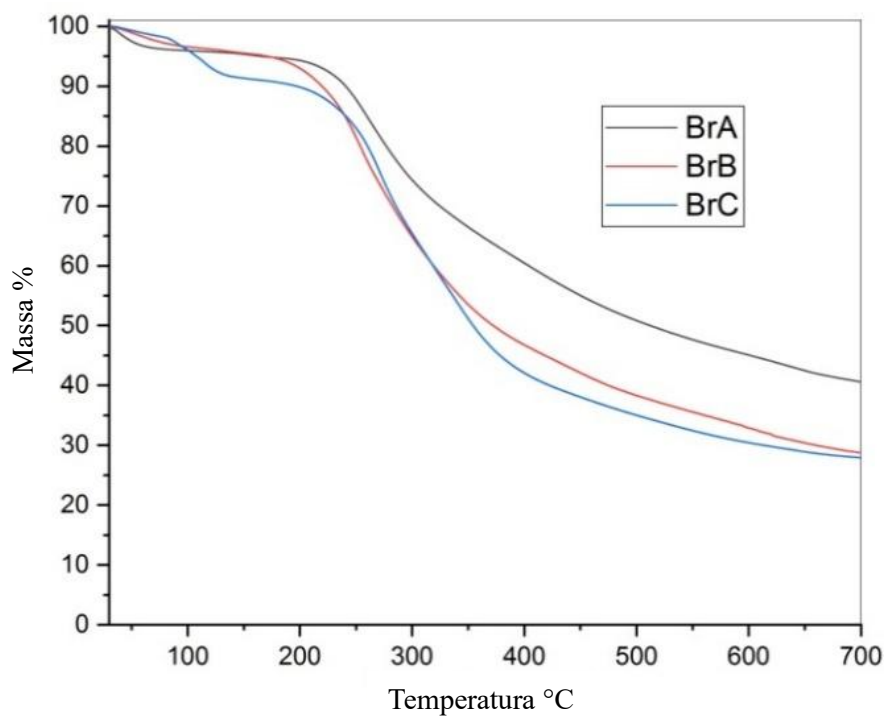
Fonte: Autora (2024)

Figura 15 - Proposta de fragmentação de brachydina C.

Fonte: Autora (2024)

5.2 Estudos de estabilidade

Buscando informações sobre a estabilidade térmica dessas substâncias, foi realizado um estudo de estabilidade para o entendimento dos mecanismos de degradação, que são fundamentais para avaliar a viabilidade de uso, além de contribuir para o desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes. A Figura 16 ilustra as curvas termogravimétricas de BrA, BrB e BrC.

Figura 16 - Curvas termogravimétricas para BrA, BrB e BrC.

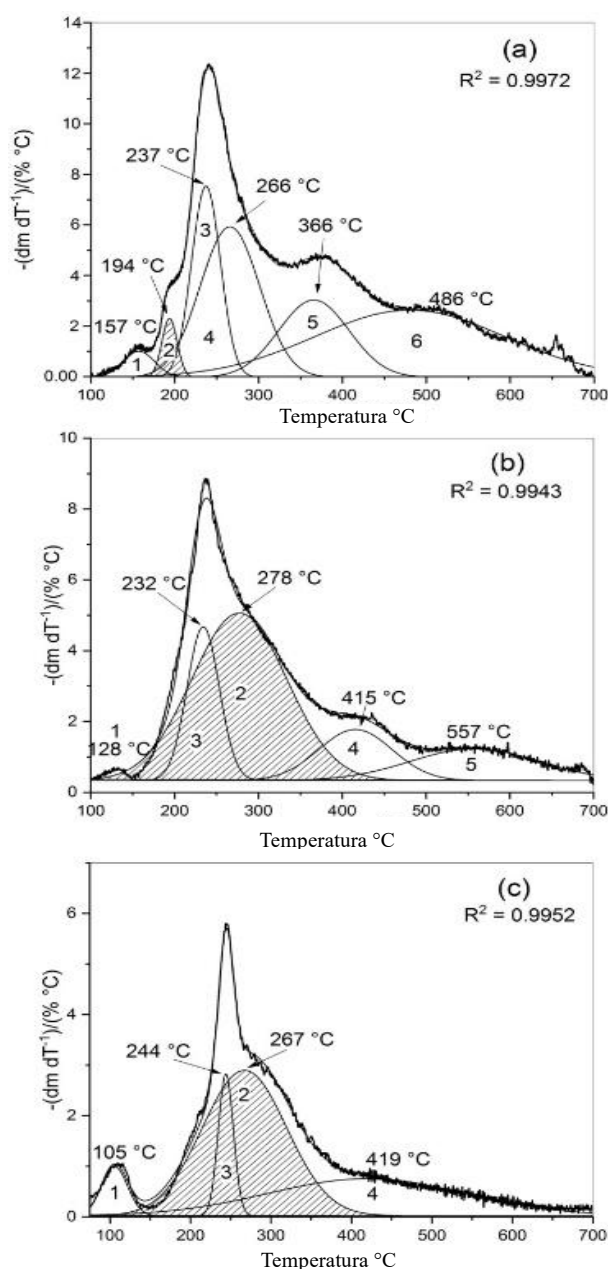
Fonte: Autora (2024)

Ambas as amostras de BrA e BrC mostraram uma perda de massa inicial de aproximadamente 5% na faixa de temperatura de 25 °C a 110 °C, embora BrA apresente uma perda de massa mais abrupta dentro dessa faixa. Em BrC, a perda de massa inicial de 2,5% ocorre entre 25 °C e 100 °C, essa perda de massa inicial pode ser atribuída à liberação de solvente residual, devido à sua natureza não polar. A taxa de liberação do solvente pode estar relacionada à sua interação com as substâncias, com BrA exibindo um caráter mais polar em comparação com BrC.

A BrC apresenta uma perda de massa de aproximadamente 7,5% entre 100 °C e 150 °C, provavelmente atribuída à presença de impurezas na amostra. Tal contaminação pode ter ocorrido durante a fase de isolamento, uma vez que, na cromatografia em coluna aberta em fase normal, a BrC é a primeira a ser eluída devido ao seu caráter mais apolar, o que pode favorecer a coeluição de impurezas com a molécula.

Esse mesmo passo só pode ser observado em BrA e BrB por meio da análise da primeira derivada das curvas termogravimétricas (dTG), apresentada na Figura 17. A partir dessas curvas dTG, foi possível avaliar passos subsequentes por meio de deconvolução, permitindo identificar possíveis estágios de perda de massa, nos quais diferentes processos de degradação podem ocorrer simultaneamente dentro da mesma faixa de temperatura. As análises mostraram que BrB e BrC apresentaram massas residuais de 28,7% e 27,8%, respectivamente, enquanto BrA exibiu um valor superior, com aproximadamente 41%.

Figura 17 - Primeira derivada das curvas termogravimétricas (dTG) e deconvolução das dTG para a avaliação das etapas de pirólise para (a) BrA, (b) BrB e (c) BrC.



Fonte: Autora (2024)

Ao examinar as curvas dTG deconvoluídas, o número de possíveis estágios de degradação com perda de massa nas amostras podem ser avaliados. Nesta análise, a perda de massa devido à evaporação do solvente foi desconsiderada.

Utilizando as áreas sob as curvas deconvoluídas, a quantidade de massa perdida em cada estágio pode ser calculada, e os resultados são mostrados na Tabela 2, assim com as faixas de temperatura de cada estágio. O número de etapas de pirólise identificadas para BrA, BrB e BrC foram 6, 5 e 4 etapas, respectivamente.

Tabela 2 - Perda de massa e faixa de temperatura para cada etapa determinada a partir das áreas sob as curvas dTG deconvoluídas.

Curvas deconvoluídas	%BrA (Faixa °C)	%BrB (Faixa °C)	%BrC (Faixa °C)
1	1,43% (110-190)	1,16% (110-150)	4,02% (60-150)
2	1,54% (175-210)	38,86% (115-450)	38,50% (130-410)
3	9,49% (190-295)	12,12% (175-290)	6,75% (210-260)
4	15,44% (190-360)	9,20% (300-525)	22,94% (150-690)
5	9,36% (250-470)	9,96% (390-700)	-
6	21,94% (210-700)	-	-
Massa residual	40,8%	28,70%	27,80%
Total	100.0%	100.0%	100.0%

Fonte: Autora (2024)

Anteriormente na Figura 16, observou-se perda de massa na faixa de 25 °C a 110 °C que foi atribuída a solvente residual. Dessa forma, a primeira etapa de degradação identificada nas curvas deconvoluídas para as três substâncias foi associada à perda de massa devido a impurezas na amostra. BrC apresentou o maior teor de impurezas entre as amostras, estimado em 4,02% na faixa de aproximadamente 60 °C a 150 °C, provavelmente correspondentes a triterpenos remanescentes do processo de isolamento.

A etapa com maior perda de massa para a BrA foi a etapa 6, com 21,94%, ocorrendo em uma faixa de temperatura que se estende além dos 700 °C. Isso pode justificar a maior massa residual observada para BrA, uma vez que parte significativa da amostra só se decompõe em temperaturas mais elevadas. Tal comportamento pode estar relacionado à maior estabilidade térmica da molécula pela presença do grupo hidroxila como substituinte no anel C, o que pode favorecer formação de estruturas mais resistentes à degradação.

Para BrB e BrC, a etapa mais significativa foi a curva 2, com perdas de 38,86% e 38,50%, respectivamente, ocorrendo em temperaturas intermediárias. Essas diferenças, tanto no número de etapas de degradação quanto nos percentuais de perda de massa, indicam

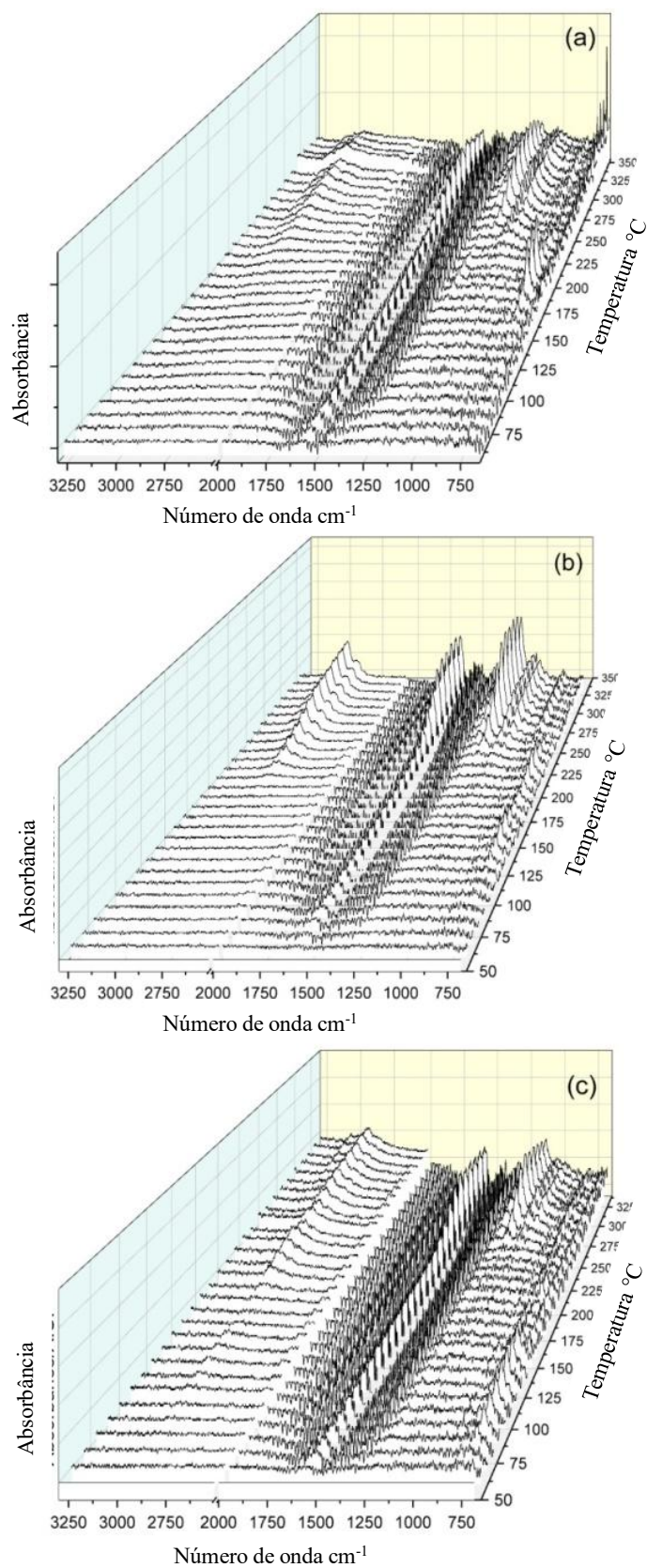
mecanismos distintos de decomposição térmica entre as amostras, especialmente entre BrA e as demais, o que pode ser atribuído às variações estruturais nos substituintes do anel C.

