



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA LORENA DE OLIVEIRA ANDRADE

EXPLORANDO BIOATIVOS DA CAATINGA: EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
***Apodanthera glaziovii* COGN. (CUCURBITACEAE) RICO EM SAPONINAS**
DEMONSTRA FORTE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

CAMPINA GRANDE

2024

MARIA LORENA DE OLIVEIRA ANDRADE

**EXPLORANDO BIOATIVOS DA CAATINGA: EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
Apodanthera glaziovii COGN. (CUCURBITACEAE) RICO EM SAPONINAS
DEMONSTRA FORTE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves.

Coorientador: Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski.

CAMPINA GRANDE

2024

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A554e Andrade, Maria Lorena Oliveira.

Explorando bioativos da caatinga [manuscrito] : extrato hidroetanólico de *Apodanthera glaziovii* COGN. (Cucurbitaceae) rico em saponinas demonstra forte atividade anti-inflamatória / Maria Lorena Oliveira Andrade. - 2024.
100 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de Farmácia - CCBS".

1. Toxicidade. 2. Cucurbitaceae. 3. Saponinas triterpênicas. I. Título

21. ed. CDD 615.7

MARIA LORENA DE OLIVEIRA ANDRADE

EXPLORANDO BIOATIVOS DA CAATINGA: EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
APODANTHERA GLAZIOVII COGN. (CUCURBITACEAE) RICO EM SAPONINAS
DEMONSTRA FORTE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Dissertação apresentada à
Coordenação do Curso de Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestra
em Ciências Farmacêuticas

Linha de Pesquisa: Obtenção e
avaliação da atividade biológica de
produtos natu.

Aprovada em: 07/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado eletronicamente por:

• **Harley da Silva Alves** (***.030.664-**), em **19/03/2025 08:31:58** com chave
c47a0dbc04b511f0b02706adb0a3afce.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura
do QRCode ao lado ou acesse [https://suap.uepb.edu.br/comum/
autenticar_documento/](https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/) e informe os dados a seguir.

Tipo de Documento: Folha de Aprovação do Projeto Final

Data da Emissão: 01/09/2025

Código de Autenticação: b05e82



AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ensinar a perseverar a cada instante, me trazendo força, sabedoria e proteção ao longo de toda esta jornada.

A meus pais e irmã, Aclécia, Walter e Laura, por todo amor, acolhimento e apoio incondicional. Vocês foram minha base e inspiração para alcançar os meus sonhos.

Ao meu amor, Kaio Vinícius, por toda paciência, resiliência e apoio em meio às tempestades. Sua presença tornou essa caminhada muito mais leve.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho, Genil, Naara, Magna e Edvânia (Manu), que compartilharam comigo tanto as alegrias quanto as dificuldades da vida acadêmica.

A Helen, Mariana e Igor, que muito contribuíram para a rotina do laboratório com seu trabalho e companheirismo.

Aos laboratórios parceiros: ao LABDEM—Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos; ao INSA—Instituto Nacional do Semiárido; ao IPeFarM—Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB. Agradeço ainda à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, e ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA/UFPB). Meu carinho especial vai para o LDCPF—Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, que não apenas acolheu minhas análises, mas também me proporcionou momentos inesquecíveis ao lado de grandes amigos: Gabryella, Beatriz, Jonas, Analara, Kamilla e Letícia minha gratidão por sempre me ouvir e por compartilharmos tantas risadas, além das conversas inesquecíveis ao longo desses anos.

A Thiago, secretário da pós-graduação, minha gratidão por toda ajuda com as questões burocráticas e pelas conversas que tornaram essa caminhada mais leve.

Aos meus orientadores, Samuel e Harley, por me guiarem nesta caminhada, pela paciência, dedicação e incentivo que tornaram possível a realização deste trabalho. Meu muitíssimo obrigada!

RESUMO

As plantas medicinais são reconhecidas por fornecerem diversos benefícios à saúde, assim como relatado para diversas espécies da família cucurbitaceae, como melancia, melão e abóbora. Pertencente a esta família, a espécie *Apodanthera glaziovii* despertou interesse para estudos fitoquímicos e farmacológicos devido à escassez de pesquisas sobre seu potencial terapêutico e seus constituintes químicos. Neste estudo, foram empregadas abordagens qualitativas e quantitativas para identificar os metabólitos secundários presentes na espécie em questão. Além disso, a análise e o isolamento dos compostos foram realizados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). Para avaliar a atividade antimicrobiana do Extrato hidroetanólico (70%) liofilizado de *A. glaziovii* (EHL-Ag), o teste de microdiluição em placa foi empregado, tanto para bactérias quanto para fungos. Em relação à toxicidade, foram utilizados métodos para avaliar a atividade hemolítica em eritrócitos humanos, bem como o teste de toxicidade aguda *in vivo*. Além disso, foi conduzido o teste de genotoxicidade, determinando o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) de camundongos. Para investigar a atividade anti-inflamatória, foram empregados testes de edema de pata, peritonite e bolsão de ar induzidos por carragenina. Os resultados constataram que as saponinas são os metabólitos predominantes nesta espécie. Análises cromatográficas identificaram comprimentos de onda característicos de caiaponosídeos (nor-cucurbitacinas), levando ao isolamento de um composto conhecido como Caiaponosídeo D2. Embora o extrato de *Apodanthera glaziovii* não tenha demonstrado atividade antimicrobiana para os micro-organismos testados, testes de toxicidade hemolítica indicaram um baixo potencial hemolítico, com a maior concentração testada de 2000 µg /mL correspondendo a apenas 4,80% de hemólise. No teste de toxicidade aguda em camundongos *in vivo*, o extrato apresentou sinais de toxicidade, na dose de 2.000 mg/kg, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Por outro lado, os resultados da atividade anti-inflamatória foram promissores: o extrato reduziu significativamente o edema de pata em 55%, o influxo de neutrófilos em 68% e o de leucócitos em 62% na peritonite, além de diminuir em 70% o influxo de neutrófilos no teste em bolsão de ar, todos na dose 100 mg/kg. Esses achados sugerem que a *Apodanthera glaziovii* possui potencial anti-inflamatório, destacando a importância da pesquisa de novos agentes terapêuticos em plantas medicinais.

Palavras-chave: caatinga; Cucurbitaceae; saponinas triterpênicas; toxicidade; anti-inflamatório.

ABSTRACT

Medicinal plants are recognized for providing various health benefits, as reported for several species of the cucurbitaceae family, such as watermelon, melon and pumpkin. Belonging to this family, the species *Apodanthera glaziovii* has aroused interest in phytochemical and pharmacological studies due to the scarcity of research into its therapeutic potential and chemical constituents. In this study, qualitative and quantitative approaches were used to identify the secondary metabolites present in the species in question. In addition, the compounds were analyzed and isolated using High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detection (HPLC-DAD). To assess the antimicrobial activity of the freeze-dried hydroethanolic extract (70%) of *A. glaziovii* (EHL-Ag), the microdilution plate test was used, both for bacteria and fungi. With regard to toxicity, methods were used to assess hemolytic activity in human erythrocytes, as well as the in vivo acute toxicity test. In addition, a genotoxicity test was carried out, determining the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in mice. To investigate anti-inflammatory activity, carrageenan-induced paw edema, peritonitis and air pocket tests were used. The results showed that saponins are the predominant metabolites in this species. Chromatographic analysis identified characteristic wavelengths of cayponosides (nor-cucurbitacins), leading to the isolation of a compound known as Cayponoside D2. Although the *Apodanthera glaziovii* extract did not demonstrate antimicrobial activity for the microorganisms tested, hemolytic toxicity tests indicated a low hemolytic potential, with the highest concentration tested of 2000 µg /mL corresponding to only 4.80% hemolysis. In the acute toxicity test on mice in vivo, the extract showed signs of toxicity in biochemical and hematological parameters at a dose of 2,000 mg/kg. On the other hand, the results of the anti-inflammatory activity were promising: the extract significantly reduced paw edema by 55%, neutrophil influx by 68% and leukocyte influx by 62% in peritonitis, as well as reducing neutrophil influx by 70% in the air pocket test, all at a dose of 100 mg/kg. These findings suggest that *Apodanthera glaziovii* has anti-inflammatory potential, highlighting the importance of research into new therapeutic agents in medicinal plants.

Keywords: caatinga; Cucurbitaceae; triterpenic saponins; toxicity; anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Distribuição por biomas típicos do gênero <i>Apodanthera</i> no Brasil.	20
Figura 2 – Distribuição geográfica de duas espécies do gênero <i>Apodanthera</i> , em vermelho <i>Apodanthera glaziovii</i> e em azul <i>Apodanthera hindii</i>	22
Figura 3 – <i>Apodanthera glaziovii</i> Cogn. a. Ramos com flores; b. flor estaminada; c. flor estaminada dissecada; d. flor pistilada; e. fruto.	23
Figura 4 – Esquema resumido da rota biossintética dos componentes do metabolismo primário e secundário.	25
Figura 5 – Estrutura do Paclitaxel. Medicamento antineoplásico derivado de um diterpeno. .	26
Figura 6 – Biossíntese dos terpenos.	27
Figura 7– Estrutura do esqueleto cucurbitano.	29
Figura 8 – Biossíntese das cucurbitacinas.	29
Figura 9 – Estruturas das cucurbitacinas A, E e Q.	31
Figura 10 – Estruturas de cucurbitacinas B e D.	31
Figura 11 – Caiaponosídeos A e B.	33
Figura 123 – Caiaponosídeos C e D.	33
Figura 13 – Estrutura do caiaponósido C _{5b}	34
Figura 14 – Localização da cidade de Belo Jardim-PE.	37
Figura 15 – A. Raízes e tubérculos separados do caule; B. Caule secando em estufa de circulação forçada de ar; C. Material vegetal final pulverizado e armazenado.	38
Figura 16 – A. Filtração bastante espumosa do EHB de <i>A. glaziovii</i> ; B. Eliminação de água residual para formação do EHL, com presença de bastante espuma.	39
Figura 17 – Extração 1 a 4 apresentando coloração avermelhada.	40
Figura 18 – Extração 8 e 9 apresentando coloração esverdeada, respectivamente.	40
Figura 19 – Extratos liofilizados e armazenados separadamente. Extratos dos dias 1 ao 5; e extratos dos dias 6 ao 8, respectivamente.	41
Figura 20 – Particionamento dos caules de <i>A. glaziovii</i>	41
Figura 21 – Isolamento e Identificação da fração 5(C1/5) do EHL-Ag 5.	45
Figura 22 – Fracionamento da fase diclorometano dos caules de <i>A. glaziovii</i> em CLMP.	46
Figura 23 – Fracionamento da fração 8.2 da fase diclorometano dos caules de <i>A. glaziovii</i> em CLMP.	47
Figura 24– Cromatograma do método desenvolvido para coluna preparativa nas condições descritas no item 4.5.7, no comprimento de 254 nm.	48

Figura 25– Cromatograma do método desenvolvido para coluna preparativa nas condições descritas no item 4.5.7, no comprimento de 330 nm.....	49
Figura 26 – Perfil cromatográfico da primeira extração (dia 1) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	58
Figura 27 – Perfil cromatográfico da segunda extração (dia 2) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	58
Figura 28 – Perfil cromatográfico da terceira extração (dia 3) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	59
Figura 29 – Perfil cromatográfico da quarta extração (dia 4) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	59
Figura 30 – Perfil cromatográfico da quinta extração (dia 5) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	59
Figura 31 – Perfil cromatográfico da sexta extração (dia 6) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	60
Figura 32 – Perfil cromatográfico da sétima extração (dia 7) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	60
Figura 33 – Perfil cromatográfico da oitava extração (dia 8) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	60
Figura 34 – Perfil cromatográfico da nona extração (dia 9) do EHL de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	61
Figura 35 – Perfil cromatográfico do EHL-Ag1/5 dos caules de <i>A. glaziovii</i> . Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).....	61
Figura 36. –Espectro de RMN ¹ H do Extrato Hidroetanólico Liofilizado de <i>Apodanthera glaziovii</i> (EHL-Ag1/5) (DMSO, 500 MHz).	64
Figura 37 –Espectro de RMN ¹³ C do Extrato Hidroetanólico Liofilizado de <i>Apodanthera glaziovii</i> (EHL-Ag1/5) (DMSO, 500 MHz).	65
Figura 38 – Estrutura da substância caiaponosídeo D2.....	66
Figura 39 – Espectro de RMN de ¹ H (MeOD-d ₄ , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2.....	69
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (MeOD-d ₄ , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 0,85 a 2,0 ppm.....	70
Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (MeOD-d ₄ , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 2,05 a 3,0 ppm.....	71
Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ¹ H (MeOD-d ₄ , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 3,05 a 4,0 ppm.....	72

Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 4,0 a 5,0 ppm.....	73
Figura 44 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 5,05 a 6,0 ppm.....	74
Figura 45 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 6,0 a 7,0 ppm.....	75
Figura 46 – Resultado negativo no teste de microdiluição para fase acetato de etila, extrato bruto e fase butanólica, para todos os microorganismos testados, respectivamente.....	77
Figura 47 – Resultado negativo no teste de microdiluição para fase diclorometano e fase aquosa, para todos os microorganismos testados, respectivamente.	77
Figura 48 – Efeito do EHL-Ag1/5 no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.	85
Figura 49– O Efeito do EHL-Ag1/5 na peritonite induzida por carragenina em camundongos.	87
Figura 50 – Efeito da administração de EHL-Ag1/5 na migração de leucócitos no modelo de bolsa de ar.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos terpenos.....	28
Tabela 2 – Rendimento extrativo do EHL de <i>A. glaziovii</i> obtidos por Maceração.....	39
Tabela 3 – Rendimento das fases obtidas por partição líquido:líquido do extrato hidroetanólico de <i>A. glaziovii</i>	42
Tabela 4 – Pesquisa de metabólitos secundários no EHL-Ag1/5e fases de <i>A. glaziovii</i>	42
Tabela 5– Descrição dos tempos de retenção dos picos coletados na CLAE preparativo	49
Tabela 6 – Teor de metabólitos secundários presentes nos caules de <i>A. glaziovii</i>	57
Tabela 7 – Dados comparativos com a literatura dos espectros de RMN de ¹ H do composto caiaponosídeo D2.	67
Tabela 8 – Avaliação do consumo alimentar, hídrico e ganho de peso dos grupos controles e tratado com EHL-Ag1/5 durante 14 dias.....	80
Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com extrato do caule de <i>Apodanthera glaziovii</i> por 14 dias.....	81
Tabela 10 – Parâmetros hematológicos do sangue de camundongos tratados com EHL-Ag1/5 por 14 dias.	82
Tabela 11 – Avaliação da genotoxicidade <i>in vivo</i> do EHL-Ag1/5, controle positivo da ciclofosfamida (CPA, i.p.) para determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) de camundongos.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD3OD	Metanol deuterado
DCM	Diclorometano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	Dubleto
dd	Duplo Dubleto
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EH	Extrato Hidroetanólico
EHL	Extrato Hidroetanólico Liofilizado
EHLAg1/51/5	Extrato Hidroetanólico Liofilizado de <i>Apodanthera glaziovii</i> das
frações 1 a 5.	
F	Fases particionadas
Hex	Hexano
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
MeOH:H ₂ O	Metanol:Água
MHz	Mega Hertz
m	Multiplete
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetros
ppm	Parte por Milhão
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	rotações Por Minuto
s	singleto
TG	Termogravimetria