Os resultados de análise de gases evoluídos (EGA) registram os espectros FTIR dos gases liberados nas temperaturas correspondentes à degradação térmica com perda de massa para as amostras de BrA, BrB e BrC, mostrados na Figura 18. Além de fornecer informações qualitativas sobre a caracterização dos produtos liberados durante o processo de pirólise, os gráficos EGA indicam que esses produtos de liberação começam a se formar nas temperaturas iniciais de degradação na curva 2 da deconvolução, com valores específicos detalhados na Tabela 2.

A faixa de número de onda entre 2420 cm^{-1} e 2250 cm^{-1} , associada ao CO_2 , foi suprimida devido à sua intensidade. No gráfico EGA para BrA (Figura 18a), uma banda em 742 cm^{-1} aparece entre $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, junto com uma banda menos intensa em 1217 cm^{-1} , indicando a presença de C=O em CO_2 e um composto de baixa massa molar relacionado à ligação C-O encontrada em álcoois ou ésteres, respectivamente. Em temperaturas acima de $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, uma banda em torno de 1600 cm^{-1} (C=C) aparece, bem como bandas na faixa de $3150\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$ (C-H), ambas atribuídas a anéis de benzeno. Além disso, bandas entre 1300 e 900 cm^{-1} são observadas, indicando grupos C-O de ésteres, álcoois e fenóis (Scaccia, 2013; Sobek *et al.*, 2022).

Na Figura 18b, referindo-se à amostra de BrB, as mesmas bandas que em BrA são identificadas acima de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicando a liberação inicial de CO_2 , seguida pela liberação de compostos de benzeno e a presença de grupos C-O em ésteres, álcoois e fenóis. No entanto, a banda em 1217 cm^{-1} , observada entre 160 e $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ em BrA, não é vista em BrB, sugerindo que compostos contendo C-O não são liberados durante a pirólise nesta faixa de temperatura, o que pode estar relacionado com a presença do grupo metoxi da BrB, que na BrA a presença da hidroxila facilita a liberação. Um processo semelhante ao de BrB ocorre nos espectros IR de BrC (Figura 18c), no entanto, nota-se que o sinal de CO_2 já está presente em temperaturas abaixo de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 18 - Análise de Gases Evoluídos (EGA/TG-FTIR) obtida da pirólise: (a) BrA, (b) BrB e (c) BrC.



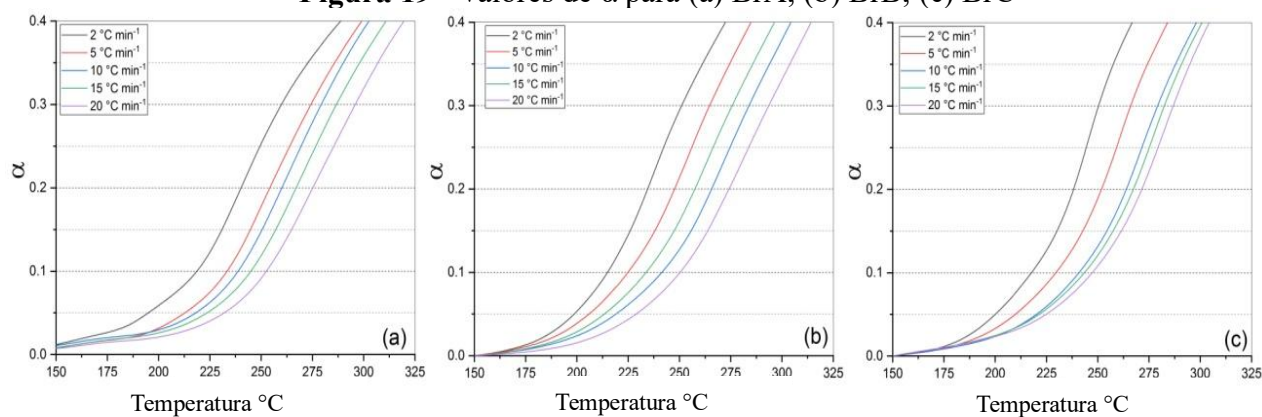
Fonte: Autora (2024)

Observando o aparecimento de bandas correspondentes a espécies aromáticas durante a pirólise das três amostras, pode-se sugerir as possíveis espécies químicas liberadas nesse processo. Como mostrado na Tabela 2, a etapa 2 da degradação térmica de BrB e BrC resulta em uma perda de aproximadamente 38% da massa da amostra. Considerando que as massas molares dessas substâncias são 538,78 g/mol e 508,99 g/mol, respectivamente, essa perda de massa é aproximadamente equivalente às massas combinadas dos substituintes p-vinil fenol e fenil ligados ao esqueleto flavonoide.

Para BrA, as curvas deconvoluídas sugerem que os estágios de degradação 2, 3 e 4 ocorrem simultaneamente sob a curva principal dTG. Se considerarmos que apenas uma fração da etapa 4 passa por pirólise antes de 300 °C, então a perda de massa combinada das etapas 2, 3 e 4 é em torno de 20%. Essa perda de massa é próxima ao valor de um substituinte fenil ligado ao esqueleto flavonoide. Isso sugere que o substituinte p-vinil fenol não é liberado nessa etapa de degradação térmica devido ao grupo hidroxila no p-vinil fenol, que pode formar ligações de hidrogênio, possivelmente estabilizando sua estrutura, aumentando sua estabilidade térmica e causando sua liberação em temperaturas mais altas, como as encontradas na etapa 6.

Para determinar a energia de ativação da pirólise de BrA, BrB e BrC, foi utilizado o método Flynn-Wall-Ozawa (FWO) não isotérmico, sem modelo e não requer conhecimento prévio do mecanismo de reação, minimizando assim erros na determinação da energia de ativação. Este método envolve a medição das temperaturas correspondentes a valores específicos de conversão α . A faixa de temperatura considerada para determinar os valores de α foi de 150-325 °C, selecionada por abranger os principais eventos de degradação térmica para BrB e BrC, bem como etapas intermediárias para BrA, conforme observado na tabela 2. Para aplicação dos modelos cinéticos para determinação da energia de ativação (E_a), os valores de α utilizados foram 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 e 0,35, conforme ilustrado na Figura 19.

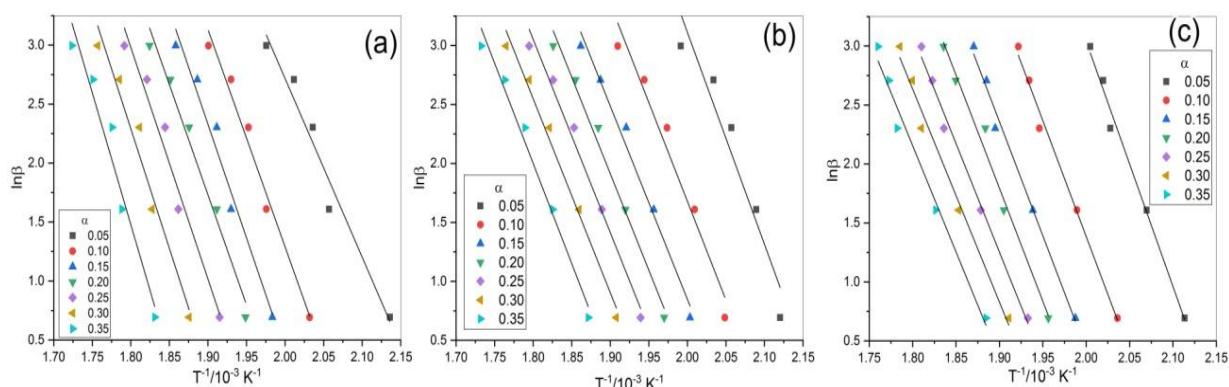
Figura 19 - Valores de α para (a) BrA; (b) BrB; (c) BrC



Fonte: Autora (2024)

Os gráficos apresentados na Figura 20 foram obtidos a partir da aplicação do método de FWO, sendo utilizados os valores de conversão α de 0,05 a 0,35 e as respectivas temperaturas correspondentes a diferentes taxas de aquecimento (2, 5, 10, 15 e 20 °C min⁻¹). Foram traçados os gráficos de $\ln(\beta)$ versus $1/T$ para cada valor de α com posterior cálculo da energia de ativação a partir da inclinação das retas obtidas.

Figura 20 - Gráfico de $\text{Log}(\beta)$ vs. $(1/T)$ para determinar a energia de ativação para a pirólise de (a) BrA, (b) BrB e (c) BrC.



Fonte: Autora (2024)

A Tabela 3 apresenta os valores médios de energia de ativação (E_a) calculados para cada amostra (BrA, BrB e BrC), bem como os coeficientes de correlação (R^2) dos ajustes lineares.

Tabela 3 - Energia de ativação e os coeficientes de correlação linear da reação de pirólise na fase inicial de BrA, BrB e BrC.

Amostra	E_a (kJ/mol)	R^2
BrA	$159,4 \pm 7,2$	0,9658
BrB	$139,3 \pm 1,8$	0,9756
BrC	$135,8 \pm 2,5$	0,9822

Fonte: Autora (2024)

A partir dos resultados obtidos, observa-se que BrA apresenta o maior valor de energia de ativação (159,4 kJ/mol), indicando maior resistência térmica no estágio inicial da pirólise. Esse comportamento pode estar relacionado à presença do grupo p-vinil-fenol, cujas interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio adicionais, podem conferir maior estabilidade estrutural à molécula. Por outro lado, BrB e BrC apresentaram valores inferiores de E_a , com 139,3 e 135,8 kJ/mol, respectivamente, sugerindo menor estabilidade térmica.

As brachydinas possuem potencial biofarmacológico conforme já descritos na literatura (Rocha *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2019) e podem ser usados como medicamentos entre outras aplicações. Devido a isso, é importante determinar a vida útil de BrA, BrB e BrC, pois modificações na estrutura molecular e uma consequente perda de suas propriedades desejadas podem ocorrer durante o armazenamento.

A equação de Arrhenius, mostra que a constante de taxa de reação k para degradação térmica da substância no estado sólido depende da temperatura de armazenamento. Assim, ao calcular o cologaritmo da constante de velocidade k usando uma temperatura de armazenamento de 25 °C, a vida útil do medicamento pode ser estimada. Se o valor de p_k for menor que 7,5, a vida útil varia de 1,5 a 2 anos; se o p_k estiver entre 7,5 e 10,5, é de cerca de 3 anos; e se o p_k for superior a 10,5, a vida útil é estimada entre 4 e 5 anos (Yang *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020).

Normalmente, o conceito de “10% de degradação” é usado para determinar a vida útil de um medicamento, servindo como uma regra para definir a perda aceitável de potência para a determinação da vida útil (Chavan *et al.*, 2023). A Tabela 4 apresenta os parâmetros usados para calcular p_k e a vida útil estimada das brachydinas em um valor de α de 10%.

Tabela 4 - Constante pré-exponencial de Arrhenius (A), p_k e vida útil para $\alpha = 10\%$ para BrA, BrB e BrC.

Amostra	A/s ⁻¹	p_k	Vida útil/ano
BrA	3,70E+16	10,27	3
BrB	1,88E+15	9,12	3
BrC	4,65E+17	10,95	4-5

Fonte: Autora (2024)

Embora BrA tenha apresentado a maior energia de ativação média entre os valores de conversão analisados, indicando maior resistência térmica inicial, foi a BrC que demonstrou maior estabilidade ao longo do tempo, com vida útil estimada entre 4 e 5 anos. BrA e BrB, por sua vez, apresentaram tempos de vida útil de 3 anos.

Do ponto de vista farmacêutico, os tempos de vida útil observados para todas as amostras são promissores, pois favorece o desenvolvimento de formulações com maior estabilidade em prateleira, com maior prazo de validade, menor perda por degradação e, consequentemente, melhor viabilidade comercial.

Considerando que a estabilidade térmica é apenas um dos fatores que influenciam a viabilidade de compostos bioativos, avaliou-se também a estabilidade em contato com a luz. Esse aspecto é particularmente relevante, dado que a exposição à radiação pode comprometer a eficácia de compostos fotossensíveis durante o armazenamento. Embora as brachydinas isoladas apresentem atividades terapêuticas promissoras, o processo de isolamento e purificação de cada uma delas pode ser economicamente custoso. Nesse contexto, o uso da fração diclorometânica (Fr. DCM), que contém as três brachydinas, surge como uma alternativa mais acessível e prática, especialmente no desenvolvimento de fármacos com menor custo de produção. Além disso, estudos anteriores já demonstraram atividades relevantes para essa fração (Rocha *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017; Rosário, 2023).

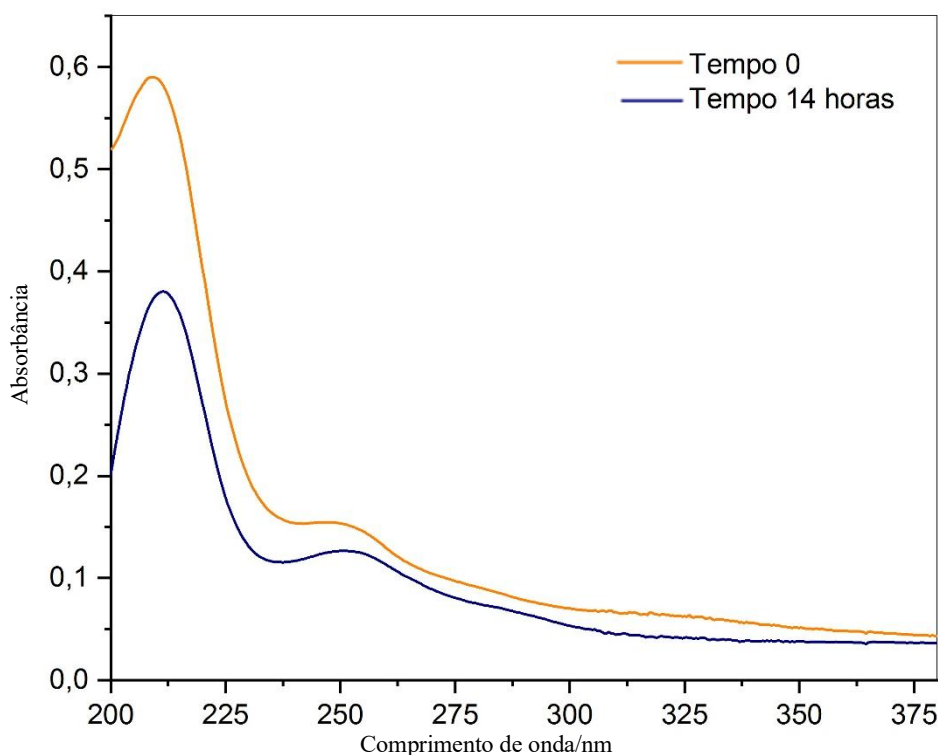
Diante disso, foi conduzido um experimento de fotoestabilidade com a Fr. DCM, visando avaliar a influência da exposição à luz visível como forma de simular a luz solar.

A Figura 21 apresenta os espectros de absorção UV-Vis da Fr. DCM antes e após 14 horas de exposição à luz visível sem a adição de catalisador. Observa-se uma redução significativa na intensidade da banda de absorção, especialmente na região entre 200 e 300 nm, que como visto na Figura 6, é a região característica das brachydinas.

Essa redução na absorbância indica que os compostos presentes na fração sofreram degradação ou transformação estrutural. A presença remanescente da banda de absorção sugere que parte dos cromóforos foi preservada. Considerando que a Fr. DCM é composta por três brachydinas estruturalmente semelhantes, que compartilham os mesmos grupos cromóforos, o espectro obtido reflete uma resposta conjunta dessas moléculas. Assim, mesmo com a degradação parcial de uma ou mais brachydinas, a presença residual das demais pode justificar a presença da banda em posição semelhante à observada no tempo 0.

A eficiência de degradação foi calculada com base na variação da absorbância no comprimento de onda de 215 nm. O valor estimado foi de aproximadamente 32,8%, evidenciando que a exposição à luz visível foi capaz de promover a degradação parcial da fração, mesmo na ausência de catalisador.

Figura 21 - Espectro UV-Vis da fração diclorometânica antes (tempo 0) e após 14 horas na presença de luz.



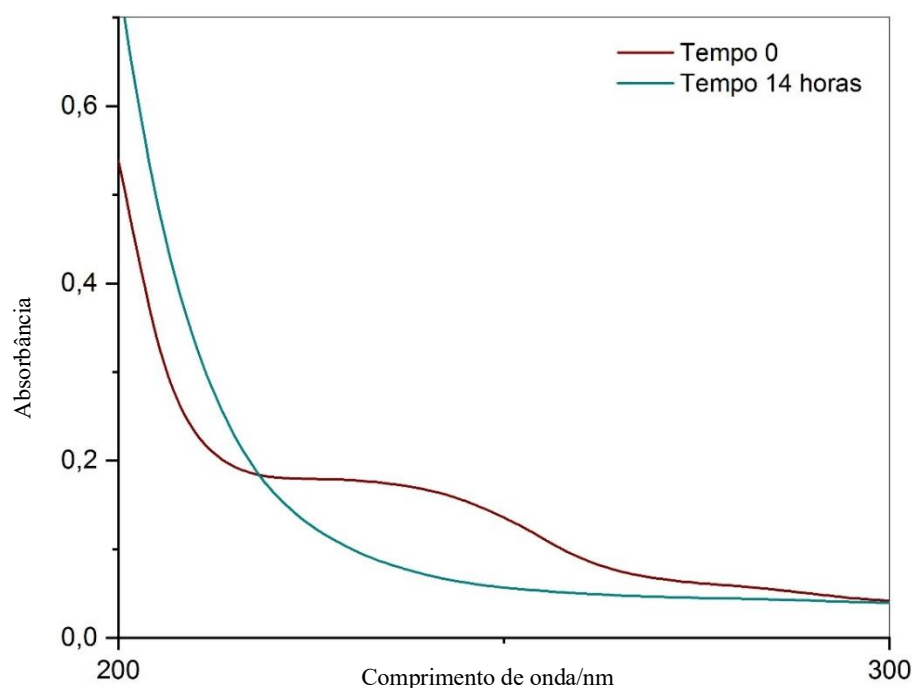
Fonte: Autora (2024)

Apesar de ser vantajoso que a Fr. DCM não sofra total degradação espontânea sob luz, no contexto de seu uso farmacêutico e descarte ambiental inadequado, a persistência no ambiente pode representar riscos caso não se decomponha adequadamente. Visando potencializar a degradação, foi realizada a avaliação da fotodegradação da Fr. DCM na presença do catalisador TiO_2 , um material amplamente utilizado por ser não tóxico, de baixo custo, fotoestável e ativável por luz solar, o que contribui para a redução dos custos operacionais (Nascimento *et al.*, 2018).

No espectro UV-Vis da Fr. DCM com TiO_2 , ilustrado na Figura 22, observa-se inicialmente a presença de uma banda de absorção característica das bradydinas. Após 14 horas de exposição à luz, essa banda desaparece completamente, sugerindo uma modificação estrutural significativa na amostra. A eficiência de degradação obtida nesse sistema foi de 52,9%, valor superior ao registrado na ausência de catalisador, reforçando o papel do TiO_2 como promotor da fotodegradação.

Esses dados indicam que o uso de catalisador é eficaz na aceleração do processo de decomposição da fração, o que pode ser explorado como estratégia para minimizar o impacto ambiental em eventuais cenários de aplicação farmacêutica.

Figura 22 - Espectro UV-Vis da fração diclorometânica contendo dióxido de titânio, obtido após 30 minutos de centrifugação, antes da exposição à luz (tempo 0) e após 14 horas de exposição.



Fonte: Autora (2024)

5.3 Docagem Molecular

Os resultados obtidos por meio da docagem molecular entre as brachydinas (BrA, BrB e BrC) e as principais proteínas associadas à infecção pelo SARS-CoV-2 são apresentados na Tabela 5. As proteínas-alvo selecionadas incluíram componentes virais, como a proteína Spike e a protease principal (Mpro), bem como proteínas humanas envolvidas na interação com o vírus, como o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e o complexo Spike/ECA2. Os valores de energia livre de ligação (ΔG), expressos em kcal/mol, foram negativos em todos os casos, indicando que as interações previstas entre as brachydinas e os alvos são energeticamente favoráveis.

Tabela 5 - Parâmetros de afinidade molecular das brachydinas e proteínas do SARS-CoV-2.

Ligantes	Spike ΔG (kcal/mol)	ECA2 ΔG (kcal/mol)	Spike/ECA2 ΔG (kcal/mol)	Mpro ΔG (kcal/mol)
BrA	-8,5	-8,9	-7,4	-7,6
BrB	-8,8	-8,8	-7,6	-7,7
BrC	-9,0	-8,6	-7,6	-7,5

Fonte: Autora (2024)

Com o objetivo de contextualizar os resultados obtidos neste estudo, a Tabela 6 apresenta uma comparação com dados da literatura referentes a fármacos previamente testados ou utilizados no combate à COVID-19, como remdesivir, paxlovid, molnupiravir e baricitinib, aprovados pela ANVISA para uso emergencial (Souza, 2023). Todos os resultados comparativos foram obtidos por meio de simulações com o mesmo software, o AutoDock Vina.

Tabela 6 - Comparação dos valores de energia de ligação das brachydinas e fármacos com proteínas relacionadas ao SARS-CoV-2.

Proteína-alvo	Composto	ΔG (kcal/mol)	Referência
Spike	BrA/BrB/BrC	-8,5/-8,8/-9,0	Este estudo
	Ivermectina	-9,3	Amorim, 2022
	Baricitinib	-8,0	Souza, 2023
	Molnupiravir	-7,9	Souza, 2023
	Mebendazol	-7,8	Amorim, 2022
	Remdesivir	-7,5	Souza, 2023
ECA2	BrA/ BrB/ BrC	-8,9/-8,8/-8,6	Este estudo
	Ivermectina	-8,4	Amorim, 2022
	Remdesivir	-7,3	Souza, 2023
	Molnupiravir	-7,2	Souza, 2023
	Paxlovid	-7,1	Souza, 2023
	Baricitinib	-6,8	Souza, 2023
Complexo Spike/ECA2	BrA/BrB/BrC	-7,4/-7,6/-7,6	Este estudo
	Luteína	-8,7	Souza, 2023
	Baricitinib	-7,8	Souza, 2023
	Remdesivir	-7,6	Souza, 2023
	Paxlovid	-7,0	Souza, 2023
	Molnupiravir	-6,8	Souza, 2023
Mpro	BrA/BrB/BrC	-7,6/-7,7/-7,5	Este estudo
	Remdesivir	-7,9	Souza, 2023
	Ivermectina	-7,0	Amorim, 2022
	Azitromicina	-6,7	Gonçalves et al., 2020
	Hidroxicloroquina	-6,3	Gonçalves et al., 2020
	Cloroquina	-6,0	Gonçalves et al., 2020

Fonte: Autora (2025)

Nos estudos de docagem realizados, observaram-se resultados promissores, com destaque para a brachydina C, que apresentou maior afinidade pela proteína Spike ($\Delta G = -9,0$ kcal/mol). A brachydina A, por sua vez, demonstrou maior afinidade com o receptor ECA2 ($\Delta G = -8,9$ kcal/mol). Esses valores são comparáveis ou superiores aos observados para fármacos utilizados durante a pandemia, como a ivermectina ($\Delta G = -9,3$ kcal/mol) frente à Spike (Amorim, 2022), baricitinib, molnupiravir e remdesivir, cujos valores variaram entre $-8,0$ e $-7,5$ kcal/mol (Souza, 2023). Em relação ao receptor ECA2, todas as brachydinas apresentaram energias de ligação mais negativas do que os fármacos comparativos, como a ivermectina, remdesivir e baricitinib.

Esses dados reforçam a hipótese de que as brachydinas podem competir pelos sítios de ligação da proteína Spike, dificultando a entrada do vírus nas células hospedeiras. A afinidade observada com o complexo Spike/ECA2 também sugere que esses compostos possam atuar como inibidores das interações virais. Em relação à Mpro, os valores de energia de ligação obtidos foram semelhantes ou superiores aos dos medicamentos de referência, indicando uma interação favorável. De forma geral, os resultados evidenciam o potencial multialvo das brachydinas, ressaltando sua viabilidade como candidatos promissores no combate à COVID-19.