TMS	Trimetil-hidroxilano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento Químico em partes por milhão.
δ_c	Deslocamento Químico em partes por milhão de carbono
δ_H	Deslocamento Químico em partes por milhão de hidrogênio
μL	Microlitros
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específico	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Família Cucurbitaceae	18
3.2	Gênero Apodanthera Arn.	20
3.3	Apodanthera glaziovii Cogn.....	22
3.4	Metabólitos Secundários	24
3.4.1	<i>Terpenos</i>	26
3.4.1.1	Triterpenos - Esqueleto cucurbitano.....	28
3.5	Processo inflamatório e terapia anti-inflamatória	35
4	METODOLOGIA	37
4.1	Coleta e identificação botânica.....	37
4.2	Processamento do material vegetal	38
4.3	Obtenção dos extratos	38
4.4	Fracionamento do EHL-Ag 1/5	41
4.5	Caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico e fases de <i>A. glaziovii</i>	42
4.5.1	<i>Screening fitoquímico</i>	42
4.5.2	<i>Determinação do teor de metabólitos secundários</i>	43
4.5.2.1	Teor de polifenóis totais	43
4.5.2.2	Teor de flavonoides	43
4.5.2.3	Teor de taninos condensados.....	44
4.5.3	<i>Caracterização cromatográfica dos extratos de A. glaziovii</i>	44
4.5.4	<i>Fracionamento cromatográfico do extrato obtido na quinta extração</i>	45
4.5.5	<i>Cromatografia líquida de média pressão da fase DCM</i>	45
4.5.6	<i>Coluna 2 da fração 8.2 da fase DCM</i>	46

4.5.7	<i>Refracionamento da amostra FR-1516 por CLAE em escala preparativa</i>	47
4.6	Métodos Espectroscópicos	50
4.6.1	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	50
4.7	Atividade antimicrobiana	50
4.7.1	<i>Preparação das amostras</i>	50
4.7.2	<i>Microrganismos</i>	50
4.7.3	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	50
4.8	Toxicidade Hemolítica	51
4.9	Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	52
4.9.1	<i>Teste de toxicidade aguda</i>	52
4.9.2	<i>Análise bioquímica e hematológica</i>	52
4.9.3	<i>Genotoxicidade</i>	53
4.9.3.1	<i>Micronúcleo</i>	53
4.10	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	53
4.10.1	<i>Animais</i>	53
4.10.2	<i>Ensaio de edema de pata induzido por carragenina</i>	54
4.10.3	<i>Ensaio de peritonite</i>	54
4.10.4	<i>Ensaio de bolsão de ar</i>	54
4.11	Análise e estatística	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1	Caracterização fitoquímica do EHL-Ag1/5 e fases de <i>A. glaziovii</i>	56
5.1.2	<i>Screening fitoquímico</i>	56
5.1.3	<i>Caracterização cromatográfica dos extratos hidroetanólico de A. glaziovii</i>	57
5.1.4	<i>Identificação do composto 1 do EHL-Ag1/5</i>	66
5.2	Atividade Antimicrobiana	76
5.3	Toxicidade em hemácias	79
5.4.1	<i>Análise Bioquímica e Hematológica</i>	81

5.4.2	<i>Genotoxicidade</i>	83
5.4.2.1	Micronúcleo.....	83
5.4.3	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	84
5.4.3.1	Edema de pata induzido por carragenina	85
5.4.3.2	Ensaio de Peritonite.....	86
5.4.3.3	Ensaio de Bolsão de ar	87
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXO A- ARTIGO 1	99

1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam grande importância terapêutica com potencial de uso atual ou futuro para a humanidade. A denominação de plantas medicinais é relacionada a vegetais que possuem algum efeito terapêutico, que possa ser proveitosa para o estado de bem-estar físico, mental e social do homem (Moudgil and Venkatesha, 2023). De modo geral, a pesquisa de novos compostos com potencial terapêutico é bastante discutida e visada no âmbito dos produtos naturais, visto que algumas famílias botânicas são relevantes para o tratamento de diversas enfermidades.

Nas terras brasileiras, as plantas representantes da família Cucurbitaceae, conhecidas popularmente como a família das abóboras, em sua maioria, são plantas herbáceas ou lenhosas, raramente arbustivas, dentre as quais, muitas possuem gavinhas (Lima, 2010). São cultivadas para as mais diversas utilidades além da alimentação, por exemplo, em alguns lugares da Índia e Bangladesh algumas tribos usam espécies da família Cucurbitaceae para tratamento empírico da diabetes, edema, problemas no trato gastrointestinal, eventos cardiovasculares e outros (Rahmatullah, et al., 2012).

Na alimentação seus frutos possuem diversos benefícios, como o elevado teor de carotenoides, propriedades antioxidantes e fibras (Yiblet, 2023). A família das cucurbitáceas também se destaca devido ao seu potencial econômico, visto que muitos representantes dessa família são cultivados, visando o crescimento de frutos e sementes, que são utilizados como fonte de alimento ou fins medicinais (Valduga, 2017). No Brasil, a produção e comercialização de produtos da família Cucurbitaceae concentra-se principalmente em espécies como, *Cucurbita pepo* (abóbora do campo), *Citrullus lanatus* (melancia) e *Cucumis melo* (melão almiscarado) (Mukherjee, et al., 2022).

Sendo a região Nordeste reconhecida como a principal área de produção dos produtos derivados da família Cucurbitaceae, no Brasil (Fonseca, et al., 2015). Essa região abriga diversos biomas, como Cerrado (Oeste da Bahia, Piauí e Leste do Maranhão), Mata Atlântica (Litoral Nordestino, até o Rio Grande do Norte), Floresta Amazônia (Oeste do Maranhão) e o maior deles a Caatinga (Bahia, Pernambuco e Paraíba) (Silva, Almeida e Lima, 2019). A Caatinga, em especial, é um dos biomas mais singulares. Com sua floresta semiárida, fundamental para manutenção dos ecossistemas locais e para a vida das pessoas que habitam essa região.

Algumas características dos vegetais são fundamentais para manutenção do equilíbrio ecológico local, especialmente devido à escassez hídrica da região da Caatinga (Brasil, 2024).

Isso leva os vegetais a desenvolverem adaptações específicas, como o acúmulo de seiva nos caules e rizomas de algumas espécies, como ocorre no gênero *Apodanthera* (Shyaula; Manandhar, 2021). O gênero *Apodanthera*, apesar de pouco relatado na literatura, revelou a presença de metabólitos como caiaponosídeos, cabenosídeos e cucurbitacinas, que são triterpenos altamente oxigenados, que podem ser encontrados livres ou glicosilados.

Essas substâncias apresentam diversas propriedades terapêuticas, incluindo potencial no tratamento anticâncer, imunorreguladora e anti-inflamatória (Li, et al., 2023). Essas descobertas biológicas contribuem para a busca de novas opções terapêuticas, promovendo a preservação da biodiversidade e a sustentabilidade de espécies com potencial medicinal. Além disso, impulsionam o avanço científico em busca de alternativas terapêuticas, como novos anti-inflamatórios (Noronha, et al., 2021). Embora amplamente utilizados para tratar os sintomas da inflamação, os anti-inflamatórios convencionais apresentam problemas que justificam a necessidade de explorar produtos naturais, na busca por compostos terapêuticos ainda desconhecidos. O gênero *Apodanthera* destaca-se com a pesquisa envolvendo *A. congestiflora*, cujo extrato hidroetanólico dos caules demonstrou uma redução significativa do edema de pata, atribuída à diminuição das células pró-inflamatórias (Silvestre, et al., 2021)

Dentre às espécies da família Cucurbitaceae pode-se evidenciar *Apodanthera glaziovii*, espécie endêmica do Brasil, encontrada prevalentemente nas regiões da Caatinga ou de Carrasco dos estados da Bahia e de Pernambuco. Trata-se de uma planta trepadeira monóica com uma notável capacidade de sobreviver à baixa disponibilidade de água (Lima, 2010). Neste contexto, a espécie *Apodanthera glaziovii* assim como o gênero sofre com a escassez de pesquisas voltadas para estudos fitoquímicos e farmacológicos, apresentando apenas um estudo que avalia a capacidade de reversão dos efeitos tóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* da *A. glaziovii* e da *A. villosa*. Salientando a importância de maior embasamento investigativo da comunidade científica para avaliação de seu potencial terapêutico (Vilar; Carvalho; Furtado, 2007).

Uma vez que a química de produtos naturais representa uma alternativa de sucesso, e historicamente privilegiada, para a síntese e produção de novos fármacos (Matos, 2009). Especialmente em um cenário no qual a bioeconomia é cada vez mais recorrente e a riqueza biológica é uma fonte potencial para a criação de novos bioprodutos. Assim, diante do cenário em que muitas espécies vegetais, como a *A. glaziovii*, carecem de estudos sobre seus metabólitos potencialmente terapêuticos, este estudo tem como objetivo principal realizar uma prospecção fitoquímica, toxicológica e farmacológica de *A. glaziovii*. A fim de avaliar sua segurança, potencial terapêutico e os metabólitos responsáveis por tais ações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar uma prospecção fitoquímica, toxicológica e farmacológica de *Apodanthera glaziovii*, a fim de conhecer seus constituintes químicos e avaliar o seu potencial terapêutico.

2.2 Objetivos específico

Esta pesquisa teve os seguintes objetivos específicos atendidos:

- a) obter o Extrato Hidroetanólico Liofilizado (EHL) dos caules de *Apodanthera glaziovii*;
- b) fracionar o EHL por meio de uma partição líquido:líquido;
- c) realizar um screening fitoquímico do EHL e das fases por meio de uma triagem qualitativa dos metabólitos secundários, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, catequinas, açúcares redutores e polissacarídeos;
- d) realizar análise quantitativa dos metabólitos secundários, polifenóis totais, flavonoides, taninos;
- e) caracterizar cromatograficamente o extrato de *A. glaziovii*;
- f) efetuar o isolamento de compostos químicos da fase DCM através de técnicas cromatográficas;
- g) identificar as estruturas das moléculas isoladas por meio de análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais;
- h) avaliar a atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do EHL e das fases particionadas;
- i) estimar a toxicidade do EHL e fases em eritrócitos humanos e genotoxicidade *in vivo*;
- j) realizar ensaios de toxicidade aguda *in vivo*;
- k) investigar o potencial anti-inflamatório do EHL *in vivo* seguindo o modelo de edema de pata induzido por carragenina, peritonite e bolsão de ar induzidos por carragenina.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Família Cucurbitaceae

Devido a sua ampla distribuição mundial, a família Cucurbitaceae A.Juss. é bastante conhecida por produtos alimentícios, como melancia (*Citrullus lanatus*), abóboras (*Cucurbita* sp.) e melão (*Cucumis melo* L.). Tal fato que lhe confere um alto poder econômico, uma vez que seus frutos e sementes são altamente comercializados. A família Cucurbitaceae apresenta, aproximadamente, 125 gêneros e 960 espécies distribuídas em todas as regiões do mundo, em especial no Sudeste da Ásia e na África do Sul (Mukherjee, et al., 2022). No Brasil, além de bem distribuída, são reportados 26 gêneros e 160 espécies (Gomes-Klein, et al., 2024).

Assim, essa distribuição está atrelada as suas características botânicas, que compreende plantas monoicas, dioicas, herbáceas e dispostas de gavinhas, estruturas semelhantes a ‘elásticos’ que lhes conferem uma característica trepadeira, que se agarram a outras estruturas fixas como galhos e cercas, de forma a possibilitar a aderência das plantas, fato que evidencia a característica trepadeira da espécie em questão (Gonçalves, 2019). Possui como particularidade da família a ocorrência de dente foliar do tipo cucurbitóide, e fruto geralmente bacoide ou peponídeo, que são frutos com casca resistente, interior suculento e carnoso, com sementes embutidas na polpa. (Lima, 2010).

Como característica física as cucurbitáceas são sensíveis a temperaturas de congelamento, embora algumas espécies sejam mais resistentes devido a presença de tubérculos subterrâneos (Lima, 2010). No entanto, tais diferenças entre as espécies ficaram mais bem permitidas na divisão em tribos, intrafamiliar. Belgrano e Pozner (2017) relataram que a família Cucurbitaceae apresentava-se com uma divisão em duas subfamílias, a Nhandioboideae e a Cucurbitóideae, devido à presença de características morfológicas distintas. No caso do gênero *Apodanthera*, expressava-se na subfamília Cucurbitóideae pertencente a tribo Coniandreae.

Essa família já se demonstrou economicamente importante, devido a comercialização de seus produtos. No entanto, também tem despertado interesse acadêmico devido à presença de compostos bioativos, como as cucurbitacinas, encontradas em espécies como *Citrullus lanatus* (melancia), *Cucumis sativus* (pepino) e o melão (*Cucumis melo* L.) (Palmitessa, et al., 2023; Qing, et al., 2022; Zamuz, et al., 2021). Dentre as atividades terapêuticas relatadas para essa família, as cucurbitáceas apresentam importante atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e, principalmente, antitumoral (Machado; Costa, 2019).

Como mencionado, a família Cucurbitaceae é valiosa por seu conteúdo de metabólitos secundários. No México o uso de algumas espécies da família Cucurbitaceae ocorre tradicionalmente como agente de lavanderia e de controle de algumas pragas, além de sua utilização terapêutica na forma de infusão para o tratamento de diferentes tipos de dermatites e dor de estômago (Morales-Vela; Pérez-Sánchez; Padrón, 2019). No caso das dermatites, já se sabe que a cucurbitacina B possui potencial inibitório sobre a inflamação dos queratinócitos. É possível que essa saponina esteja presente em espécies comumente utilizadas no México (Li, et al., 2015).

Assim como já relatado, algumas espécies dessa família, como *Momordica charantia* L. (melão-de-São-Caetano), possuem propriedades terapêuticas bem elucidadas. Entre essas propriedades, destacam-se atividades antidiabética e laxativa. Essas atividades podem ser justificadas pelos fitoquímicos descritos na literatura para a família Cucurbitaceae, especialmente pela presença das cucurbitacinas, triterpenos altamente oxigenados que podem ser encontrados na forma livre ou glicosilados (Santos, 2018). *M. charantia* também apresenta atividade hipoglicemiante.

Alguns estudos avaliaram a estimulação da secreção de insulina *in vitro* com as substâncias isoladas de cinco triterpenoides da *M. charantia*, associando, assim, os efeitos farmacológicos promovidos por esta espécie aos glicosídeos triterpênicos (saponinas) dos frutos e sementes da mesma (Hussain, et al., 2022; Santos, 2018). Além desse potencial estudado, *M. charantia* tem suas folhas maceradas para o uso popular no tratamento de inflamações externas (Çiçek, 2022).

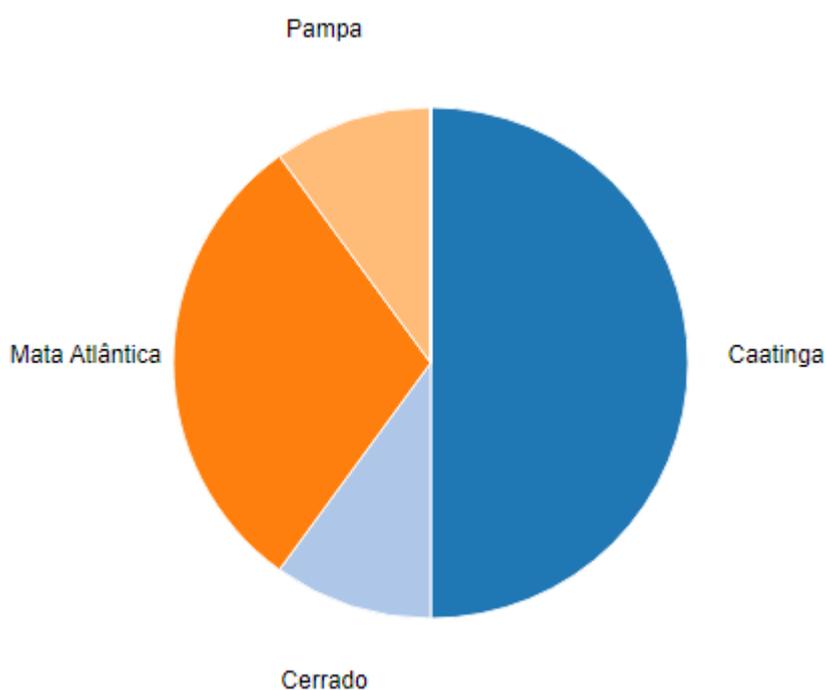
Outra espécie desta família é *Gynostemma pentaphyllum*, que foi avaliada na medicina chinesa com potente atividade homeostática da pressão arterial, boa reguladora dos níveis de colesterol e fortalecedora do sistema imunológico. Após os estudos, verificou-se em suas partes aéreas saponinas do tipo ocotilona e gypenosídeo, sendo este último o responsável por sua ação hipoglicemiante, comprovada nos testes *in vivo* e *in vitro* (Ji; Shen; Guo, 2018).

A família Cucurbitaceae apresenta uma forte característica terapêutica que precisa ser melhor abordada e justificada, sendo insuficiente a quantidade de pesquisas relacionadas à composição química de espécies desta família. Fato esse que chama a atenção da área acadêmica para seu emprego na clínica, onde poderia além de fornecer valor científico e cultural, em benefício do seu uso popular, propiciar pesquisas de novos medicamentos.

3.2 Gênero *Apodanthera* Arn.

O gênero *Apodanthera* Arn. pertence à classe das Angiospermas e não é endêmico do Brasil, embora conte com dez espécies das quais nove são endêmicas do Brasil (Zappi, et al., 2015). Sua distribuição geográfica abrange áreas no Nordeste (Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte), Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina). Essas espécies vegetais têm preferência por habitats típicos do bioma da Caatinga e Mata Atlântica (Oeste da Bahia) (Figura 1), embora também possam ser encontradas em outros ecossistemas, como no Cerrado e Pampa (Gomes-Klein, et al., 2024).

Figura 1– Distribuição por biomas típicos do gênero *Apodanthera* no Brasil.



Fonte: Re flora., 2024.

As características botânicas dessas plantas incluem serem trepadeiras hemicriptófitas, o que significa que são vegetais que colocam parte do caule ou rizoma abaixo do solo em estações desfavoráveis para garantir sua sobrevivência e rebrota em condições mais favoráveis. Quanto à reprodução, podem ser dióicas, com órgãos reprodutivos separados, ou monóicas, com órgãos reprodutivos juntos. Seus caules podem ser delgados ou espessados, com variações em suculência, e ocasionalmente podem desenvolver um paquipódio. As folhas variam de simples a compostas, podendo ser inteiras ou profundamente pedato-palmatipartidas, e frequentemente

exibem gavinhas. As flores estaminadas podem estar agrupadas em fascículos nodais ou ocorrer de forma dispersa (Gomes-Klein, et al., 2024; Lima, 2010).

No Brasil, o gênero *Apodanthera* apresenta 6 espécies (*A. argentea*, *A. glaziovii*, *A. laciniosa*, *A. sagittifolia* var. *villosa* e *A. ulei*) que habitam diversos ambientes, desde formações florestais até áreas campestres. Ainda podendo ser categorizadas como *Pseudoapodanthera* (*A. congestiflora*, *A. hindii*, *A. pedisecta*, *A. succulenta*, *A. trifoliata* e *A. villosa*). De um modo geral, são espécies que apresentam adaptações relacionadas ao estresse hídrico, como armazenamento de água em paquipódios, e perda de folhas em época de estiagem, sendo todas restritas às formações de caatinga e campos rupestres do nordeste brasileiro (Lima, 2010).

Um estudo recente investigou as relações filogenéticas da família Cucurbitaceae e seus gêneros, revelando associações do gênero *Apodanthera* com outros gêneros. A espécie *Apodanthera sagittifolia* foi filogeneticamente relacionada às espécies *Psiguria triphylla*, *Guarania* sp, *Wilbrandia Hibiscoides* e *Wilbrandia verticillata*. Além disso, a espécie *Apodanthera aspera* apresentou relações com o gênero *Ibervillea* (Chomicki; Schaefer; Renner, 2020; Guo, et al., 2020). Vale ressaltar que o gênero *Wilbrandia*, especificamente na espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn, teve algumas cucurbitacinas isoladas de seus componentes fitoquímicos, demonstrando atividades semelhantes às observadas na espécie *Apodanthera congestiflora* (Krepsky, 2003; Videres, 2017).

Também pertencente à família Cucurbitaceae, *Apodanthera congestiflora* Cogn., conhecida como "cabeça de nego," é utilizada na medicina popular, principalmente suas cascas, na forma de lambedor, para tratar dores em geral, com relatos de efeito analgésico (Medeiros, et al., 2019). A espécie também é mencionada na medicina popular para o controle de dores, incluindo dores dentárias, e na medicina veterinária, onde o tubérculo é utilizado na profilaxia e tratamento da doença de Newcastle em aves (Lobo, et al., 2020). Além disso, *A. congestiflora* é referida como depurativa do sangue, e banhos com a planta eram utilizados para tratar manchas de pele (Roque; Rocha; Loiola, 2010). A análise de sua composição química revelou a presença de cabenosídeos, caiaponosídeos e cucurbitacinas, compostos com potencial anti-inflamatório (Silvestre, et al., 2021).

Embora haja uma escassez de estudos sobre as espécies deste gênero, propriedades farmacológicas têm sido descritas em algumas delas, como *A. congestiflora*, *A. villosa* e *A. smilacifolia*. Videres (2017) investigou três tipos de extratos das raízes de *A. congestiflora* hexânico, acetato de etila e metanólico, e identificou em todos os extratos a presença de terpenos e ausência de taninos e flavonoides. Somente no extrato hexânico foram encontradas cumarinas e antraquinonas, além de alcaloides no extrato com acetato de etila. Em termos de

potencial terapêutico, o extrato hexânico demonstrou ser o mais promissor na redução da viabilidade das células cancerígenas, embora os outros extratos também tenham exibido potencial antimicrobiano e antioxidante.

Recentemente, *A. congestiflora* demonstrou potencial anti-inflamatório em um estudo específico, onde o extrato hidroetanólico dos caules exibiu uma redução significativa do edema (66,6%) no teste de edema de pata, alcançando sua eficácia máxima na dose de 7,5 mg/kg. Adicionalmente, apresentou baixa toxicidade hemolítica e toxicidade moderada em estudo *in vivo* (Silvestre, et al., 2021). Para outra espécie do gênero, os extratos aquoso e metanólico das cascas de *A. smilacifolia* revelaram a presença de alcaloides, flavonoides e saponinas. Embora não tenham demonstrado atividade antimicrobiana, esses extratos exibiram baixa toxicidade em ensaio com *Artemia salina*, com uma DL_{50} de $8.012 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (Ferreira, et al., 2018).

3.3 Apodanthera glaziovii Cogn.

Apodanthera glaziovii é uma espécie endêmica do Brasil, ocorrendo nas regiões da Caatinga ou de carrasco dos estados da Bahia e de Pernambuco (Figura 2). No estudo descrito por Lima (2010), esta espécie possui como sinonímia o nome de *Acacia lasiocalyx*, uma espécie endêmica do Peru.

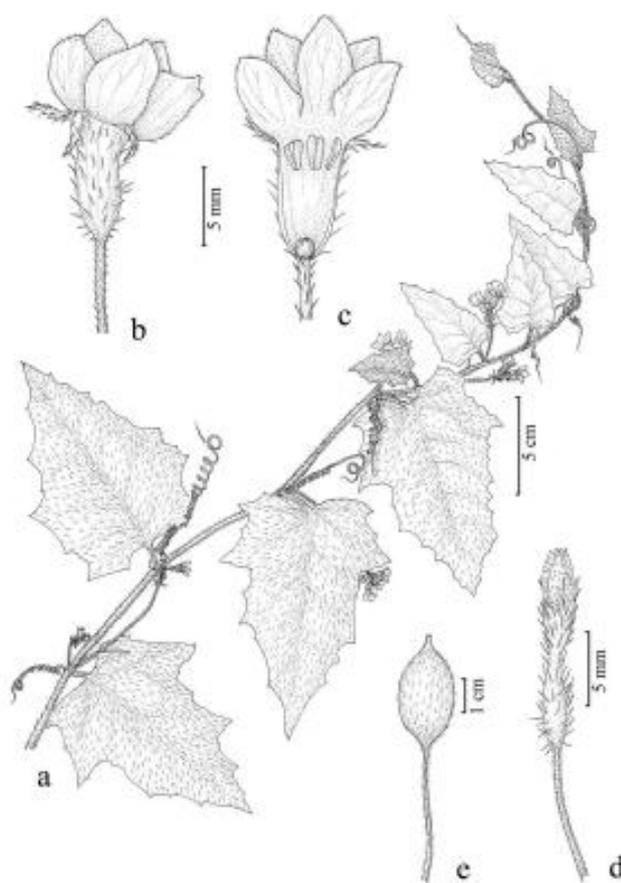
Figura 2 – Distribuição geográfica de duas espécies do gênero *Apodanthera*, em vermelho *Apodanthera glaziovii* e em azul *Apodanthera hindii*.



Fonte: Lima (2010).

Esta espécie caracteriza-se botânica e morfológicamente como uma planta trepadeira monóica, de caule delgado, sulcado e piloso, com folhas de caráter pecíolo delgado e pubescente com lâmina foliar ovalada a ovalado-oblonga, podendo ainda ser 3-lobadas, de margens inteiras ou denteadas. Ainda no estudo taxonômico de Lima (2010), suas gavinhas são descritas como simples, delgadas e esparsamente pilosas, sendo possível observar na Figura 3.

Figura 3 – *Apodanthera glaziovii* Cogn. a. Ramos com flores; b. flor estaminada; c. flor estaminada dissecada; d. flor pistilada; e. fruto.



Fonte: Lima (2010).

A falta de resultados científicos sobre a espécie prejudica a avaliação de novas substâncias com potencial terapêutico relevante. Um estudo foi conduzido para avaliar a capacidade de reversão dos efeitos tóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* usando extratos aquosos provenientes dos tubérculos de *A. villosa* e *A. glaziovii* em modelos *in vivo*. No entanto, apenas o extrato de *A. villosa* demonstrou um efeito retardador na mortalidade desses animais (Vilar; Carvalho; Furtado, 2007).

3.4 Metabólitos Secundários

As plantas são uma fonte de recursos terapêuticos com grande versatilidade. Elas produzem metabólitos secundários, com a função primordial de proteção para elas mesmas, embora possuam valor nutricional e farmacológico agregado de suma importância para o organismo humano, além de outras funcionalidades como aditivos aromáticos e corantes (Borges; Amorim, 2020). Os fitoconstituintes de um vegetal oferecem benefícios que vão além dos micronutrientes e macronutrientes.

Esses componentes são produtos não nutritivos, porém apresentam propriedades terapêuticas relevantes. Por exemplo, a curcumina presente no açafrão (*Curcuma Longa*) demonstra potencial anti-inflamatório. A morfina, extraída da flor da papoula (*Papaver rhoeas*), possui propriedades analgésicas. O paclitaxel, obtido da casca de *Taxus brevifolia*, exibe atividade antineoplásica. Além disso, a digitoxina, uma saponina derivada das plantas *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*, apresenta potencial antiarrítmico e cardiotônico (Alamgir, 2018; Čermák, *et al.*, 2020; Rana; Singh; Bisht, 2022).

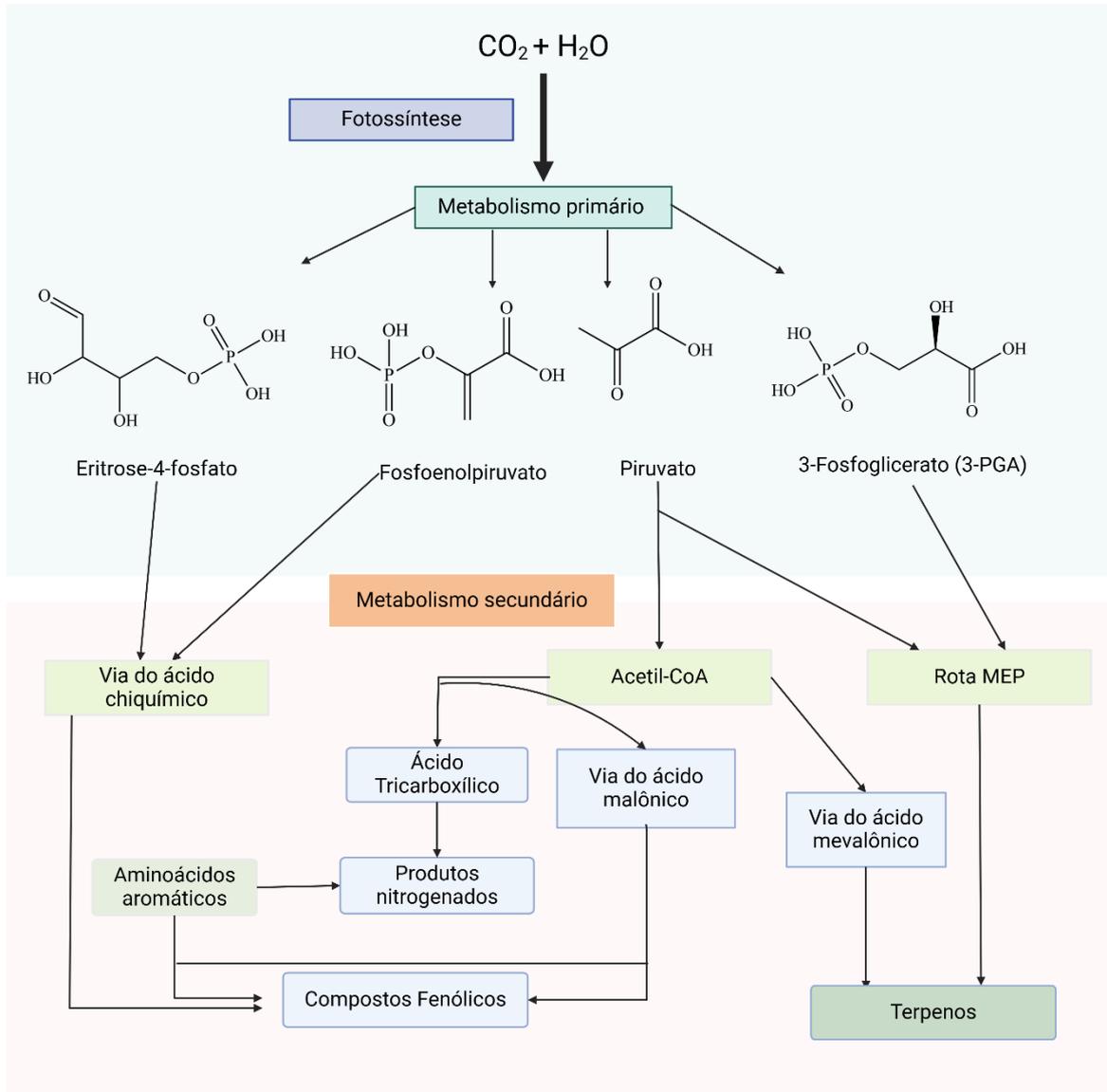
Entretanto, os fitonutrientes são componentes nutricionais presentes em vegetais comestíveis, tais como vitaminas e minerais, que também apresentam potencial terapêutico, como a vitamina C (ácido ascórbico), que é categorizada como fitonutriente. Além disso, essas categorias podem ser identificadas como metabólitos, os quais são produzidos para o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Estes incluem açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA. Trata-se de compostos gerados para atender às necessidades energéticas celulares, sendo assim denominados como metabólitos do metabolismo primário (Alamgir, 2018; Pereira; Cardoso, 2012)

Os metabólitos secundários ou como descrito por Borges e Amorim (2020) os metabólitos especializados, encontrados em pequenas concentrações (quando comparadas aos metabólitos primários), por sua vez, são mais complexos e específicos, realizando assim, um papel importante na evolução e interação das espécies. Suas estruturas estão relacionadas a proteção das plantas, de modo a favorecer a sua atividade em meio biológico, podendo surgir em determinados grupos de vegetais, já que os mesmos podem apresentar necessidades metabólicas diferentes.