5.4 Estudos *in vitro*

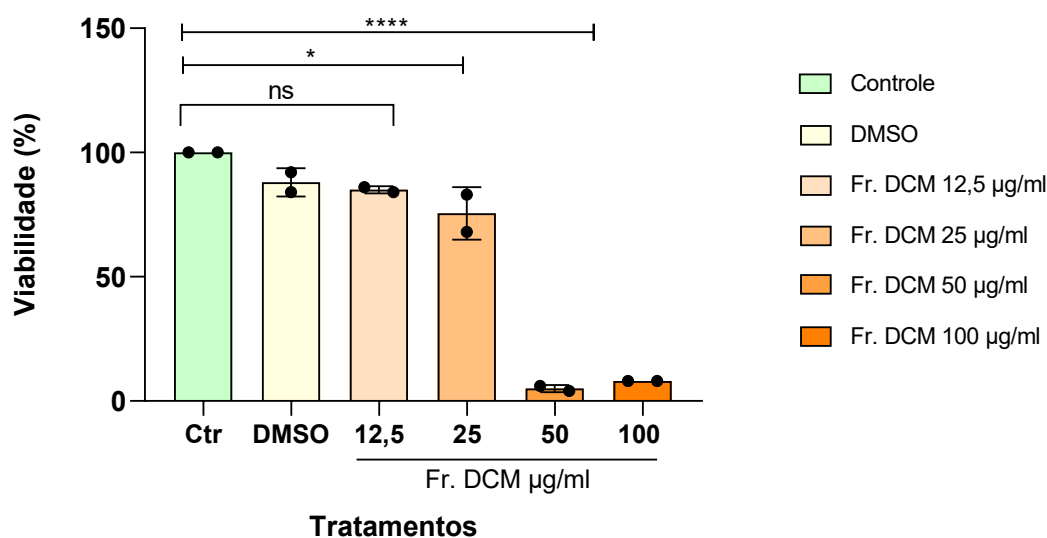
5.4.1 Citotoxicidade Fr. DCM

Após a avaliação da estabilidade e atividade das três brachydinas isoladas, que apresentaram resultados promissores, optou-se por utilizar a Fr. DCM para os ensaios biológicos. Essa fração contém as três brachydinas em sua composição, e seu uso apresenta vantagens práticas, como menor custo de produção e maior viabilidade técnica quando comparado ao uso de compostos isolados.

Para avaliar a citotoxicidade da fração, foi empregado o ensaio de MTT, que é amplamente utilizado para medir a viabilidade celular com base na atividade metabólica. Esse teste consiste na redução do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, por enzimas dependentes de NAD(P)H presentes em células viáveis, formando cristais insolúveis de formazan, de coloração azul-arroxeadada intensa. A quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células vivas, sendo quantificada por leitura espectrofotométrica (Grela *et al.*, 2018).

Os resultados da avaliação de citotoxicidade estão representados na Figura 23. O DMSO, utilizado como veículo, não apresentou toxicidade significativa, mantendo uma viabilidade celular média de 88%, estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$).

Figura 23 - Viabilidade de células A549 com diferentes concentrações da fração diclorometânica de *Fridericia platyphylla*. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. (ns: não significativo; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).



Fonte: Autora (2025)

Em relação aos tratamentos, as concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL da Fr. DCM reduziram significativamente a viabilidade celular, com diferenças estatísticas altamente significativas em comparação ao controle ($p < 0,0001$). Já a concentração de 25 µg/mL também apresentou redução ($p < 0,05$), embora de forma mais moderada, com viabilidade média de 75,5%.

Por outro lado, a concentração de 12,5 µg/mL não diferiu estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$), mantendo a viabilidade celular acima de 85%.

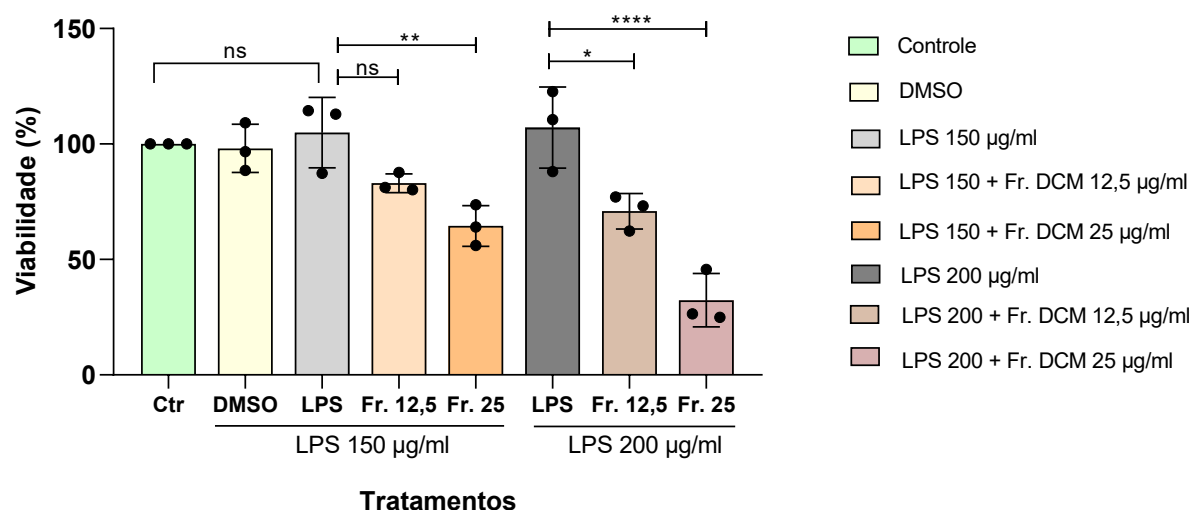
Esses dados estão de acordo com Salgado *et al.* (2020), que também observaram toxicidade da Fr. DCM apenas em concentrações mais elevadas. Assim, os resultados indicam que a Fr. DCM apresenta perfil citotóxico com efeitos mais pronunciados em concentrações acima de 50 µg/mL.

Consequentemente, as duas concentrações máximas não serão utilizadas para os demais testes devido à toxicidade.

5.4.2 Lesão pulmonar aguda

Para verificação da atividade anti-inflamatória da Fr. DCM, foi utilizado um modelo de inflamação *in vitro* com células epiteliais A549 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um componente da membrana de bactérias Gram-negativas amplamente utilizado para induzir inflamação pulmonar, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, por ativar vias inflamatórias e promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Gao *et al.*, 2020). A Figura 24 apresenta os efeitos do tratamento com Fr. DCM nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL sobre a viabilidade celular, na presença de diferentes concentrações de LPS.

Figura 24 - Viabilidade de células A549 com lipopolissacarídeo e tratadas com fração diclorometânica de *Fridericia platyphylla*. Dados expressos como média ± desvio padrão. (ns: não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).



Fonte: Autora (2025)

A análise da Figura 24 evidencia que o LPS, nas concentrações de 150 e 200 µg/mL, não comprometeu significativamente a viabilidade das células A549 quando comparado ao controle, indicando que a concentração utilizada foi suficiente para induzir um estado inflamatório sem causar citotoxicidade, o que é desejável para modelos de inflamação *in vitro*, quando comparados a outros estudos (Wang *et al.*, 2021; Gatera *et al.*, 2021), observa-se que a redução significativa da viabilidade celular ocorre em concentrações de LPS superiores às utilizadas neste trabalho.

Por outro lado, a administração conjunta da Fr. DCM com LPS resultou em uma redução significativa da viabilidade celular, especialmente na concentração de 25 µg/mL. Esse efeito foi mais pronunciado no grupo com 200 µg/mL de LPS, onde a fração na dose de 25 µg/mL reduziu

a viabilidade celular para valores abaixo de 50% ($p < 0,0001$), já para a dose de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, a redução da viabilidade não foi significativa para o LPS 100 $\mu\text{g/mL}$. Isso sugere um possível efeito citotóxico da Fr. DCM em concentrações elevadas, intensificado na presença do LPS, uma vez que no teste de citotoxicidade a partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade apresentou diferença significativa em relação ao controle.

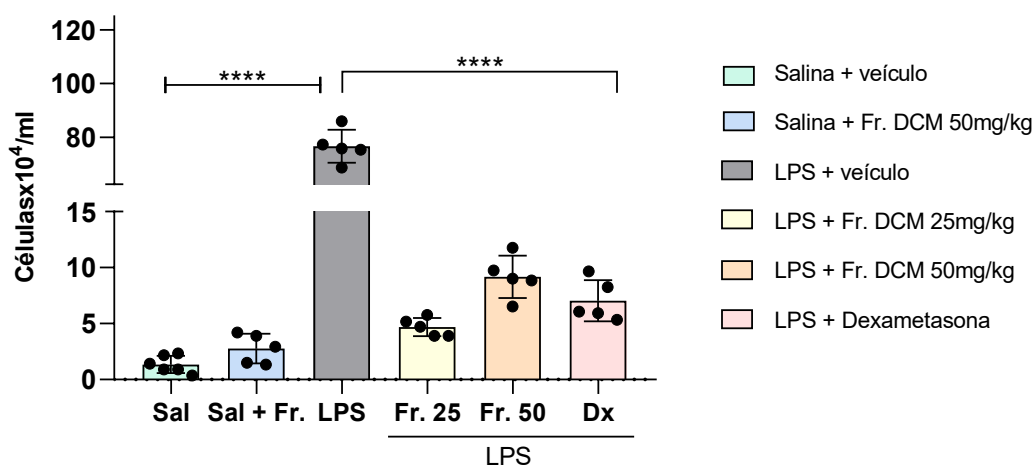
Portanto, os dados sugerem que a Fr. DCM pode apresentar atividade moduladora sobre o processo inflamatório induzido por LPS em células A549, com efeitos dependentes da dose. A concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se menos prejudicial à viabilidade celular, podendo representar uma dose mais segura para aplicações *in vitro*. No entanto, para compreender melhor o mecanismo de interação e investigar a capacidade dessa dose em inibir a produção de citocinas inflamatórias induzidas pelo LPS, são necessários experimentos adicionais. Dentre eles, o ELISA, que será realizado futuramente, a fim de determinar o potencial anti-inflamatório da Fr. DCM em modelos celulares de lesão pulmonar aguda.

5.5 Estudos *in vivo*

5.5.1 Células no Fluido Lavado broncoalveolar (fLBA)

A quantificação de células totais no fluido do LBA é apresentada na Figura 25, após os diferentes tratamentos. O grupo tratado com LPS apresentou aumento significativo no número de células inflamatórias em relação ao grupo controle.

Figura 25 - Contagem de células totais no fluido do lavado broncoalveolar de camundongos. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. (**** $p < 0,0001$).



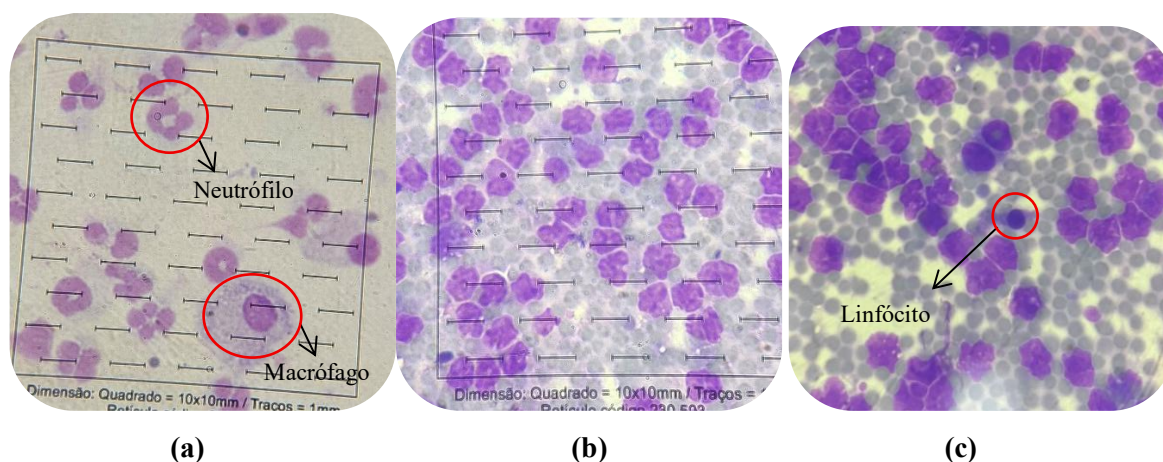
Fonte: Autora (2025)

A análise dos dados demonstrou que a administração de LPS induziu um aumento significativo no número de células inflamatórias, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$), confirmando o sucesso do modelo de inflamação pulmonar aguda. Além disso, o veículo utilizado não demonstrou toxicidade, como evidenciado pelo grupo controle salina. Da mesma forma, o grupo tratado apenas com a Fr. DCM (sem LPS) apresentou contagens celulares semelhantes ao grupo controle, indicando boa tolerabilidade da fração e ausência de efeitos inflamatórios em animais saudáveis.

O tratamento com a Fr. DCM nas doses de 25 e 50 mg/kg promoveu uma redução significativa no número de células totais no fLBA em comparação ao grupo LPS ($p < 0,0001$), sugerindo efeito anti-inflamatório da fração. Notavelmente, a dose de 25 mg/kg apresentou uma redução mais pronunciada e não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle salina ao contrário da dose de 50 mg/kg e da dexametasona, que ainda se mostraram significativamente diferentes ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Esses resultados indicam que a menor dose pode ter promovido um efeito anti-inflamatório mais eficaz e próximo do perfil basal observado em animais saudáveis.

Na análise das células diferenciais, foi possível verificar sob microscópio óptico a presença de grandes grupos de neutrófilos em algumas lâminas, enquanto outras apresentaram predominância de macrófagos, como demonstrado na Figura 26.

Figura 26 - Diferentes campos microscópicos observados sob objetiva de 1000x no fluido do lavado broncoalveolar: (a) neutrófilos e macrófagos; (b) neutrófilos predominantes; (c) neutrófilos e linfócito.

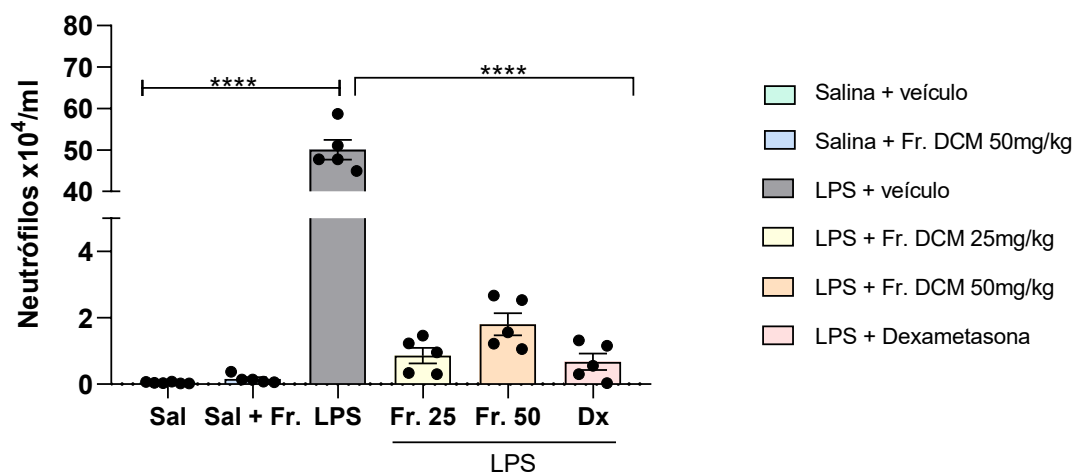


Fonte: Autora (2025)

Além da análise morfológica, foi realizada a contagem diferencial das células presentes no fLBA, com o objetivo de quantificar a proporção de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nos

diferentes grupos experimentais. Os resultados estão representados na Figura 27, 28 e 29, respectivamente.

Figura 27 - Contagem de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $p < 0,0001$.



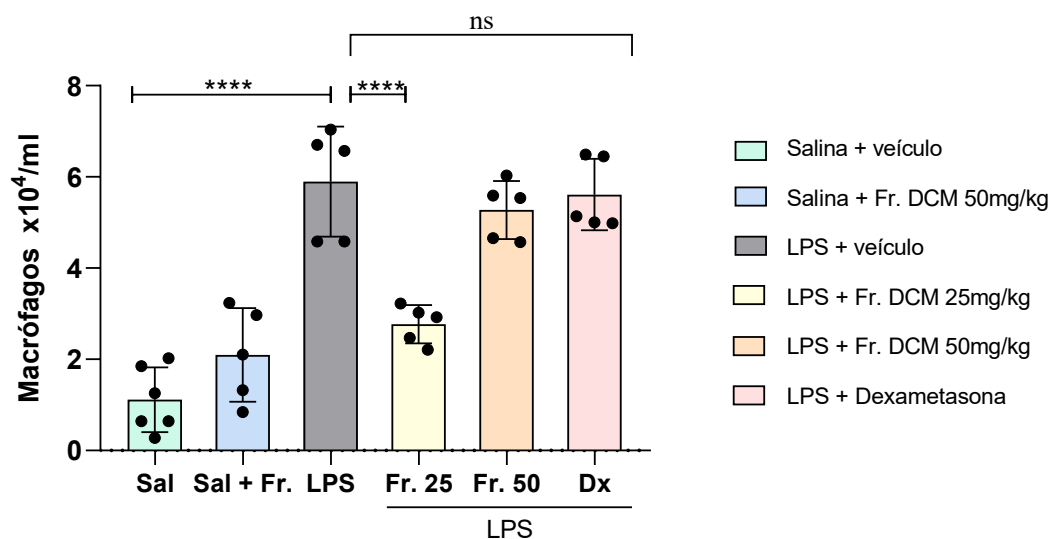
Fonte: Autora (2025)

A migração de neutrófilos para o espaço alveolar é uma característica marcante da lesão pulmonar aguda (LPA). São os primeiros a serem recrutados para o local da inflamação, e sua ativação exerce papel fundamental na resposta inflamatória aguda (Haute *et al.*, 2020). O recrutamento excessivo de neutrófilos está fortemente associado à patogênese e à progressão da LPA, sendo, portanto, a sua inibição um aspecto importante para o controle e a resolução do quadro inflamatório (Silva, 2016).

No presente experimento, foi observada uma predominância de neutrófilos no FLBA dos camundongos submetidos à indução da LPA por LPS. Conforme mostrado na Figura 27, o grupo LPS apresentou aumento significativo na contagem de neutrófilos em comparação ao grupo controle salina, com $p < 0,0001$, o que confirma o recrutamento intenso dessas células como característica da inflamação pulmonar aguda.

Os grupos tratados com a Fr. DCM nas doses de 25 e 50 mg/kg apresentaram uma redução significativa na quantidade de neutrófilos em relação ao grupo LPS ($p < 0,0001$). Além disso, essas reduções não foram estatisticamente diferentes dos grupos controle salina e dexametasona, indicando que o tratamento foi eficaz ao ponto de restaurar os níveis celulares para valores basais. Esses achados evidenciam o potencial anti-inflamatório da fração, com destaque para o controle da resposta neutrofílica, um dos principais eventos envolvidos na LPA.

Figura 28 - Contagem de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. ns: não significativo; **** $p < 0,0001$.



Fonte: Autora (2025)

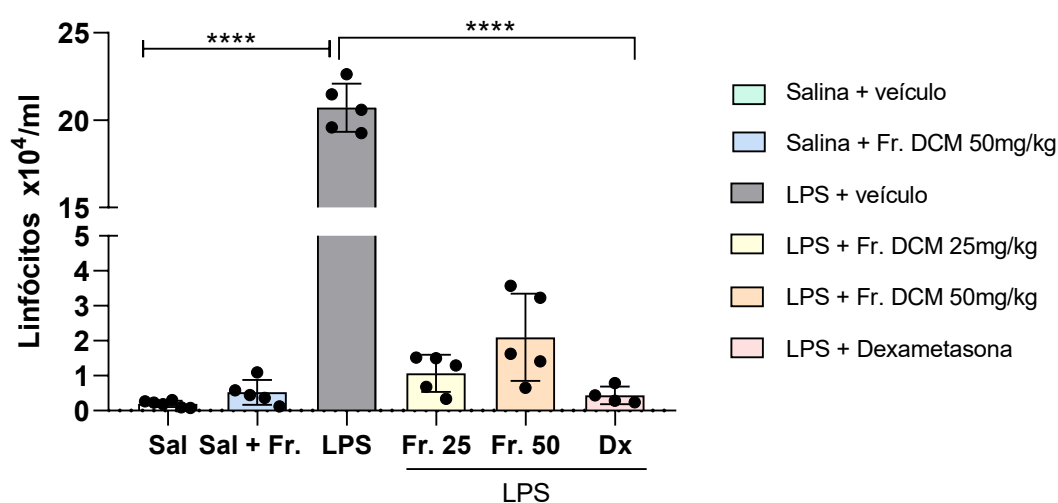
Os macrófagos também desempenham papel relevante nos mecanismos fisiopatológicos da LPA, sendo, assim como os neutrófilos, envolvidos fase inicial da resposta inflamatória (Bittencourt-Mernak *et al.*, 2017). Conforme demonstrado na Figura 28, o grupo LPS apresentou um aumento significativo na contagem de macrófagos em comparação ao grupo controle salina ($p < 0,0001$), evidenciando o recrutamento dessas células para manutenção da resposta inflamatória.

Apesar de estarem associados à fase inicial da inflamação, os macrófagos também exercem funções cruciais no processo de resolução e reparação tecidual, por meio da liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios, a depender de seu fenótipo (M1 ou M2) e do microambiente celular (Bittencourt-Mernak *et al.*, 2017). Dessa forma, sua presença na região broncoalveolar pode refletir tanto a manutenção da inflamação quanto a resolução (Silva, 2016).

Em relação aos tratamentos, o grupo que recebeu a Fr. DCM na dose de 25 mg/kg apresentou a maior redução na contagem de macrófagos em comparação ao grupo LPS ($p < 0,0001$), com valores significativamente mais próximos ao grupo controle ($p < 0,05$), sugerindo um perfil anti-inflamatório mais efetivo. Por outro lado, o grupo tratado com 50 mg/kg da fração apresentou contagens similares às observadas nos grupos LPS e dexametasona, sem diferenças estatísticas entre eles, o que pode indicar que essa dose não inibe a presença de macrófagos no ambiente inflamatório pulmonar.

Esse resultado pode ser interpretado sob dois aspectos: por um lado, a presença de macrófagos pode contribuir para a manutenção do processo inflamatório; por outro, pode indicar um papel na resolução da inflamação, dependendo do perfil fenotípico dessas células. No entanto, não foram realizados experimentos específicos para distinguir entre os subtipos de macrófagos (M1 – pró-inflamatórios e M2 – anti-inflamatórios), sendo necessária investigação complementar para elucidar o papel funcional dessas células após o tratamento com a fração.

Figura 29 - Contagem de linfócitos no fluido do lavado broncoalveolar. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $p < 0,0001$.



Fonte: Autora (2025)

Na Figura 29, referente aos linfócitos, foi observado um aumento expressivo da contagem dessas células no grupo LPS ($p < 0,0001$), o que embora seja menos comum nas fases iniciais da inflamação aguda, pode indicar a ativação do sistema imune adaptativo em resposta à lesão pulmonar induzida. Os grupos tratados com a Fr. DCM apresentaram redução significativa na contagem de linfócitos em relação ao grupo LPS ($p < 0,0001$), sendo esse efeito mais pronunciado na dose de 25 mg/kg, que atingiu níveis próximos aos observados nos grupos controle salina e dexametasona. Já a dose de 50 mg/kg também promoveu redução, porém ainda apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,01$).

Esses resultados reforçam a atividade anti-inflamatória pulmonar da Fr. DCM, com efeitos consistentes na redução tanto das células totais quanto diferenciais no fLBA. Além disso, não foram observados efeitos adversos aparentes, uma vez que o grupo salina tratado com a

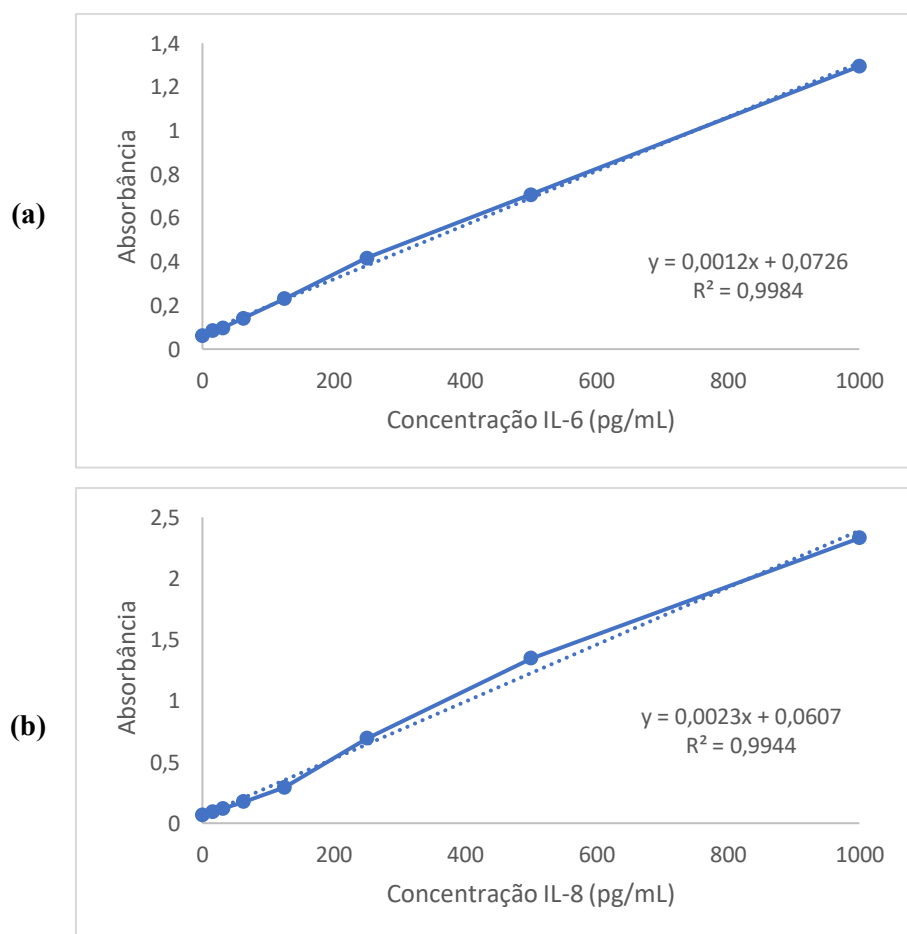
fração na maior dose testada (50 mg/kg) não apresentou aumento significativo na contagem de células inflamatórias, indicando boa tolerabilidade da substância.