A origem biossintética da maioria dos metabólitos correspondem ao ciclo de Krebs ou pela via do chiquimato, usada para formação dos metabólitos secundários. Basicamente o metabolismo secundário corresponde aos compostos orgânicos que são formados a partir do metabolismo primário. Esses compostos complexos e específicos podem ser divididos em

classes por sua origem metabólica, estrutura química e função, sendo divididos em compostos nitrogenados, os fenólicos e os terpenos (Figura 4) (Alamgir, 2018; Borges; Amorim, 2020).

Figura 4 – Esquema resumido da rota biossintética dos componentes do metabolismo primário e secundário.



Legenda: Rota MEP (Metileritritol Fosfato).

Fonte: Alamgir, 2018; adaptado.

O metabolismo primário e secundário é intrinsecamente interligado e fundamental para o crescimento e sobrevivência dos vegetais. Em resumo, o metabolismo primário abrange as vias metabólicas essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Por outro lado, o metabolismo secundário envolve a síntese de vários compostos especializados para garantir a sobrevivência do vegetal, que desempenham papel importante na fisiologia humana (Borges;

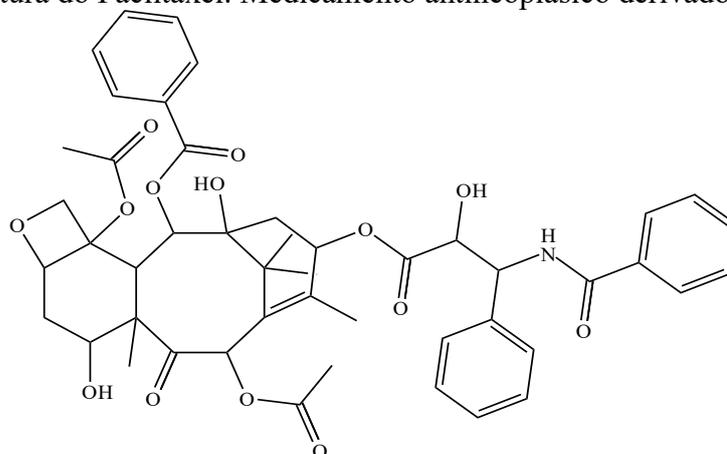
Amorim, 2020). A busca por compreender e buscar novas opções terapêuticas desses metabólitos especializados é fundamental para pesquisa de novos fármacos, garantindo *insights* valiosos para a agricultura, medicina e conservação da biodiversidade vegetal.

Historicamente, os resultados de medicamentos com potencial terapêutico ou que serviram de precursor para o desenvolvimento de novos fármacos têm sido promissores. Cada classe de metabólitos contribuiu significativamente para o avanço científico, incluindo os terpenos. Embora comumente utilizados como aromatizantes devido ao seu odor característico, os terpenos são frequentemente comercializados como óleos essenciais, como é o caso do eucalipto, lavanda, menta, entre outros (Dewick, 2008). Além disso, os terpenos têm aplicações como biopesticidas e se destacam na indústria farmacêutica, sendo o paclitaxel um dos exemplos mais notáveis de antineoplásicos derivados de terpenos (Alamgir, 2018).

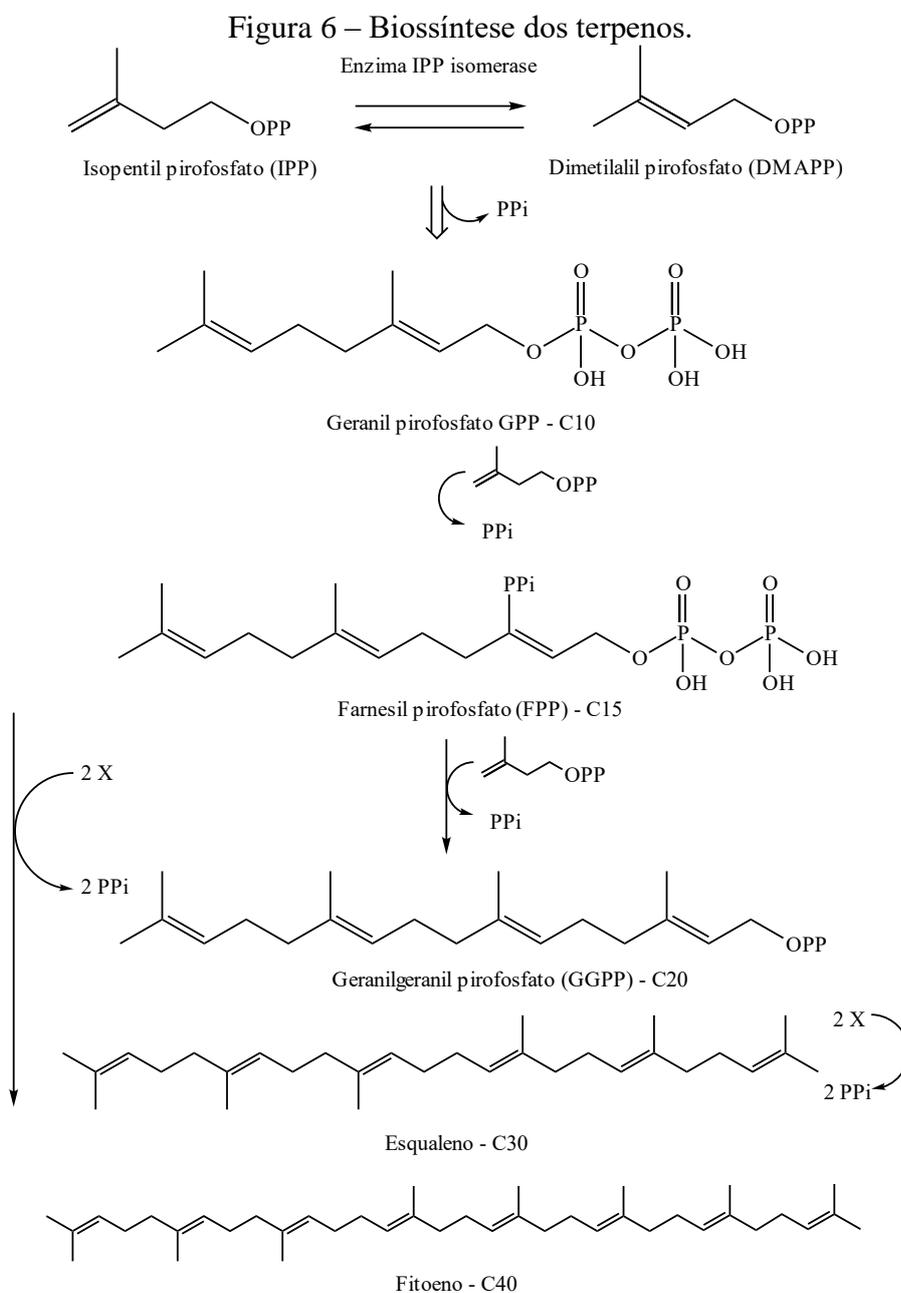
3.4.1 Terpenos

Os terpenos constituem um grupo diversificado de compostos presentes em plantas, fungos e outros organismos vivos (Alamgir, 2018). Essas estruturas desempenham papéis significativos na cosmetologia e aromaterapia, dada a predominância de terpenos na composição química dos óleos essenciais, recentemente seu principal uso vem atrelado aos pesticidas (Ninkuu, et al., 2021). Além disso, destaca-se o seu emprego na medicina tradicional como agentes terapêuticos, exemplificado pelo paclitaxel (Figura 5), um antineoplásico derivado de um diterpeno extraído da espécie *Taxus brevifolia* (Ninkuu, et al., 2021).

Figura 5 – Estrutura do Paclitaxel. Medicamento antineoplásico derivado de um diterpeno.



isomerase converte o isopentil pirofosfato (IPP) em seu isômero. Segue uma cascata de reação após a formação de um monoterpene, o geranyl pirofosfato, que sofre hidrólise e origina o geraniol, este passa por uma condensação e origina o farnesil pirofosfato. Outra sequência de condensação e adição de outra molécula de isopentil pirofosfato (IPP) leva a formação do esqualeno (Figura 6), o principal precursor dos óxido de esqualeno que possui o oxigênio no C-3 convertidos em vários metabólitos, como esteróis e saponinas (Dewick, 2008).



Fonte: autoria própria.

A classificação dos terpenos é baseada no número de carbonos em suas estruturas, consistindo predominantemente em hidrocarbonetos. No entanto, alguns terpenos podem conter

grupos funcionais, principalmente compostos de oxigênio, sendo então referidos como isoprenoides ou terpenoides. Terpenos com cinco átomos de carbono são denominados hemiterpenos, enquanto aqueles que possuem grupos funcionais correspondentes são chamados de hemiterpenoides. Terpenos com dez átomos de carbono são classificados como monoterpenos ou monoterpenoides, enquanto os que têm 15 átomos de carbono são designados como sesquiterpenos, a Tabela 1 apresenta a descrição de todos eles (Alamgir, 2018; Dewick, 2008).

Tabela 1 – Classificação dos terpenos.

Unidades de Carbono	Fórmula	Nome	Exemplo
5	C_5H_8	Hemiterpeno	Ácido isovalérico
10	$C_{10}H_{16}$	Monoterpeno	Geraniol
15	$C_{15}H_{24}$	Sesquiterpeno	Artemisinina
20	$C_{20}H_{32}$	Diterpeno	Taxol
25	$C_{25}H_{40}$	Sesterpeno	Manoalide
30	$C_{30}H_{48}$	Triterpeno	Esqualeno
40	$C_{40}H_{64}$	Tetraterpeno	β -caroteno
> 40	$(C_5H_8)_n$	Politerpenos	Borracha natural

Fonte: (Mabou; Yossa, 2021; adaptado).

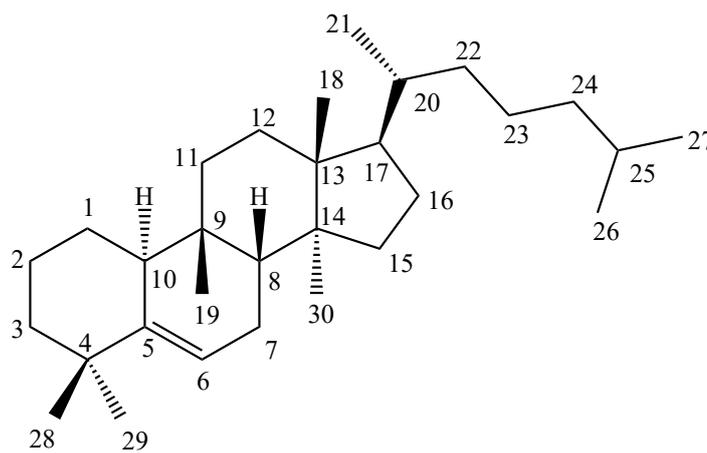
Os terpenos apresentam importante papel na biossíntese de alguns compostos, como as saponinas. A glicosilação na estrutura dos terpenos o converte para esta outra classe, denominada de saponinas. Estas são derivadas dos triterpenoides que podem ser modificados através de reações enzimáticas subsequentes, resultando em uma variedade de estruturas de saponinas. Esses metabólitos secundários desempenham papéis importantes na defesa contra herbívoros, interações planta-microrganismo e até mesmo na atração de polinizadores, demonstrando a complexidade e a versatilidade dos terpenos na biologia vegetal (Alamgir, 2018; Mabou; Yossa, 2021).

3.4.1.1 Triterpenos - Esqueleto cucurbitano

As cucurbitacinas, pertencentes à classe dos triterpenos, compartilham origem e propriedades químicas semelhantes. Ambas são triterpenoides, altamente oxigenados

encontrados em plantas, comumente nas espécies da família Cucurbitaceae. As cucurbitacinas representam metabólitos secundários amplamente distribuídos em espécies pertencentes à família Cucurbitaceae, e a literatura científica contém numerosos relatos sobre o isolamento e a elucidação estrutural desses compostos, bem como das saponinas, em várias espécies de cucurbitáceas. O esqueleto básico cucurbitano pode ser observado na Figura 7 (Kushiro T.; Ebizuka, 2010; Wijesekera; Dissanayake, 2022).