De maneira geral, a dose de 25 mg/kg foi mais eficaz do que a de 50 mg/kg e apresentou um perfil semelhante ao da dexametasona, ao promover a maior redução nas contagens de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Esses achados indicam que essa dose representa a melhor resposta terapêutica dentro das condições avaliadas.

5.5.2 ELISA de citocinas no fLBA

Para a quantificação das citocinas inflamatórias, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) no fLBA, as concentrações foram calculadas por interpolação das absorbâncias nas equações das respectivas curvas, com altos coeficientes de correlação ($R^2 > 0,99$), o que garante precisão nos dados obtidos, conforme demonstrado na Figura 30.

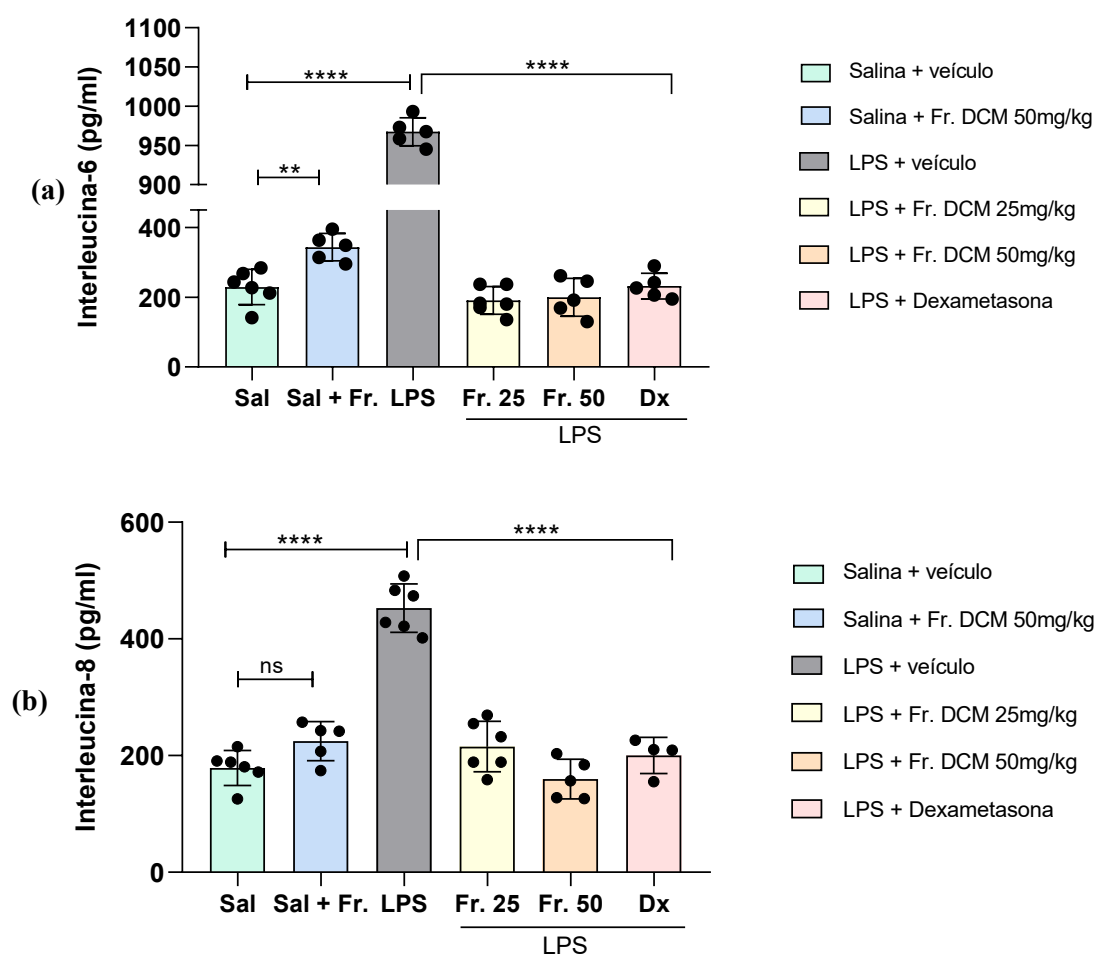
Figura 30 - Curvas padrão: (a) Interleucina-6 (IL-6); (b) Interleucina-8 (IL-8).



Fonte: Autora (2025)

A partir das curvas padrão apresentadas, foram determinadas as concentrações de IL-6 e IL-8 nas amostras dos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão representados nas Figuras 31a e 31b e permitem avaliar o efeito do tratamento com a Fr. DCM na modulação da resposta inflamatória pulmonar induzida por LPS.

Figura 31 - Quantificação de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar: (a) interleucina-6; (b) interleucina-8. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. ns: não significativo; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.



Fonte: Autora (2025)

Durante a inflamação, o sistema imune é ativado e promove a liberação de diversas citocinas. No entanto, na lesão pulmonar aguda (LPA), essa resposta pode se tornar exacerbada, desencadeando uma "tempestade de citocinas", que agrava o quadro clínico. Dentre essas moléculas pró-inflamatórias, destacam-se a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8), que desempenham papéis centrais na fisiopatologia da inflamação pulmonar (Pinheiro *et al.*, 2019).

A IL-6 atua principalmente nos estágios iniciais da resposta inflamatória, sendo considerada um dos principais mediadores envolvidos na sua ativação. Já a IL-8 é responsável pelo recrutamento de neutrófilos para o tecido pulmonar, contribuindo para a amplificação da inflamação (Bittencourt-Mernak *et al.*, 2017). Em pacientes com LPA, níveis elevados dessas citocinas no fLBA estão associados a pior prognóstico e maior risco de mortalidade (Silva, 2016). Nesse contexto, a modulação de citocinas como IL-6 e IL-8 representa uma estratégia promissora no controle e na progressão da LPA.

Diversos estudos na literatura (De Castro *et al.*, 2023; Pinheiro *et al.*, 2019; Bittencourt-Mernak *et al.*, 2017; Righetti *et al.*, 2018, Haute *et al.*, 2020), relatam o aumento significativo de células inflamatórias no fLBA, bem como a elevação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a IL-8, em modelos animais com LPA induzida por LPS. Em concordância, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram um aumento expressivo na contagem de células e nos níveis dessas citocinas no fLBA dos animais com LPS sem tratamentos. Ambas as citocinas, IL-6 e IL-8 foram significativamente elevadas no grupo LPS ($p < 0,0001$), confirmando o sucesso do modelo experimental e a ativação do processo inflamatório.

O tratamento com a Fr. DCM demonstrou efeitos relevantes na modulação da resposta inflamatória, onde ambas as doses promoveram uma redução expressiva nas concentrações tanto de IL-6 quanto de IL-8, em níveis estatisticamente semelhantes aos observados no grupo tratado com dexametasona, o controle positivo. Esses resultados são consistentes com os dados celulares obtidos anteriormente, que também apontaram para uma redução significativa das células inflamatórias nos grupos tratados com a fração, reforçando seu efeito anti-inflamatório.

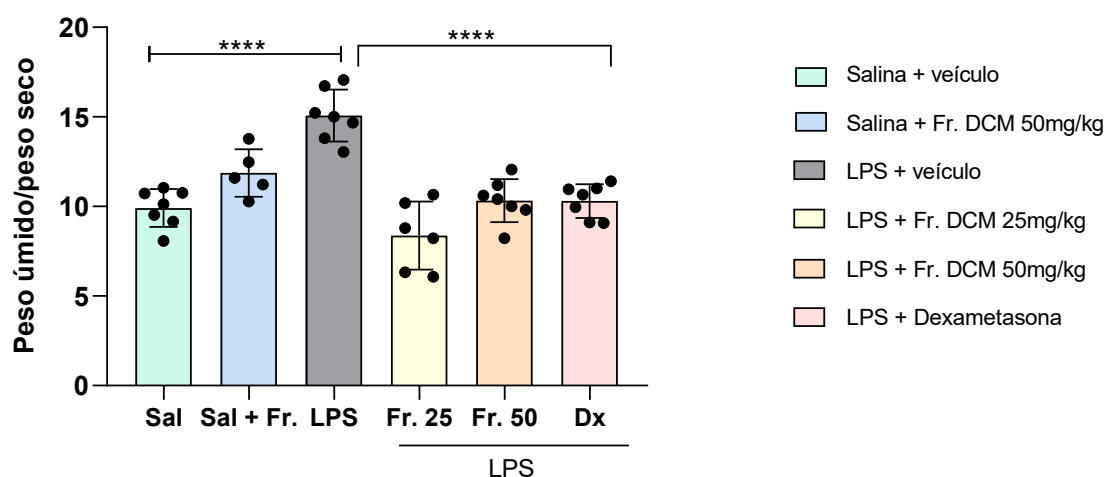
Entretanto, foi observado um aumento pequeno, porém estatisticamente significativo, nos níveis de IL-6 no grupo salina + Fr. DCM em relação ao grupo controle salina ($p < 0,01$). Esse achado não é o suficiente para indicar que, em animais saudáveis, a Fr. DCM na maior dose avaliada possui toxicidade evidente, dado que a contagem total de células e demais citocinas não foram alteradas de forma relevante.

No contexto geral, os resultados confirmam que a fração apresenta o potencial anti-inflamatório pulmonar especialmente na dose de 25 mg/kg, com capacidade de reduzir mediadores pró-inflamatórios-chave, como IL-6 e IL-8, de forma semelhante à dexametasona, mas sem efeitos adversos evidentes.

5.5.3 Relação Peso úmido/peso seco

A relação entre peso úmido e peso seco do pulmão é utilizada como um indicador indireto da presença de edema pulmonar, um dos principais eventos fisiopatológicos na LPA e característica clínica da inflamação (Silva, 2024). Os resultados dessa relação são mostrados na Figura 32.

Figura 32 - Relação peso úmido/peso seco do pulmão após 24 horas. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. **** $p < 0,0001$.



Fonte: Autora (2025)

O grupo tratado com LPS apresentou aumento significativo na relação peso úmido/peso seco em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$) indo de acordo com resultados encontrados por De Castro *et al.* (2023) onde após 24 horas da instilação do LPS, a relação peso úmido/peso seco foi maior do que do grupo controle salina, confirmando o desenvolvimento de edema pulmonar induzido por LPS.

Por outro lado, os grupos tratados com a Fr. DCM demonstraram uma redução significativa dessa relação, evidenciando um efeito protetor da fração contra o acúmulo de fluido pulmonar para ambas as concentrações utilizadas, sendo estatisticamente semelhante ao grupo controle salina e tratado com dexametasona, o fármaco de referência. Apesar da concentração de 25 mg/kg apresentar maior redução, não foi significativo entre os grupos tratados.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta os resultados iniciais sobre a estabilidade de moléculas isoladas de *Fridericia platyphylla* e seu potencial terapêutico no contexto da LPA. A partir da fração diclorometânica (Fr. DCM) do extrato hidroetanólico das raízes dessa espécie, foram isolados três flavonoides diméricos, identificados como brachydina A (BrA), brachydina B (BrB) e brachydina C (BrC). Essas substâncias foram caracterizadas por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, revelando estruturas com quatro anéis aromáticos e um núcleo base comum, diferenciando-se pelos substituintes presentes em um dos anéis.