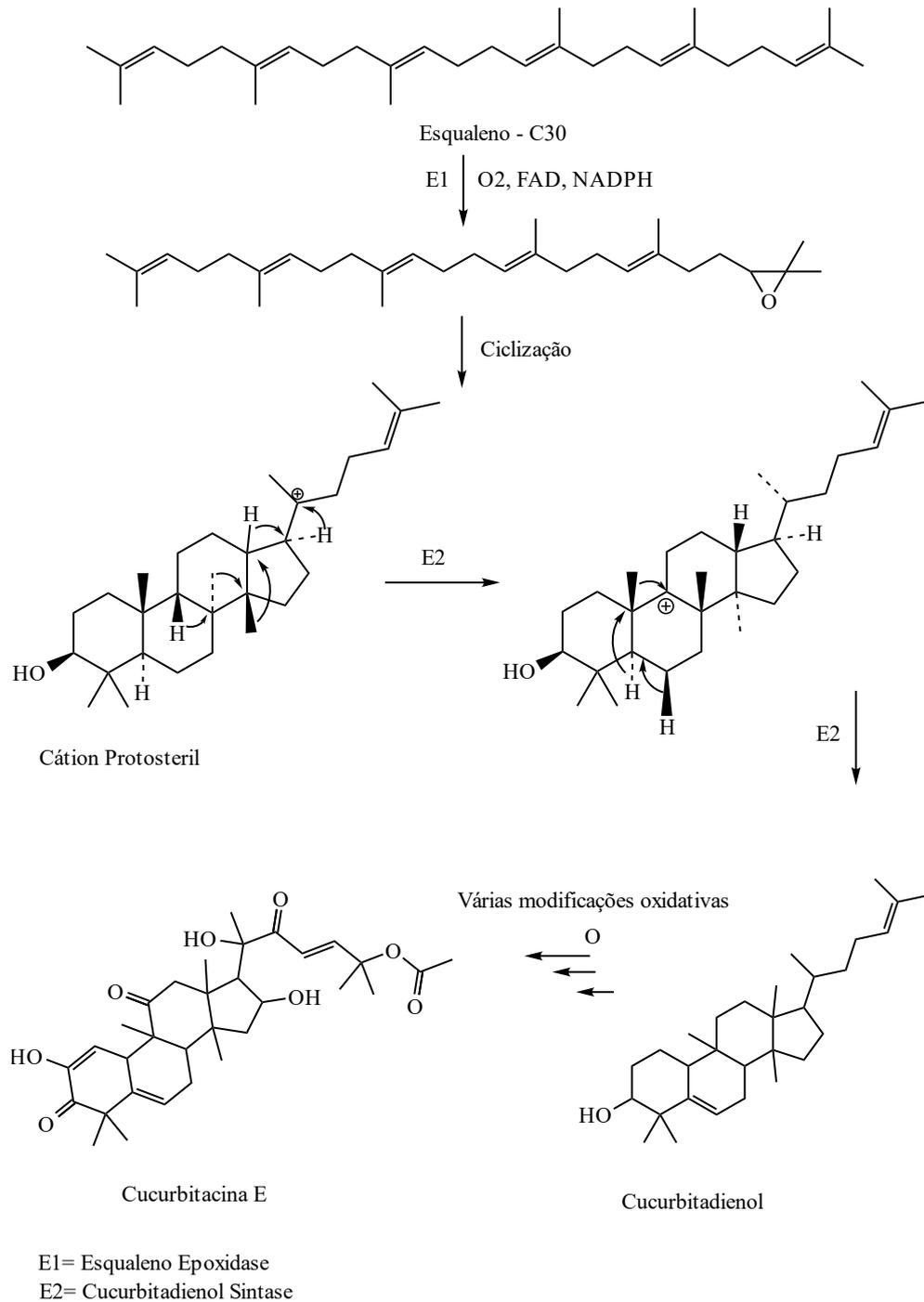
Figura 7– Estrutura do esqueleto cucurbitano.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A biossíntese das cucurbitacinas é continuada a partir da via do óxido de esqualeno (Figura 8) que em sua conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco favorece a formação do cátion protosteril, que em suas migrações forma uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6, ligação característica das estruturas de cucurbitacinas (Dewick, 2008). Reações subsequentes em sua estrutura favorece a formação do precursor das cucurbitacinas, o cucurbitadienol (Zhang, et al., 2022). Ainda, as cucurbitacinas podem apresentar algumas diferenças estruturais, quando ocorre a adição ou substituição de alguns grupos no esqueleto cucurbitano. Essas alterações podem influenciar na atividade terapêutica dessas cucurbitacinas. (Samuel, 2019).

Figura 8 – Biossíntese das cucurbitacinas.

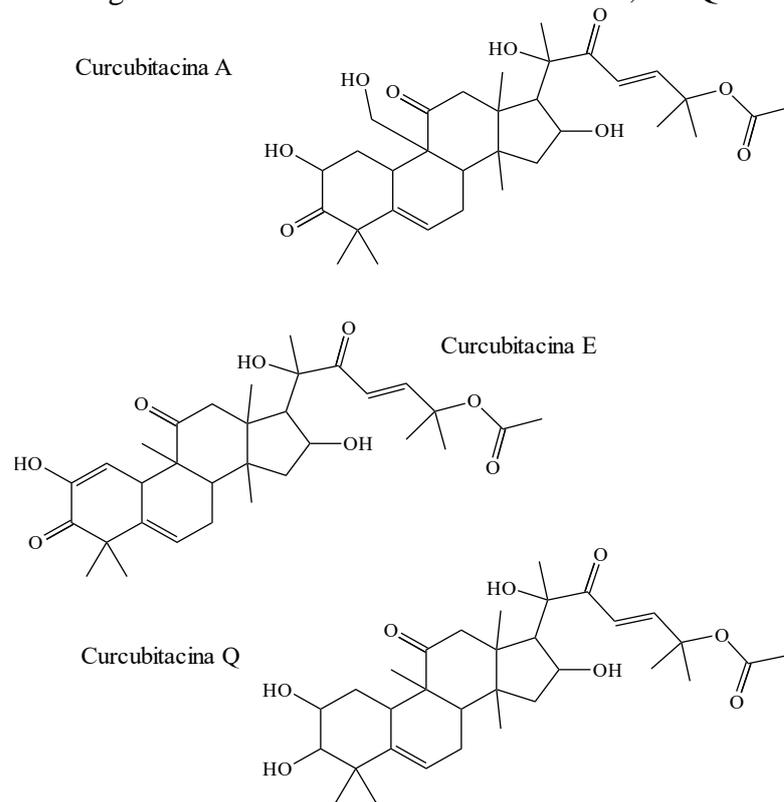


Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Conforme documentado por várias estruturas de cucurbitacinas presentes em espécies da família Cucurbitaceae, como A, E e Q (

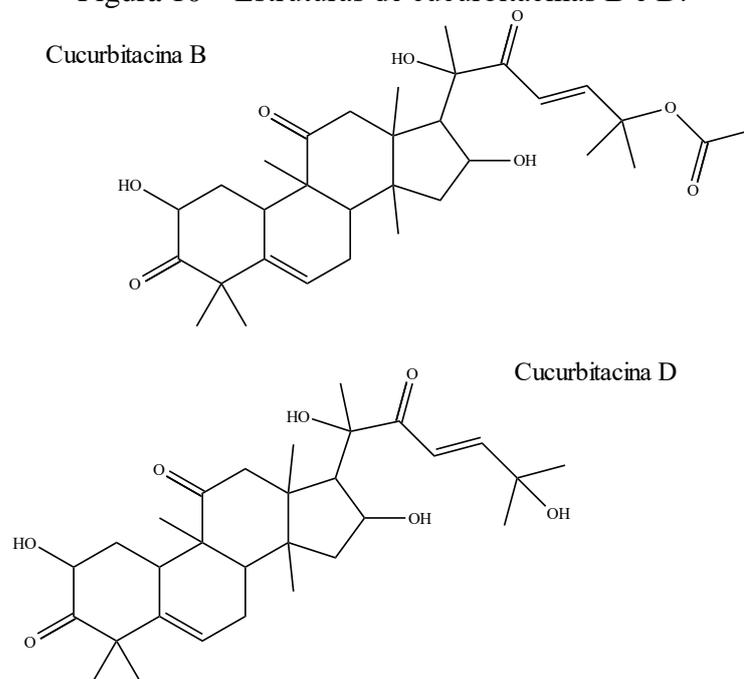
Figura 9) foram investigadas quanto à sua atividade contra linhagens celulares de câncer de pulmão, demonstrando efeitos significativos. Adicionalmente, a cucurbitacina D exibiu eficácia contra linhagens celulares de leucemia e linfoma, enquanto a cucurbitacina B demonstrou atividade contra a leucemia, além de mostrar citotoxicidade contra linhagens de câncer de mama.

Figura 9 – Estruturas das cucurbitacinas A, E e Q.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 10 – Estruturas de cucurbitacinas B e D.



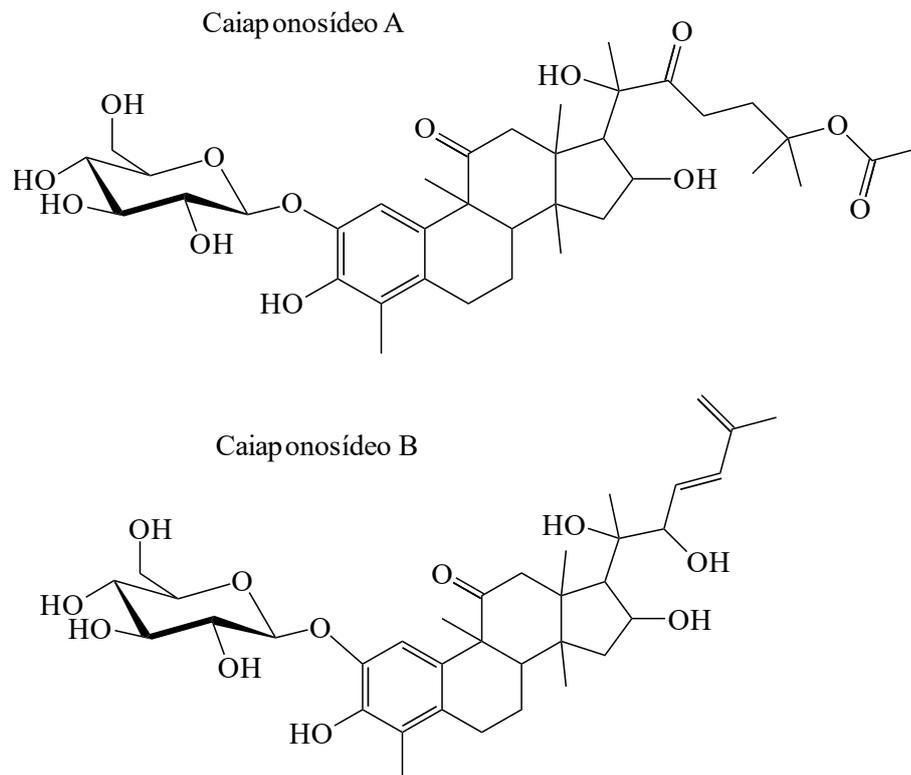
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Algumas estruturas de cucurbitacinas foram isoladas com unidades osídicas. Originárias dos triterpenoides, as saponinas são caracterizadas pela presença de um ou mais monossacarídeos unidos por uma ligação glicosídica de um átomo de oxigênio, geralmente ligado ao carbono-3 da aglicona triterpenica. Como resultado, as saponinas são estruturas de alto peso molecular e alta polaridade (Alamgir, 2018; Dewick, 2008; Wijesekera; Dissanayake, 2022). As saponinas podem ser classificadas quanto ao núcleo fundamental (porção aglicona) que pode apresentar caráter ácido, básico ou neutro. A presença de ácido carboxílico na aglicona ou na cadeia de açúcar (glicona) confere uma caráter ácido a essa saponina. Em contrapartida, presença de nitrogênio a torna com característica básica e podem ser denominadas de pseudoalcaloides (Alamgir, 2018; Wijesekera; Dissanayake, 2022).

As saponinas são reconhecidas por sua atividade saponificante, resultante de sua natureza anfifílica, o que, por sua vez, foi associado à sua toxicidade frequentemente. Essa teoria tem como base, que a característica anfifílica possibilita a interação das saponinas com as membranas plasmáticas, aumentando a permeabilidade e levando à lise dos eritrócitos (Wijesekera; Dissanayake, 2022). No entanto, é crucial destacar que nem todas as saponinas são prejudiciais, uma vez que sua toxicidade pode estar relacionada à estrutura química, a qual pode ser modificada para contornar essa situação. Por exemplo, algumas saponinas citotóxicas com potencial antitumoral não apresentam hemólise (Chen, et al., 2018). Outras exibem notável potencial terapêutico, como propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antitumorais (Silvestre; Lucena; Silva, 2022).

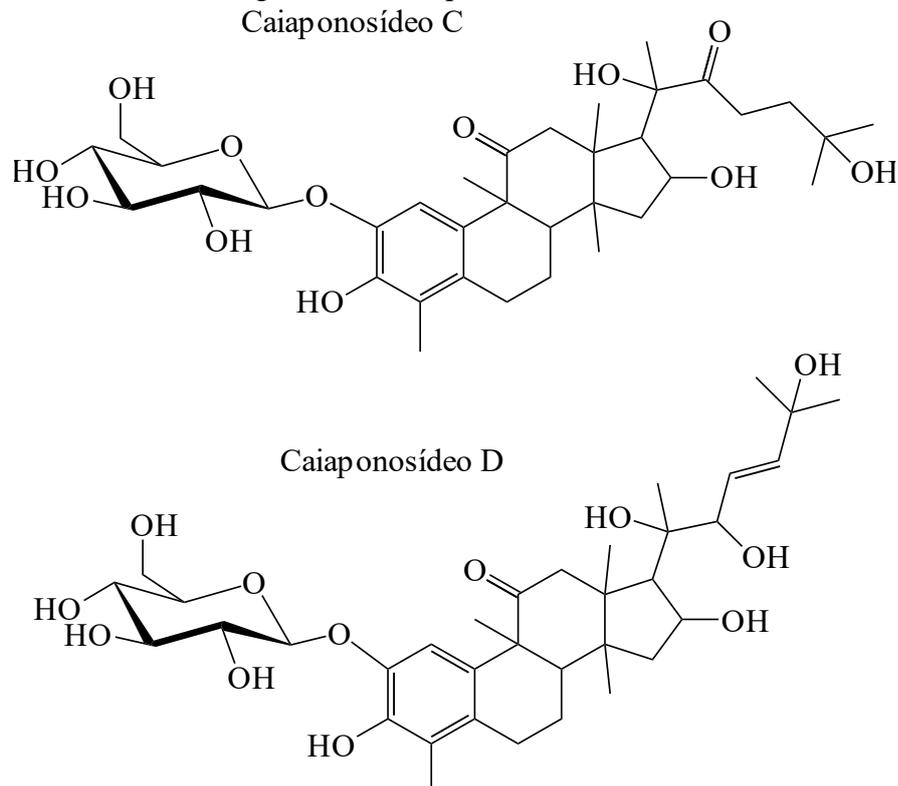
Essa estruturas de terpenos glicosilados presentes em espécies da família cucurbitaceae podem se apresentar ainda como caiaponósideo, uma classe de compostos químicos encontrados em diversas espécies de plantas da família das cucurbitáceas, como a *Cayaponia tayuya*. As raízes da espécie *Cayaponia tayuya* passaram por extração inicial com diclorometano, seguida por extração metanólica. O extrato metanólico foi submetido a cromatografia em coluna, resultando na obtenção de frações glicosídicas com diferentes polaridades. A fração considerada menos polar foi submetida a cromatografia em CLAE preparativo, onde foram isolados os compostos denominados caiaponosídeos A, B, C e D (Figura 11 e Figura 12) (Himeno, et al., 1992).

Figura 11 – Caiaponosídeos A e B.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

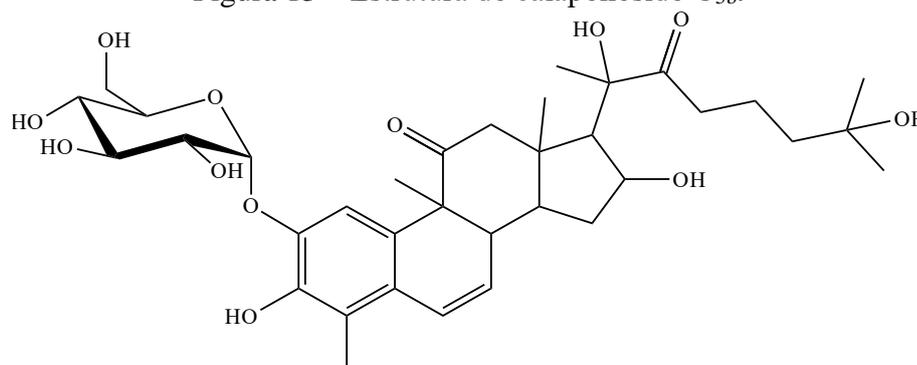
Figura 12 – Caiaponosídeos C e D.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Estruturas de caiaponosídeos também foram observadas em *Apodanthera*, espécie *Apodanthera congestiflora* mostrou a presença do composto caiaponosídeo C_{5b} (Figura 13) identificado por meio de análises espectroscópicas e espectrométricas, na fração diclorometano, obtido a partir do extrato etanólico dos caules (Silvestre, et al., 2021). A análise do gênero *Apodanthera* para presença de cucurbitacinas sugere que há necessidade de se investigar as espécies desse gênero. Devido à falta de pesquisas detalhadas sobre a concentração de compostos isolados neste grupo botânico

Figura 13 – Estrutura do caiaponosídeo C_{5b}.



Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, os caiaponosídeos foram reconhecidos como norcucurbitacinas, devido à sua estrutura química que corresponde ao esqueleto cucurbitano, com a diferença de que o anel A é aromatizado, resultando na perda do C-29. Himeno e colaboradores (1994) isolaram mais de 24 estruturas de caiaponosídeos ou norcucurbitacinas, incluindo o caiaponosídeo C_{5b}, identificado na fração diclorometano de *Apodanthera congestiflora*, conforme relatado por (Silvestre, et al., 2021).

O caiaponosídeo identificado na fração de diclorometano do estudo desenvolvido por Silvestre e colaboradores (2021) apresentou potencial anti-inflamatório pelo ensaio de edema de pata, reduzindo a inflamação de maneira contínua durante as 5 horas de observação. A mesma fração foi avaliada para atividade antitumoral e apresentou inibição do crescimento das células tumorais, com remissão total do tumor no sétimo dia de administração. Tais resultados e estudos como os citados leva a considerar a importância de testes com as plantas medicinais, sobretudo com o gênero *Apodanthera*, para terapêutica de enfermidades.

3.5 Processo inflamatório e terapia anti-inflamatória

O processo inflamatório é desencadeado em resposta a uma lesão tecidual ou exposição a um agente inflamatório, levando a uma cascata complexa de eventos. Esse processo envolve a ativação e recrutamento de diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, neutrófilos e células especializadas, bem como a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-1 β e IL-6). Essas células e mediadores são responsáveis por desencadear os sinais clássicos da inflamação, incluindo hiperemia, dor, neutrofilia e edema (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Fehrenbacher; Mccarson, 2021; Ribas et al., 2008).

Portanto, substâncias como a carragenina podem modular uma resposta inflamatória, recrutando essas células e promovendo a inflamação. Ensaio com drogas para avaliar o potencial anti-inflamatório utilizam comumente a carragenina, que aumenta os mediadores da inflamação uma hora após a exposição podendo haver picos em vários momentos depois disso (Fehrenbacher; Mccarson, 2021). O potencial anti-inflamatório de uma substância é determinado pela sua capacidade de reduzir o recrutamento de células pró-inflamatórias e o exsudato resultante da inflamação.

Os anti-inflamatórios são a primeira escolha no tratamento da dor, febre e controle da inflamação, e incluem tanto substâncias esteroidais quanto não esteroidais (AINEs) (Noronha, et al., 2021). Os AINEs são amplamente utilizados e podem ser classificados como seletivos ou não seletivos em relação à enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), que é fundamental no processo inflamatório. Os AINEs não seletivos, devido à sua inespecificidade, também afetam a COX-1, o que pode levar a efeitos adversos, como danos gastrointestinais, úlceras pépticas, enteropatia, além de aumentar o risco de complicações cardiovasculares e renais (Tai; Mcalindon, 2021). Portanto, o desenvolvimento de novos AINEs com maior eficácia e menor toxicidade é essencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Os anti-inflamatórios seletivos para a COX-2, conhecidos como coxibes, inibem especificamente a COX-2, reduzindo a produção de prostaglandinas inflamatórias e minimizando os efeitos adversos associados à inibição da COX-1. No entanto, apesar de apresentarem menos efeitos gastrointestinais, há preocupações em relação à segurança cardiovascular desses medicamentos (Minhas; Nidhaan; Husni, 2023). Já os anti-inflamatórios esteroidais, ou corticoides, apesar de sua eficácia anti-inflamatória, estão associados a efeitos colaterais como alterações na pressão arterial e edema corporal (Parreira; Silva; Rodrigues, 2021).

Considerando a atual demanda por medicamentos mais seguros, pesquisas alternativas têm sido conduzidas em busca de melhores opções terapêuticas. Produtos naturais, como plantas medicinais, são reconhecidos como fontes ricas de metabólitos bioativos capazes de modular vias inflamatórias de maneira única, proporcionando uma abordagem mais suave e sustentável para o controle da inflamação (Moudgil; Venkatesha, 2023). No entanto, apesar do potencial dos produtos naturais, muitos desses compostos bioativos permanecem desconhecidos devido à vasta cobertura vegetal ainda não explorada. Um exemplo, é a espécie *Apodanthera glaziovii*, que apresenta raros estudos relacionados ao seu potencial terapêutico e constituintes químicos. No entanto, já foi relatado para seu gênero uma potencial atividade anti-inflamatória e antitumoral (Silvestre, et al., 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação botânica

A espécie *A. glaziovii* empregada nesse trabalho foi coletada por Maria Lorena de Oliveira Andrade, Pós-Graduanda em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em 14 de janeiro de 2023 (período de seca), às 10:00 horas, no sítio Fazenda do Ouro (Latitude 8°22'02.2"S e longitude 36°24'39.5"W), município de Belo Jardim, área rural de Pernambuco (Figura 14).

Figura 14 – Localização da cidade de Belo Jardim-PE.



Fonte: Diário de Pernambuco, 2023, adaptado.

O material vegetal foi preparado para confecção da exsicata e enviado ao Herbário Manuel de Arruda Câmara (HACAM) da UEPB, para identificação botânica por Bernardo de Farias Rocha, onde encontra-se registrada sob o número 2554-HACAM. O acesso ao Patrimônio Genético (PG) foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número AF48253.

4.2 Processamento do material vegetal

A matéria-prima vegetal foi inspecionada para que não fossem utilizadas partes indevidas, ou muito ressecadas. Foram separados os caules dos tubérculos e raízes e o material foi levado a estufa. Os caules de *A. glaziovii* foram secos em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura máxima de 40 °C, por 7 dias. Posteriormente, os caules foram pulverizados em moinho de facas e acondicionados em pote de vidro hermeticamente fechado, identificado e armazenado em sala com temperatura ambiente amena (Figura 15). Foram processados 1,89 kg de material vegetal seco.

Figura 15 – A. Raízes e tubérculos separados do caule; B. Caule secando em estufa de circulação forçada de ar; C. Material vegetal final pulverizado e armazenado.



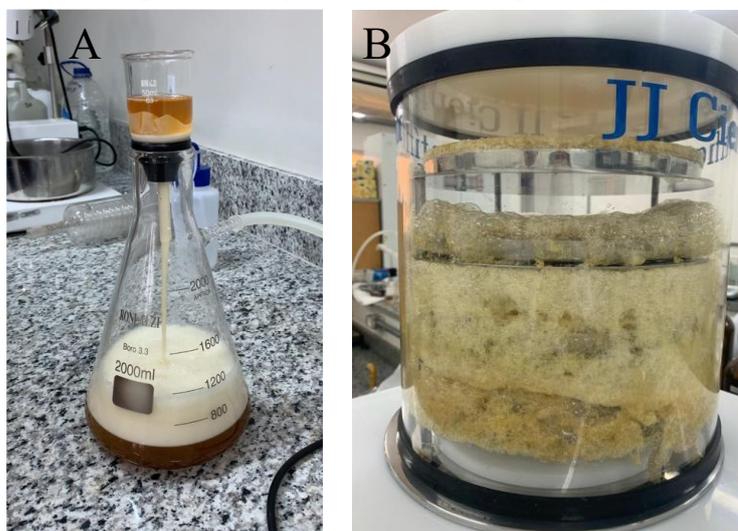
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.3 Obtenção dos extratos

O pó obtido foi pesado em aproximadamente 1,3 kg, armazenou os 500 g restante, e submetido ao processo de extração por maceração em etanol 70%, fornecendo o extrato hidroetanólico bruto (EHB). Foram realizadas extrações e troca do solvente extrator em intervalo de 72 horas por 3 semanas, no total foram realizadas 9 extrações. Posteriormente o material foi filtrado para retirada do sobrenadante em papel filtro e Funil de Buchner de porcelana com placa porosa (Figura 16A). O etanol a 70% foi retirado em evaporador rotativo

IKA (RV 3 eco) sob pressão reduzida com temperatura < 50 °C. A água residual foi eliminada em liofilizador JJ Científica (LJJ05) (Figura 16B) e os extratos secos foram mantidos sob refrigeração. O rendimento extrativo foi calculado e os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Figura 16 – A. Filtração bastante espumosa do EHB de *A. glaziovii*; B. Eliminação de água residual para formação do EHL, com presença de bastante espuma.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 2 – Rendimento extrativo do EHL de *A. glaziovii* obtidos por Maceração.

Espécie	Parte do vegetal	Droga vegetal (g)	Extrato obtido total (g)	Rendimento (%m/m)
<i>A. glaziovii</i>	Caule	1323,14 kg	241,23 g	18,23%

Fonte: autoria própria.

Durante o processo de filtração ao longo de vários dias, foi observada uma mudança na coloração do extrato, como evidenciado na análise cromatográfica apresentada na seção de resultados (Figura 26 a Figura 34) indicou perfis semelhantes entre as frações 1 a 5, o que justificou sua unificação para prosseguir com o processo de fracionamento do extrato, ao final foi obtido o Extrato Hidroetanólico Liofilizado de *Apodanthera glaziovii* das frações 1 a 5 (EHL-Ag 1/5) e as frações 6,7, 8 e 9 ficaram acondicionadas em geladeira.

Em resposta a isso, o filtrado foi cuidadosamente armazenado separadamente a cada dia, fornecendo 9 extratos, um para cada dia de filtração ao longo das 3 semanas, conforme mostrado na Figura 19. Esses extratos foram subsequentemente submetidos à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (método descrito no item 4.5.3) para investigar possíveis variações na polaridade das substâncias extraídas ao longo de um período de três semanas. A análise cromatográfica apresentada na seção de resultados (Figura 26 a

Figura 34) indicou perfis semelhantes entre as frações 1 a 5, o que justificou sua unificação para prosseguir com o processo de fracionamento do extrato, ao final foi obtido o Extrato Hidroetanólico Liofilizado de *Apodanthera glaziovii* das frações 1 a 5 (EHL-Ag 1/5) e as frações 6,7, 8 e 9 ficaram acondicionadas em geladeira.

Figura 17 – Extração 1 a 4 apresentando coloração avermelhada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 18 – Extração 8 e 9 apresentando coloração esverdeada, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 19 – Extratos liofilizados e armazenados separadamente. Extratos dos dias 1 a 5; e extratos dos dias 6 a 8, respectivamente.

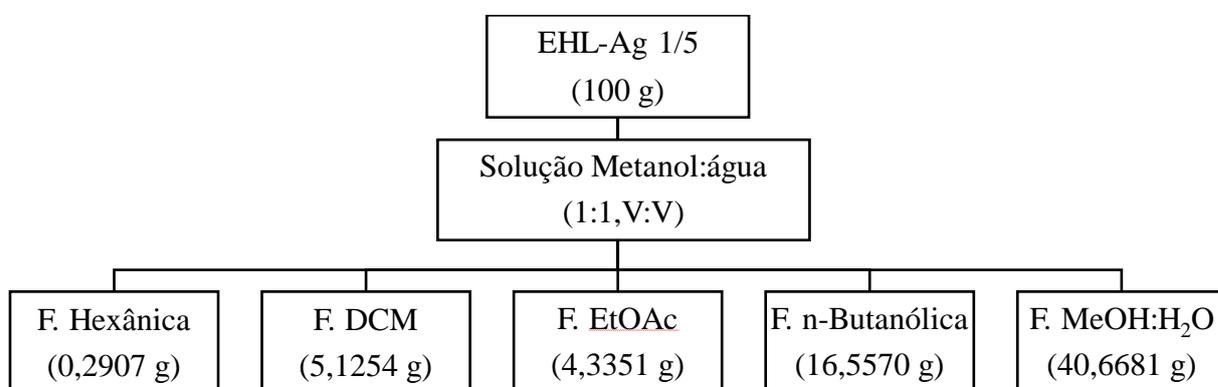


Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.4 Fracionamento do EHL-Ag 1/5

Para realizar o fracionamento do Extrato Hidroetanólico Liofilizado de *Apodanthera glaziovii* das frações 1 a 5 (EHL-Ag 1/5), foi adotado o método de partição líquido:líquido utilizando solventes de polaridades crescentes, incluindo n-hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e metanol/água. Inicialmente, 100 g do EHL-Ag 1/5 foram pesados e dissolvidos em uma solução de metanol:água (1:1, v/v) por meio de ultrassom, resultando em uma solução hidroalcolólica. Posteriormente, essa solução foi submetida à partição conforme descrito no protocolo experimental abaixo (Figura 20).

Figura 20 – Particionamento dos caules de *A. glaziovii*.



Legenda: (F.): Fase; (DCM): Diclorometano; (EtOAc): Acetato de etila; (MeOH:H₂O): Metanol:água.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

As fases foram coletadas separadamente e o solvente foi retirado em evaporador rotativo IKA (RV 3 eco) sob pressão reduzida com temperatura < 50 °C. Para a fração metanol/água após evaporar o metanol, foi necessário utilizar o liofilizador (JJ Científica -LJJ05) para retirada da água residual. O rendimento foi calculado e apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Rendimento das fases obtidas por partição líquido:líquido do extrato hidroetanólico de *A. glaziovii*.

	Extrato	F. Hexano	F. DCM	F. EtOAc	F. n-Butanólica	F. MeOH:H ₂ O
Massa (g)	100 g	0,2907 g	5,1254 g	4,3351 g	16,5570 g	40,6681g
Rendimento (%)		0,2907 %	5,12 %	4,33 %	16,55%	40,66%

Legenda: F: fase; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; MeOH: metanol; H₂O: água

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.5 Caracterização fitoquímica do extrato hidroetanólico e fases de *A. glaziovii*

4.5.1 *Screening* fitoquímico

O *screening* fitoquímico para o EHL-Ag1/5e fases de *A. glaziovii* foi realizado para avaliar a presença de alcaloides, esteroides/triterpenoides, catequinas, flavonoides, açúcares redutores, saponinas, polissacarídeos e taninos, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por (Barbosa, 2001; Matos, 2009), especificadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Pesquisa de metabólitos secundários no EHL-Ag1/5e fases de *A. glaziovii*.

Metabólitos secundários	Reagentes
Alcaloides	Drangedorf, Mayer, Bouchardat
Catequinas	Reação com ácido clorídrico
Flavonoides	Shinoda; oxalo-bórico
Açúcares redutores	Reação de Benedict: Fehling
Saponinas	Teste da espuma
Polissacarídeos	Lugol
Taninos	Solução alcóolica de FeCl ₃ a 1%; Precipitação de proteínas

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.5.2 Determinação do teor de metabólitos secundários

A determinação do teor de polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados foi realizada por espectrofotometria UV (Shimadzu UV-1900). Os métodos avaliaram a absorvância das soluções preparadas do extrato e das fases, definidas em metodologias específicas, frente a absorvância de soluções com reagentes padronizados, a qual expressou os resultados baseados na concentração do metabólito secundário por miligramas equivalentes do reagente padrão. Inicialmente se obteve uma curva de calibração, específica para cada metabólito, feita a partir de uma solução do reagente padrão referente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tratados estatisticamente por ANOVA ($p < 0,005$).