Os estudos de estabilidade térmica demonstraram que as brachydinas apresentam propriedades desejáveis para o desenvolvimento de fármacos. BrA destacou-se pela maior estabilidade térmica, evidenciada por perdas de massa em temperaturas mais elevadas e maiores valores de energia de ativação. Por outro lado, BrC apresentou a maior vida útil estimada (4 a 5 anos), sugerindo maior estabilidade sob condições prolongadas de armazenamento. No teste de fotoestabilidade, a Fr. DCM demonstrou sensibilidade à luz visível, com degradação potencializada na presença de TiO₂, evidenciando um caminho sustentável para controle ambiental e descarte.

As análises *in silico* revelaram afinidades moleculares relevantes entre as brachydinas e alvos associados à infecção pelo SARS-CoV-2. Observou-se energias de ligação comparáveis ou superiores às de fármacos utilizados durante a pandemia, como remdesivir, Baricitinib entre outros. Esses achados reforçam o potencial multialvo das brachydinas e sua capacidade de interferir em diferentes etapas da infecção viral.

Nos ensaios *in vitro*, a Fr. DCM não apresentou citotoxicidade na concentração de 12,5 µg/mL, com viabilidade celular estatisticamente semelhante ao grupo controle. Contudo, concentrações superiores a 25 µg/mL revelaram toxicidade, especialmente quando associadas ao estímulo com LPS, sugerindo que doses mais baixas são mais seguras para investigações subsequentes. Em particular, na presença de LPS 100 µg/mL, a concentração de 12,5 µg/mL da Fr. DCM não demonstrou citotoxicidade significativa, reforçando sua viabilidade para futuros estudos celulares.

No modelo murino de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS, o tratamento com Fr. DCM (25 e 50 mg/kg) reduziu significativamente a infiltração de células inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar, incluindo neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Além disso, a fração reduziu os níveis de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), alcançando resultados semelhantes aos observados no grupo controle tratado com dexametasona. A análise da relação

peso úmido/peso seco do pulmão também indicou redução do edema pulmonar nos grupos tratados. Notadamente, a dose de 50 mg/kg não causou efeitos adversos em animais saudáveis, exceto na quantificação de IL-6, o que reforça a segurança do uso da Fr. DCM em condições fisiológicas.

Esses resultados indicam que a Fr. DCM das raízes de *Fridericia platyphylla* apresenta atividade anti-inflamatória promissora, com potencial de aplicação no tratamento da LPA. Este trabalho representa uma contribuição inédita para o entendimento das propriedades bioativas dessa planta, tradicionalmente utilizada na medicina popular sob a forma de chá para tratamento de dores e inflamações. Os achados sustentam a possibilidade de desenvolvimento futuro de um fitofármaco voltado ao tratamento de LPA, condição frequentemente associada à COVID-19 e a diversas outras doenças inflamatórias.

Por fim, este estudo reforça a importância da valorização da biodiversidade brasileira e destaca a relevância de investimentos em pesquisas com plantas medicinais no cenário nacional, promovendo o uso sustentável dos recursos naturais e o avanço da ciência e tecnologia no Brasil.

REFERÊNCIAS

AGU, Peter Chinedu et al. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 13398, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-40160-2>. Acesso em: 27 jun. 2025.

ALBUQUERQUE, M.A.L.C et al. Mortalidade por COVID-19 no Maranhão. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 7, p. e5690-e5690, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.54033/cadpedv21n7-125>. Acesso em: 21 jan. 2025.

ALVES, L.; PEREIRA, I.O. Avaliação da atividade leishmanicida de extratos obtidos de diferentes partes de *Arrabidaea brachypoda*. **Revista Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, p. 42-42, 2011. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php/iniciacaocientifica/article/download/453/372>. Acesso em: 20 fev. 2025.

AMORIM, I. B. **Reposicionamento de fármacos antiparasitários para a COVID-19: um estudo in silico**. Monografia (Graduação em Ciências Naturais) - Universidade Federal do Maranhão, São Bernardo, MA, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/5600>. Acesso em: 12 fev. 2025.

ASIF, Muhammad et al. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. **Inflammopharmacology**, v. 28, p. 1153-1161, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10787-020-00744-0>. Acesso em: 21 fev. 2025.

BASU, Anamika; SARKAR, Anasua; MAULIK, Ujjwal. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ECA2. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 17699, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-74715-4>. Acesso em: 28 fev. 2025.

BERNARDO, L. R. **Avaliação do mecanismo de ação da milonina no modelo murino de lesão pulmonar aguda e estudos in silico**. 2022. 109 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos) - Universidade Federal de João Pessoa. João Pessoa, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/23060>. Acesso em: 28 fev. 2025.

BEZERRA, B.S; DA SILVA et al. Evolução dos casos de COVID-19 de dezembro de 2019 a outubro de 2020 no Maranhão. **Saúde Coletiva**, v. 11, n. 63, p. 5536-5545, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.36489/saudecoletiva.2021v11i63p5536-5545>. Acesso em: 21 fev. 2025.

BITTENCOURT-MERNAK, Márcia Isabel et al. Prophylactic and therapeutic treatment with the flavonone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 2, p. L217-L230, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00444.2015>. Acesso em: 14 abr. 2025.

BRAGA, Joelma Correia Beraldo; DA SILVA, Luan Ramos. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19.

Brazilian Journal of Health Review, v. 4, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-303>. Acesso em: 10 fev. 2025.

BRANDÃO, G. C. *et al.* Antiviral Activity of Bignoniaceae Species Occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): Part 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469–476, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02924.x>. Acesso em: 6 dez. 2024.

BRANDÃO, S.C.S. *et al.* COVID-19 grave: entenda o papel da imunidade, do endotélio e da coagulação na prática clínica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.200131>. Acesso em: 28 fev. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 318, de 06 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2019. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3898778/RDC_318_2019_.pdf/72014894122d433e-97b0-2c48bfb4ab54. Acesso em: 28 jan. 2025.

CAMARGO, Leandro do Nascimento. **Efeitos do anti-IL-17 na inflamação, remodelamento do estresse oxidativo em um modelo de sobreposição ASMA-DPOC (ACO)**. 2024. Tese de Doutorado (Programa de Ciências Médicas), Universidade de São Paulo, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.5.2024.tde-28112024-133857>. Acesso em: 10 jun. 2025.

CARDOSO, Nayara Araújo; ROCHA, Renan Rhonalty; LAURINDO, Maria Vitória. **Princípios em Farmácia 2**. Atena Editora, Ponta Grossa, PR, 2019.

CHATAKE, Vikram S. *et al.* Pyrolysis of castor seed shells: Kinetic and thermodynamic study using thermogravimetric analysis (TGA). **Bioresource Technology Reports**, v. 26, p. 101837, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101837>. Acesso em: 28 fev. 2025.

CHAVAN, Sandeep *et al.* Lipid-based ayurvedic formulations of a single herb-Yashtimadhu (*Glycyrrhiza glabra*): Pharmaceutical standardization, shelf-life estimation and comparative characterization. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 14, n. 2, p. 100711, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2023.100711>. Acesso em: 28 fev. 2025.

CHEN, Bo *et al.* Pyrolysis behaviour and kinetic analysis of waste polylactic acid composite reinforced with reed straw processing residue. **Carbon Resources Conversion**, v. 7, n. 3, p. 100226, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2024.100226>. Acesso em: 28 fev. 2025.

CHRISTY, M. P. *et al.* Natural Products with Potential to Treat RNA Virus Pathogens Including SARSCoV-2. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 1, p. 161–182, 2020. Disponível em: <https://doi.org.ez14.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acs.jnatprod.0c00968>. Acesso em: 06 set. 2024.

DA ROCHA, L.P.B. *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282-e44101018282, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18282>. Acesso em: 3 dez. 2024.

DARGAHI, Abdollah *et al.* Electrodegradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide from aqueous solution using three-dimensional electrode reactor with G/β-PbO₂ anode: Taguchi optimization and degradation mechanism determination. **RSC advances**, v. 8, n. 69, p. 39256-39268, 2018. Disponível em: [10.1039/C8RA08471H](https://doi.org/10.1039/C8RA08471H). Acesso em: 10 mar. 2025.

DASSANAYAKE, Mackingsley Kushan *et al.* Molecular docking and in silico analysis of natural biomolecules against dengue, ebola, zika, SARS-CoV-2 variants of concern and monkeypox virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11131, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms231911131>. Acesso em: 27 jun. 2025.

DE CASTRO, Stephanie Nonato *et al.* Pulmonary acute lung injury causes behavioral changes, oxidative stress imbalance, and reduced brain nicotinic receptors expression. **European Respiratory Journal**, v. 62, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2023.OA2628>. Acesso em: 13 jun. 2025.

DE MATOS, Rafael C. *et al.* Evidence for the efficacy of anti-inflammatory plants used in Brazilian traditional medicine with ethnopharmacological relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 118137, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118137>. Acesso em: 12 fev. 2025.

DEB, Paroma; MOLLA, Md Maruf Ahmed; SAIF-UR-RAHMAN, K. M. An update to monoclonal antibody as therapeutic option against COVID-19. **Biosafety and Health**, v. 3, n. 02, p. 87-91, 2021. Disponível em: <https://mednexus.org/doi/full/10.1016/j.bsheat.2021.02.001>. Acesso em: 15 jun. 2025.

DO NASCIMENTO, Jessyane Rodrigues *et al.* A Review of the Phytochemistry and Pharmacological Properties of the Genus *Arrabidaea*. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 6, p. 1–29, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph15060658>. Acesso em: 15 fev. 2025.

DOYLE, C. D. Estimating isothermal life from thermogravimetric data. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 6, n. 24, p. 639-642, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.1962.070062406>. Acesso em: 02 jun. 2025

ETIENNE, Rachelle; VIEGAS, Flávia Pereira Dias; VIEGAS JR, Claudio. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v13n1a12.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2025.

FACCI, Júlia *et al.* Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de consumos e produtos farmacêuticos. **Química Nova**, v. 7, pág. 959-973, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170565>. Acesso em: 28 fev. 2025.

FARID-UL-HAQ, Muhammad *et al.* Comparative isoconversional thermal analysis of Artemisia vulgaris hydrogel and its acetates; a potential matrix for sustained drug delivery. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 25, n. 7, p. 529-538, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1023666X.2020.1819085> Acesso em: 28 fev. 2025.

GANDHI, Gopalsamy Rajiv *et al.* Anti-inflammatory natural products as potential therapeutic agents of rheumatoid arthritis: A systematic review. **Phytomedicine**, v. 93, p. 153766, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153766>. Acesso em: 21 jun. 2025.

GAO, Xiao-han *et al.* Anti-inflammatory effects of neochlorogenic acid extract from mulberry leaf (*Morus alba* L.) against LPS-stimulated inflammatory response through mediating the AMPK/Nrf2 signaling pathway in A549 cells. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1385, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25061385>. Acesso em: 20 mar. 2025.

GATERA, Vesara A. *et al.* Vitamin D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in A549 cells by downregulating inflammatory cytokines. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 27, p. e931481-1, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8202123/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

GONÇALVES, S.Q.B; FILHO, E.A.S; OLIVEIRA, A.S. Coronavírus e sua protease principal: uma visão para o planejamento de fármacos por docagem molecular. **Revista IfesCiência**. v. 6, Edição Especial n.1, 2020. Disponível em: 10.36524/ric.v6i1.626. Acesso em: 5 fev. 2025.

GONDIM, Natália Chaves. **Terpenos naturais como candidatos ao tratamento da infecção causada pelo Sars-cov-2: estudo in silico da complexação com proteínas virais**. 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/67194>. Acesso em: 27 jun. 2025.

GRELA, Ewa; KOZŁOWSKA, Joanna; GRABOWIECKA, Agnieszka. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. **Acta histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303-311, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GUAN, Wei-jie *et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020. Disponível em: 10.1056/NEJMoa2002032. Acesso em: 28 fev. 2025.

GUERREIRO, Marina Pinheiro. **Avaliação dos efeitos dos constituintes de óleos essenciais (timol, carvacrol e p-cimeno) na inflamação pulmonar aguda induzida por instilação de LPS em camundongos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2015. Disponível em: <http://repositorio.unifesp.br/handle/11600/46144>. Acesso em: 24 jun. 2025.

GUO, Wei *et al.* Thermal properties of drug polymorphs: A case study with felodipine form I and form IV. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 24, n. 6, p. 474-483, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2020.04.003>. Acesso em: 28 fev. 2025.