4.5.2.1 Teor de polifenóis totais

Realizam-se leituras de amostras de soluções de extratos vegetais e fases em presença de uma solução de reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino, relacionando-se os valores de absorvância encontrados com a concentração de polifenóis da solução, através de uma relação matemática obtida pela curva de calibração, conforme descrito por Chandra e Mejia (2004). Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de ácido gálico foi preparada nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e realizada leitura no comprimento de onda de 757 nm. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata e a equação de calibração do ácido gálico foi $y = 0,0195x - 0,0166$ ($R^2 = 0,9979$).

4.5.2.2 Teor de flavonoides

Realizam-se leituras de amostras de soluções de extratos vegetais e fases em presença de uma solução de cloreto de alumínio, relacionando-se os valores de absorvância encontrados com a concentração de flavonoides da solução, através de uma relação matemática obtida pela curva de calibração. A curva de calibração foi construída a partir da solução do padrão quercetina em concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e c. O teor de flavonoides foi expresso em miligramas equivalentes de quercetina. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a equação de calibração da quercetina foi $y = 0,0278x + 0,0145$ ($R^2 = 0,9931$) (Meda, et al., 2005).

4.5.2.3 Teor de taninos condensados

Realizam-se leituras de amostras de soluções de extratos vegetais e fases em presença de uma solução de vanilina, em meio ácido, relacionando-se os valores de absorvância encontrados com a concentração de taninos condensados da solução, através de uma relação matemática obtida pela curva de calibração. A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir das soluções nas concentrações de 5 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ do padrão catequina. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a equação de calibração da catequina foi $y = 0,0049x + 0,0222$ ($R^2 = 0,9985$) (Makkar; Becker, 1993). A leitura das absorvâncias foram realizadas no comprimento de onda de 500 nm.

4.5.3 Caracterização cromatográfica dos extratos de *A. glaziovii*

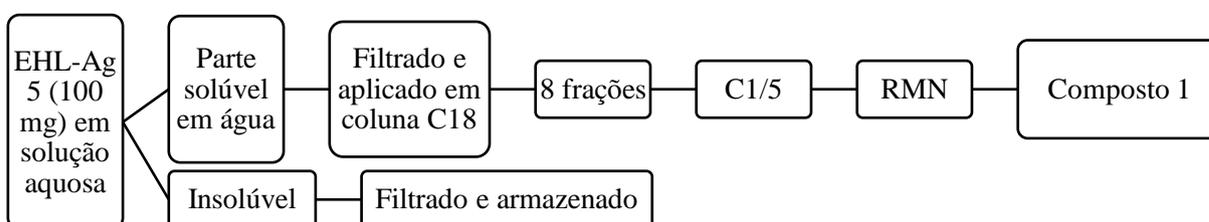
O perfil cromatográfico de todos os extratos (1 a 9) foi obtido empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), separadamente para cada um, utilizando cromatógrafo da marca Shimadzu constituído de duas bombas de alta pressão LC-10ADvp, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14a e injetor manual com alça de amostragem de 20 μL . A coluna cromatográfica usada foi da marca ACE C18, com 5 μm de tamanho de partícula e dimensões de 250 x 4,6 mm. Na preparação das soluções utilizou-se filtros para seringa em PVDF com 0,45 μm de diâmetro de poro e diâmetro 30 mm (Allcrom) além do aparelho de banho de ultrassom (TECNAL).

O volume de injeção das amostras foi de 20 μL , na concentração de 1 mg/mL , dissolvidas em solução com proporção de 50% de MeOH grau cromatográfico (Sigma-Aldrich) e 50% de água ultrapura (MilliQ), a amostra foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos, filtrada e transferida para um *vial*. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min , sendo a fase móvel constituída por água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e metanol (MeOH). A eluição foi realizada com gradiente linear de 5% a 95% de MeOH em 60 minutos.

4.5.4 Fracionamento cromatográfico do extrato obtido na quinta extração

Após a análise dos cromatogramas ao longo dos dias de filtração, a extração do 5º dia ou 5ª extração (EHL-Ag 5) foi escolhida para a cromatografia em coluna aberta (CC) utilizando sílica C18 com partículas de 5 µm, sem pressão aplicada. Uma amostra de 100 mg foi solubilizada em água, filtrada, e apenas a porção solúvel em água foi eluída na coluna de C18. A fase móvel consistiu em água:metanol, aplicados a coluna puros e/ou suas misturas binárias, em gradiente decrescente de polaridade, resultando em 8 frações que foram analisadas em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). A partir dessa primeira coluna, a fração 5 (C1/5) (60 mg), correspondente a fase móvel 50% MeOH e 50% água, solúvel em metanol e com aspecto amarelado foi escolhida para ser analisada por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Figura 21).

Figura 21 – Isolamento e Identificação da fração 5(C1/5) do EHL-Ag 5.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

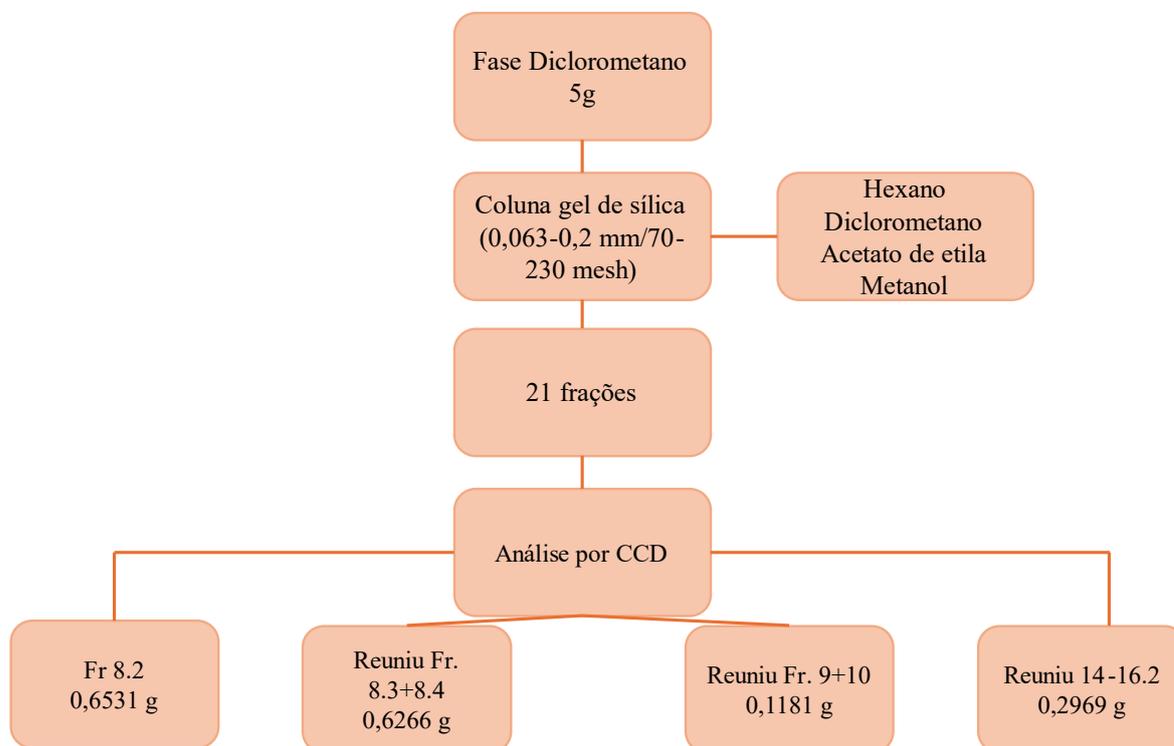
4.5.5 Cromatografia líquida de média pressão da fase DCM

A fase DCM (5 g) foi submetida à Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) utilizando um sistema binário Buchi (Suíça), modelo C-620, equipado com misturador para gradiente Buchi (Suíça), modelo C-660, e detector de UV Buchi (Suíça), modelo C-640. Uma coluna empacotada com gel de sílica de fase normal (Macherey-Nagel), com tamanho de partícula de 0,063-0,2 mm/70-230 mesh, foi utilizada como fase estacionária, enquanto hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros e/ou misturas binárias foram empregados como fase móvel.

O processo resultou em 21 frações, o peso total recuperado de todas as frações foi de 4,74 g, o que corresponde a um rendimento de 94,8%. Todas as frações foram posteriormente analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), utilizando diferentes

sistemas de eluição. Frações semelhantes foram agrupadas com base em critérios após análise sob luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) (Figura 22 – Fracionamento da fase diclorometano dos caules de *A. glaziovii* em CLMP. (Figura 22).

Figura 22 – Fracionamento da fase diclorometano dos caules de *A. glaziovii* em CLMP.



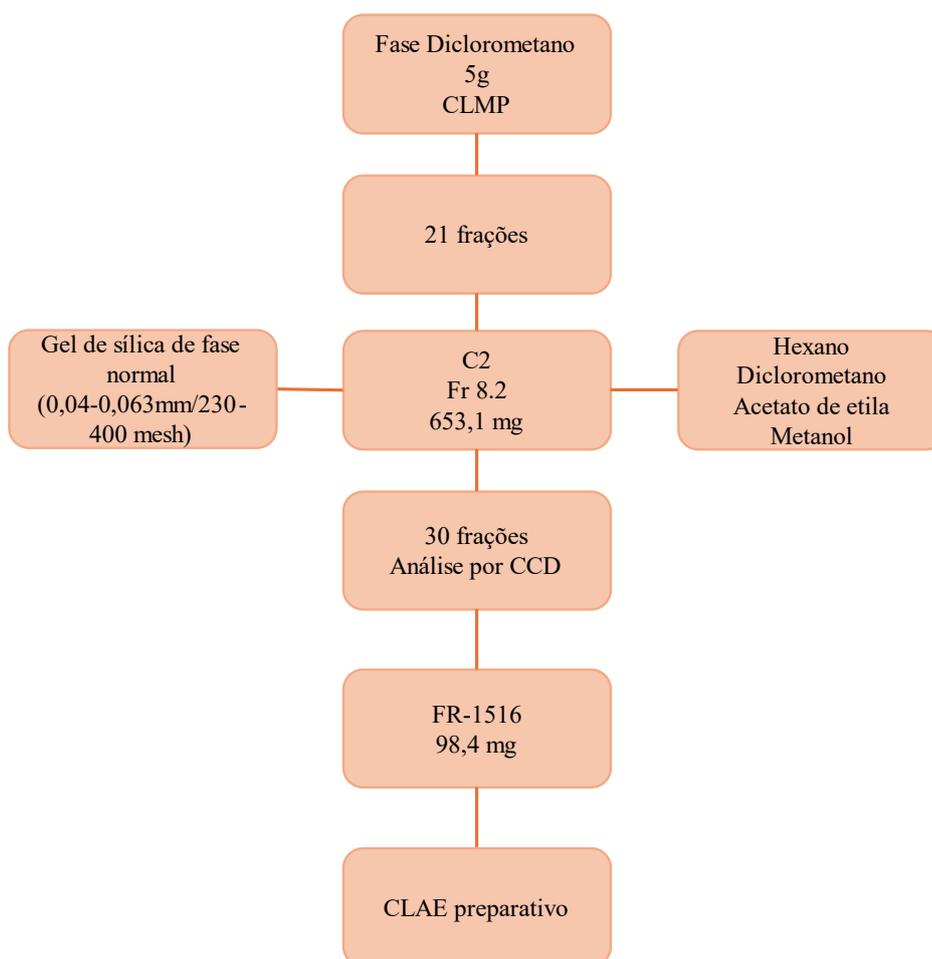
Fr= Fração: 8.2/8.3/8.4 foram coletadas na mesma proporção de solvente em tempos diferentes.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.5.6 Coluna 2 da fração 8.2 da fase DCM

Foi realizada uma cromatografia em coluna (CC) com a fração 8.2 da fase DCM, usando-se gel de sílica de fase normal (Macherey-Nagel), 0,04-0,063mm/230-400 mesh, como fase estacionária e hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros e/ou misturas binárias como fase móvel. Ao final do processo, obteve-se 30 frações, que foram analisadas comparativamente em CCDA utilizando diversos sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes, mediante o uso de sistemas reveladores como luz ultravioleta, em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm). As frações 15 e 16 foram reunidas (FR-1516) e passaram por um refracionamento em escala preparativa, como descrito na (Figura 23).

Figura 23 – Fracionamento da fração 8.2 da fase diclorometano dos caules de *A. glaziovii* em CLMP.



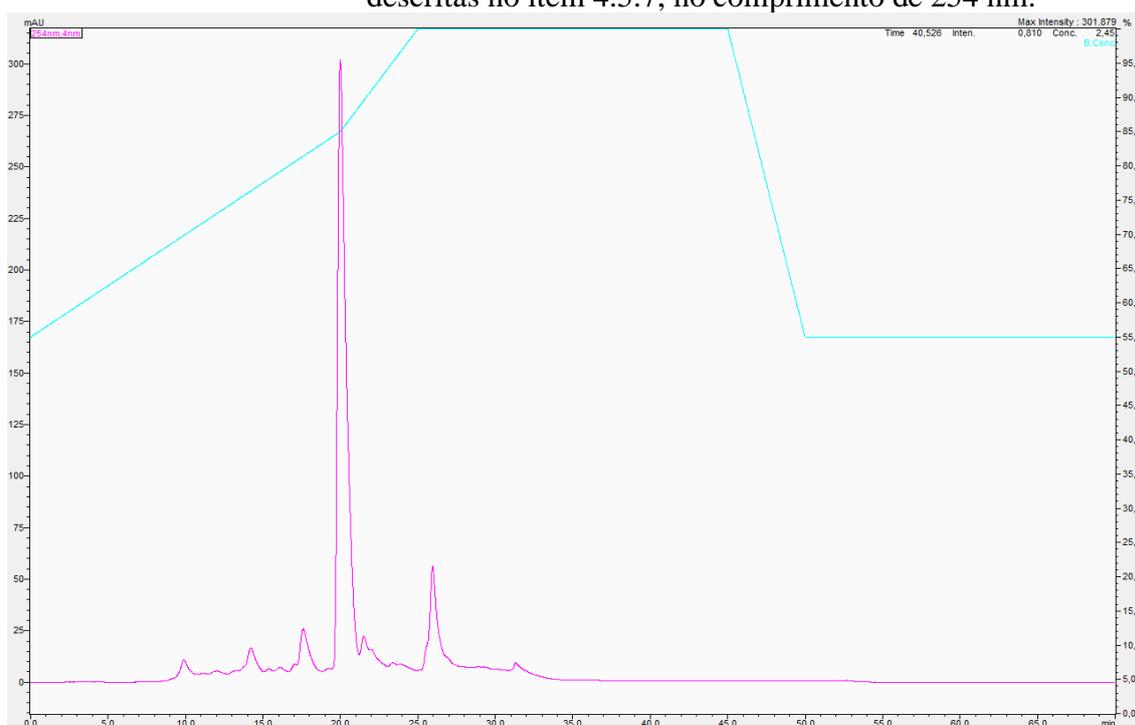
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.5.7 Refracionamento da amostra FR-1516 por CLAE em escala preparativa