GUPTA, Yash *et al.* Heparin: A simplistic repurposing to prevent SARS-CoV-2 transmission in light of its in-vitro nanomolar efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 203-212, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.148>. Acesso em: 5 jan. 2025.

GUPTA, Yash *et al.* Protein structure-based in-silico approaches to drug discovery: Guide to COVID-19 therapeutics. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 91, p. 101151, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299722000966?via%3Dihub>. Acesso em: 14 dez. 2024.

HAUTE, Gabriela Viegas *et al.* Anti-inflammatory effect of octyl gallate in alveolar macrophages cells and mice with acute lung injury. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 9, p. 6073-6084, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.29536>. Acesso em: 27 jun. 2025.

HUANG, H.; WANG, Y. The protective effect of cinnamaldehyde on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, n. 8, p. 58-63, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.8.13>. Acesso em: 29 jan. 2025.

JOSE, Jobin *et al.* In silico trial approach for biomedical products: a regulatory perspective. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 25, n. 12, p. 1991-2000, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1386207325666220105150147>. Acesso em: 27 jun. 2025.

KWON, Jeongyoon *et al.* Nimesulide-induced hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0209264, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209264>. Acesso em: 20 jun. 2025.

LEITE, J.P.V. *et al.* Trypanocidal Activity of Triterpenes from Arrabidaea Triplinervia and Derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2307–2309, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2307> Acesso em: 8 fev. 2025.

LIMA, W.K.R. *et al.* Efeito antiviral dos compostos isolados de flores de *Arrabidaea brachypoda* contra SARS-COV-2. **Caderno Pedagógico**, v. 21, n. 8, p. e6462-e6462, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.54033/cadpedv21n8-056>. Acesso em: 28 dez. 2024.
LPS in mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1021, 2018.

MÁCA, Jan *et al.* Past and present ARDS mortality rates: a systematic review. **Respiratory care**, v. 62, n. 1, p. 113-122, 2017. Disponível em: <https://rc.rcjournal.com/content/62/1/113.short>. Acesso em: 28 fev. 2025.

MEERAN, M.F *et al.* Can limonene be a possible candidate for evaluation as an agent or adjuvant against infection, immunity, and inflammation in COVID-19?. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(20\)32546-9](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(20)32546-9). Acesso em: 18 fev. 2025.

MENEGUZZO, F. *et al.* Review of evidence available on hesperidin-rich products as potential tools against COVID-19 and hydrodynamic cavitation-based extraction as a method of increasing their production. **Processes**. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr8050549>. Acesso em: 02 fev. 2025.

MERAD, Miriam; MARTIN, Jerome C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature reviews immunology**, v. 20, n. 6, p. 355-362, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0331-4>. Acesso em: 10 fev. 2025.

MONTEIRO, Fabio de Souza *et al.* Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Arrabidaea brachypoda* (Dc.) Bureau Present Antispasmodic Activity Mediated through Calcium Influx Blockage. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 41, p. 1– 13, 2020.

Disponível em: <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/667>. Acesso em: 16 fev. 2025.

MOREIRA, D.C.I., FEITOSA, G.A., ABREU, C.R.C. As doenças virais no mundo contemporâneo: uma revisão bibliográfica. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n. 10, p. 247-257, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6787812%20>. Acesso em: 15 fev. 2025.

MOUDGIL, Kamal D.; VENKATESHA, Shivaprasad H. The anti-inflammatory and immunomodulatory activities of natural products to control autoimmune inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 1, p. 95, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24010095>. Acesso em: 20 jun. 2025.

MOWERY, N.T., TERZIAN, W.T.H., NELSON, A.C. Acute lung injury. **Current problems in surgery**, v. 57, n. 5, p. 100777, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpsurg.2020.100777>. Acesso em: 17 dez. 2024.

MUCHA, Igor *et al.* Thermal stability and decompositions kinetics under non-isothermal conditions of imatinib mesylate α form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 9-14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.032>. Acesso em: 28 fev. 2025.

MUNSHI, Laveena *et al.* Prone position for acute respiratory distress syndrome. A systematic review and meta-analysis. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 14, n. Supplement 4, p. S280-S288, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4037/ccn2015990>. Acesso em: 28 fev. 2025.

NASCIMENTO, G.E. *et al.* Influência da utilização do dióxido de titânio na degradação do fármaco paracetamol. **58º Congresso Brasileiro de Química**, São Luís, 2018. Disponível em: <https://www.abq.org.br/cbq/2018/trabalhos/5/702-26091.html> Acesso em: 8 jan. 2025.

NEIVA, Aiana; TREVISAN, Márcio. Influência do armazenamento e prazo de validade na estabilidade e ocorrências de eventos adversos no uso de medicamentos. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 15, pág. e91101522341-e91101522341, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.22341>. Acesso em: 15 fev. 2025.

OLIVEIRA, Ariane Delfino *et al.* Perfil de segurança de formulação anti-inflamatória tópica de *Cordia verbenacea*: dados de mundo real. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 27600-27613, 2021. Disponível em: 10.34119/bjhrv4n6-318. Acesso em: 12 fev. 2025.

PASCOAL, David Balbino *et al.* Síndrome Respiratória Aguda: uma resposta imunológica exacerbada ao COVID19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 2978-2994, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n2-138>. Acesso em: 2 mar. 2025.

PAULETTI, Patrícia Mendonça *et al.* Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500003>. Acesso em: 10 fev. 2025.

PINHEIRO, A.J.M.C.R. *et al.* Galloyl- hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-glucose isolated from *Punica granatum L.* leaves protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury

in BALB/c mice. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1978, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01978>. Acesso em: 16 fev. 2025.

PINHEIRO, Nathalia M. *et al.* Acute lung injury is reduced by the $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1, p. 320-332, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201600431r>. Acesso em: 15 fev. 2025.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **Plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS**. Ministério da Saúde. 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/plantas-medicinais-e-fitoterapicos/ppnmpf/renisus>. Acesso em: 24 jan. 2025.

RIBEIRO, Diego Luís *et al.* The Antitumoral/Antimetastatic Action of the Flavonoid Brachyidin A in Metastatic Prostate Tumor Spheroids In Vitro Is Mediated by (Parthanatos) PARP-Related Cell Death. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 963, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050963>. Acesso em: 20 fev. 2025.

RIGBY, Sean P. Uses of Molecular Docking Simulations in Elucidating Synergistic, Additive, and/or Multi-Target (SAM) Effects of Herbal Medicines. **Molecules**, v. 29, n. 22, p. 5406, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29225406>. Acesso em: 27 jun. 2025

RIGHETTI, Renato Fraga *et al.* Protective effects of anti-IL17 on acute lung injury induced by LPS in mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1021, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01021>. Acesso em: 7 jul. 2025.

ROCHA, Cláudia Q. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.009>. Acesso em: 30 jan. 2025.

ROCHA, Cláudia Q. *et al.* Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of natural products**, v. 77, n. 6, p. 1345-1350, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np401060j> .Acesso em: 30 jan. 2025.

ROCHA, Claudia Q. *et al.* Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. **Phytochemistry**, v. 135, p. 93-105, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.002>. Acesso em: 2 fev. 2025.

ROCHA, F. A. *et al.* O Uso Terapêutico Da Flora Na História Mundial. **Holos**. 1, 49-61, 2015. Disponível em: 10.15628/holos.2015.2492. Acesso em: 28 fev. 2025.

ROCHA, V.P.C. *et al.* Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24010001>. Acesso em: 28 jan. 2025.

RODRIGUES, Vinícius Peixoto *et al.* Involvement of opioid system, TRPM8, and ASIC receptors in antinociceptive effect of *Arrabidaea brachypoda* (DC) bureau. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2304, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18112304>. Acesso em: 18 fev. 2025.

ROSÁRIO, Marcelino Santos. **Isolamento, caracterização química e avaliação do potencial anti-leishmania das flores de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau**. 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/4509>. Acesso em: 28 fev. 2025.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94817>. Acesso em: 28 fev. 2025.

SALGADO, Carlota *et al.* In vitro anti-inflammatory activity in arthritic synoviocytes of *A. brachypoda* root extracts and its unusual dimeric flavonoids. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5219, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25215219>. Acesso em: 6 jan. 2025.

SANTOS, D.S, RODRIGUES, M.M.F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017. Disponível em: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35. Acesso em: 30 jan. 2025.

SCACCIA, Silvera. TG–FTIR and kinetics of devolatilization of Sulcis coal. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 95-102, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2013.09.002>. Acesso em: 28 fev. 2025.

SILVA, Juliane Santos de França. **Efeito anti-inflamatório de ouabaína em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/9076>. Acesso em: 30 jun. 2025.

SILVA, L.C.O, ANDRADE, G.F., OLIVEIRA, M.A. Estabilidade de fármacos e medicamentos: uma análise histórica das estratégias para a determinação do prazo de validade. **Health and Biosciences**, v. 5, n. 3, p. 25-52, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.47456/hb.v5i3.46290>. Acesso em: 17 fev. 2025.

SILVA, Lara Mara Gomes da. **Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) reduz a inflamação e disfunção pulmonar secundárias ao refluxo gastroesofágico em camundongos**. 2024. 74 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/77638>. Acesso em: 01 jul. 2025.

SOBEK, S. *et al.* Brewer's spent grain pyrolysis kinetics and evolved gas analysis for the sustainable phenolic compounds and fatty acids recovery potential. **Renewable Energy**, v. 199, p. 157-168, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.08.114>. Acesso em: 28 fev. 2025.

SOUZA, Hellen Cris Araújo. **Estudo *in silico* com o processo de docagem molecular do potencial farmacológico da Moringa oleifera Lam. moringaceae contra os alvos do sars-cov-2**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Naturais – Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Bernardo, 2023. Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/7155>. Acesso em: 7 jul. 2025.

STANZIONE, Francesca; GIANGRECO, Ilenia; COLE, Jason C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in medicinal chemistry**, v. 60, p. 273-343, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>. Acesso em: 27 jun. 2025.

STEINER, Silvio *et al.* SARS-CoV-2 biology and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 206-225, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>. Acesso em: 28 fev. 2025.

TORRES, Carola Analía *et al.* In Vitro Antimicrobial Activity of 20 Selected Climber Species from the Bignoniaceae Family. **Natural Product Research**, v. 27, n. 22, p. 2144–2148, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.782490>. Acesso em: 15 fev. 2025.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **1079 Good storage and shipping practices. United States Pharmacopeia**, 2020. Disponível em: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_c1079.html. Acesso em: 10 fev. 2025.

V'KOVSKI, Philip *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00468-6>. Acesso em: 30 jun. 2025.

VELIKOVA, Tsvetelina *et al.* Harnessing immunity: Immunomodulatory therapies in COVID-19. **World Journal of Virology**, v. 13, n. 2, p. 92521, 2024. Disponível em: [10.5501/wjv.v13.i2.92521](https://doi.org/10.5501/wjv.v13.i2.92521). Acesso em: 5 jun. 2025.

WANG, Chaofu *et al.* Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 57, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833>. Acesso em: 18 jan. 2025.

WANG, Fei *et al.* LPS-induced inflammatory response and apoptosis are mediated by Fra-1 upregulation and binding to YKL-40 in A549 cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1474, 2021. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2021.10909>. Acesso: 10 jul. 2025.

WANG, Si-wei *et al.* GPR84 regulates pulmonary inflammation by modulating neutrophil functions. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 44, n. 8, p. 1665-1675, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41401-023-01080-z>. Acesso em: 12 jan. 2025.

YANG, Caiqin *et al.* Experimental and DFT simulation study of a novel felodipine cocrystal: characterization, dissolving properties and thermal decomposition kinetics. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 154, p. 198-206, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.006>. Acesso em: 28 fev. 2025.

ZHANG, Mengxun *et al.* Development of Broad-Spectrum Antiviral Agents- Inspiration from Immunomodulatory Natural Products. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1257, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13071257>. Acesso em: 2 jan. 2025.

ZHANG, Peng *et al.* Association of inpatient use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers with mortality among patients with hypertension hospitalized with COVID-19. **Circulation research**, v. 126, n. 12, p. 1671-1681, 2020.

Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCRESAHA.120.317134>. Acesso em: 9 fev. 2025.

ZHU, Lulu *et al.* Effect of gallic acid and chlorogenic acid on physicochemical, microstructural and thermal degradation properties of ready-to-eat sea cucumber. **Food Chemistry**, v. 380, p. 132186, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132186>. Acesso em: 28 fev. 2025.

ZORN, Bettina *et al.* 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 831-835, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00038-3). Acesso em: 20 jan. 2025.

ZULHENDRI, Felix *et al.* Recent update on the anti-inflammatory activities of propolis. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8473, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27238473>. Acesso em: 20 mai. 2025.