A FR-1516 foi cromatografada em CLAE com escala preparativa (Shimadzu, constituído de duas bombas de alta pressão LC-10ADvp, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseficador DGU-14), utilizando coluna de fase reversa (Shimadzu Shim-pack GIST Prep-C18, 20 x 250 mm, 5 µm). O volume de injeção das amostras foi de 200 µL na concentração de 1 mg/mL dissolvidas em MeOH grau cromatográfico. Para solubilização, a amostra foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos, filtrada em filtro para seringa em PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro e diâmetro 30 mm (Allcrom) e transferida para um *vial*. O fluxo de eluição foi de 8 mL/min e a detecção foi realizada em dois comprimentos de onda, 245 e 310 nm. O eluente utilizado foi água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase A) e MeOH (fase B), empregando-se o

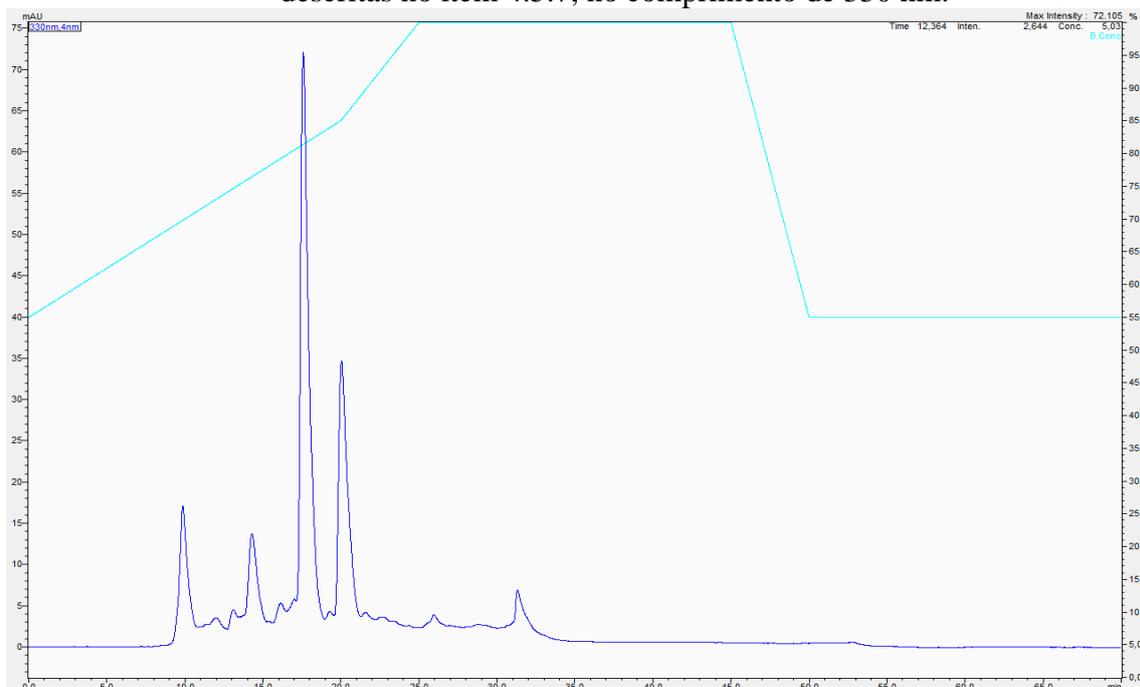
gradiente de 55-85% em 20 min de MeOH, depois de 85-95% em 5 min de MeOH, seguida por 10 minutos em modo isocrático à 95% de MeOH para limpeza da coluna e 15 minutos para retornar à condição inicial. A coleta das frações foi realizada manualmente e baseada nos tempos de retenção dos picos detectados no cromatograma (Figura 24 e Figura 25). Esse procedimento foi repetido 15 vezes. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo IKA (RV 3 eco) sobre pressão reduzida, à temperatura máxima de 50 °C.

Figura 24– Cromatograma do método desenvolvido para coluna preparativa nas condições descritas no item 4.5.7, no comprimento de 254 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 25– Cromatograma do método desenvolvido para coluna preparativa nas condições descritas no item 4.5.7, no comprimento de 330 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

O desenvolvimento do método resultou na obtenção de sete picos isolados com peso e tempos de retenção descritos na Tabela 5. Todos esses picos apresentaram solubilidade em DMSO.

Tabela 5– Descrição dos tempos de retenção dos picos coletados na CLAE preparativo

Picos isolados	Tempo de retenção (min)	Quantidade (mg)
1	9,5	1mg
2	12,9	1,5mg
3	14	2,2mg
4	17,5	3,8mg
5	19,7	60mg
6	21,3	1,2mg
7	25,85	2mg

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.6 Métodos Espectroscópicos

4.6.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros BRUKER AVANCE III operando a 500 MHz do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), da UFPB utilizando metanol- d_4 , como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H serão indicadas segundo as convenções.

4.7 Atividade antimicrobiana

4.7.1 Preparação das amostras

O EHL-Ag1/5 e as fases particionadas hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica e aquosa foram solubilizadas em solução salina e DMSO a 1%, obtendo-se uma concentração de $4.096\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para as amostras.

4.7.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nestes testes foram provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (ATCC 33591), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* (ATCC 10231), obtidas no Laboratório de Desenvolvimento de medicamentos (LABDEM) da UEPB.

4.7.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio foi realizado pela técnica de microdiluição em placa, a qual utiliza microplacas estéreis com 96 cavidades de fundo chato e tampa. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição para bactérias e para fungos pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2005). Como meio de cultura foi utilizado caldo Mueller-Hinton para as bactérias e caldo Sabouraud dextrose para a levedura.

A padronização do inóculo para bactérias e leveduras foi realizada seguindo as recomendações dos documentos do (CLSI/NCCLS, 2005). Para bactérias, colônias isoladas

foram inoculadas em caldo Mueller Hinton para atingir turbidez equivalente a 0,5 Mc na escala de Farland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias/mL - UFC/mL). Em seguida, as suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina para obtenção do inóculo final ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL). Quanto ao inóculo para leveduras, as colônias isoladas foram inoculadas na solução salina estéril até turbidez equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^6$ até $5,0 \times 10^6$ UFC/mL).

Os controles positivos foram ceftriaxona, cefepime, ceftazidima e cefoxitina e anfotericina B. As placas foram incubadas a 37 ± 1 °C para as bactérias e a 24 ± 1 °C para levedura, durante 24 h, conforme o (CLSI/NCCLS, 2005). O crescimento microbiano foi indicado pela adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01 %, com nova incubação a 37 ± 1 °C por duas horas. A CIM foi definida como a concentração mais baixa onde não houve crescimento microbiano visível, determinada pela alteração de cor no meio ao adicionar a resazurina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8 Toxicidade Hemolítica

O procedimento experimental foi realizado com sangue doado pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UEPB. Sangue do tipo O⁺ foi colocado em tubo com EDTA. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% (três vezes) a 2500 rpm/5 minutos. As hemácias foram ressuspendidas em solução salina a 1% e a contração foi ajustada para 5%. Então, colocou-se 1,0 mL da suspensão de hemácia a 5% juntamente com 1,0 mL das soluções-teste (Pinto, et al., 2012).

O EHL-Ag1/5 e as fases particionadas hexânica, diclorometano, acetato de etila, butanólica e aquosa foram solubilizadas em solução salina e DMSO a 1%, obtendo-se concentrações de 2.000, 1.000, 500, 250 e 125 µg/mL para o EHL-Ag1/5 e fases. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente durante 1 hora e, posteriormente, centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-1900 no comprimento de onda de 540 nm. Como controle positivo foi utilizado Triton-X 100 (NEON) e como negativo, a solução salina a 1%. A análise foi realizada em triplicata e o cálculo do potencial hemolisante das substâncias foi realizado por meio da seguinte equação 1:

Equação 1 – Calcular o potencial hemolisante.

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} * 100$$

Ph= Potencial Hemolisante (em porcentagem)

Ae = Absorbância do extrato

Ab = Absorbância do branco (controle negativo)

At = Absorbância do Triton-X 100 (controle positivo)

4.9 Avaliação da toxicidade *in vivo*

4.9.1 Teste de toxicidade aguda

Para o ensaio de toxicidade aguda os parâmetros seguidos foram descritos no protocolo 423 das diretrizes da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD/OCDE 423, 2001). Como mencionado foram utilizados 6 animais (n= 6) que foram divididos em grupos de três (n=3). O grupo controle, recebeu solução salina (veículo), e o grupo experimental recebeu 2000 mg/kg do extrato de *A. glaziovii* por via oral. Os camundongos foram observados inicialmente por 6 horas e diariamente por 14 dias, quanto aos sinais de estado de consciência e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividades sobre o sistema nervoso central e consumo de água e ração. Ao final de 14 dias, os animais foram eutanasiados, o sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenados em tubos sem anticoagulante e contendo EDTA.

Com base nos resultados a serem descritos, o extrato hidroetanólico liofilizado de *A. glaziovii* (EHL-Ag1/5) demonstrou sinais de toxicidade, embora não tenham sido registrados óbitos. Portanto, uma avaliação em uma dose menor foi considerada necessária. Foi selecionada uma dose 10 vezes maior que a dose teste utilizada para as atividades anti-inflamatórias. Assim, o ensaio de toxicidade foi repetido, seguindo os parâmetros estabelecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/OCDE 423, 2001), utilizando uma dose de 500 mg/kg.

4.9.2 Análise bioquímica e hematológica

Ao final dos ensaios de toxicidade, foi coletado o sangue dos animais e utilizando o analisador automático COBAS Mira Plus (Roche Diagnostics Systems, Basel, Suíça) e kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) os seguintes parâmetros bioquímicos

foram avaliados: proteína total, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase (GGT), ureia e creatinina. A análise hematológica foi realizada utilizando um analisador automático (Sangue de animal Counter-ABC Vet, Montpellier, França) e microscopia óptica; os parâmetros avaliados foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e análise total e diferenciada dos leucócitos.

4.9.3 Genotoxicidade

4.9.3.1 Micronúcleo

Para avaliar o perfil genotóxico do tratamento com o extrato de *A. glaziovii* foi utilizado o teste do micronúcleo em eritrócitos de camundongos baseado no método descrito por (Oliveira, et al., 2020) com pequenas modificações. Brevemente, 3 grupos de camundongos machos (n=5) foram tratados com PBS (controle negativo), ciclofosfamida (50 mg/kg) ou *A. glaziovii* (2.000 mg/kg) por via oral em dose única. 24 e 48 h após os tratamentos alíquotas (10 µL) de sangue periférico (cauda) foram aplicados em lâminas previamente coradas com laranja de acridina e analisado em microscópio de fluorescência. Um total de três lâminas por animal foram preparadas e a frequência de micronúcleo foi determinada após a contagem de 2.000 eritrócitos por lâmina.

4.10 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*

4.10.1 Animais

Os camundongos (Swiss) de 8 a 10 semanas pesando entre 30 e 40 g foram adquiridas pelo Biotério da Universidade Federal de Pernambuco e mantidas sob temperatura controlada (22°C ± 1 °C), com ciclo claro/escuro de 12 h e com acesso livre a água e ração. Cada grupo de teste era composto por seis animais (n= 6), com exceção dos grupos para o ensaio de genotoxicidade que tiveram grupos com cinco (n= 5), de acordo com o protocolo. Antes dos ensaios serem realizados os animais foram aclimatados, jejuados por 6 a 8 horas e colocados em restrição de água por 30 min. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (nº 0102/2023), de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Em todos os testes os

animais foram eutanasiados utilizando inicialmente cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, para promover o efeito sedativo e, posteriormente, cetamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg com o objetivo de seguir com a sedação profunda acompanhada de eutanásia para minimizar o sofrimento animal.

4.10.2 Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

Camundongos machos foram agrupados em cinco grupos (n = 6) e foram tratados com EHL-Ag1/5 (25, 50 ou 100 mg/kg, v.o.), solução salina (0,9% v.o.) ou dexametasona (10 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do início dos testes. Os animais tiveram o volume das patas traseiras medido utilizando um paquímetro digital. Posteriormente, os animais foram tratados e o edema da pata foi induzido com carragenina a 2% (15 µL) que foi injetada na região suplantar da pata direita. O tamanho das patas nos tempos 1, 2, 3 e 4 h foi determinado. Assim, a diferença entre o volume inicial das patas e o volume em tempos 15, 30, 60 e 120 min foram calculados (Winter; Risley; Nuss, 1972).

4.10.3 Ensaio de peritonite

Camundongos machos foram agrupados em cinco grupos (n = 6) e foram tratados com *A. glaziovii* (25, 50 ou 100 mg/kg, v.o.), solução salina (0,9% v.o.) ou dexametasona (10 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do início do ensaio. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 1% de carragenina. Após 4 h, os animais foram eutanasiados e 2 mL de PBS heparinizado foram injetados na cavidade peritoneal e, logo em seguida, o exsudato foi removido. A contagem de leucócitos da lavagem peritoneal foi realizada e expressa em porcentagem (Cavalcante, et al., 2021; Lapa, et al., 2008).

4.10.4 Ensaio de bolsão de ar

Foi realizado o ensaio de bolsão de ar induzido por carragenina, um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória (Sedgwick; Lees, 1986). Cada grupo recebeu por via subcutânea 2,5 mL de ar estéril (1º e 4º dia) na região dorsal. No 7º dia, 30 minutos antes da administração da carragenina foram administrados o extrato de *A. glaziovii* (25, 50 ou 100 mg/kg, v.o.) o fármaco padrão (indometacina) e o veículo por via oral nos respectivos grupos, posteriormente, 1 mL de uma

solução de carragenina (1% (p/v) foi injetada na cavidade. Após 6 horas foi realizada contagem total de leucócitos no bolsão em analisador hematológico (Barros, et al., 2010; Kim, et al., 2011).

4.11 Análise e estatística

Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism® versão 8.0 e expressos em valores médios com desvio padrão (\pm DP). As diferenças estatisticamente significantes foram calculadas usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey. Os valores foram considerados significativamente diferentes em $p < 0,05$ para avaliação da toxicidade e $p < 0,001$ para os testes anti-inflamatórios.

Esta pesquisa foi financiada pela FAPESQ-PB / Ministério da Educação; Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste, CERTBIO / UEPB; Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, LDCPF / UEPB; Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, LABDEM / UEPB, Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos, NUPEA, e Instituto Nacional do Semiárido – INSA / Governo Federal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, IPeFarM/UFPB, Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises, LMCA/UFPB.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização fitoquímica do EHL-Ag1/5 e fases de *A. glaziovii*

5.1.2 *Screening* fitoquímico e determinação do teor de metabólitos secundários

O *screening* fitoquímico apresentou resultados negativos para taninos no teste de precipitação de proteínas e solução alcóolica de FeCl_3 a 1%, flavonoides (Shinoda; oxalobórico), alcaloides (Drangedorf, Mayer, Bouchardat) e catequinas (reação com ácido clorídrico). Resultados da pesquisa por metabólitos secundários pelo método qualitativo, sendo positivo para saponinas, conforme demonstrado pelo teste de espuma. É relevante considerar que os testes realizados podem ter limitações de sensibilidade para detectar metabólitos em concentrações muito baixas. No entanto, nas condições experimentais empregadas, apenas as saponinas foram identificadas no extrato dos caules de *A. glaziovii*.

O estudo conduzido com o extrato metanólico da casaca de *Apodanthera smilacifolia* Cong. obteve resultados positivos para alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos (Ferreira, et al., 2018). Alguns fatores podem influenciar essas divergências como a diferença na constituição química para cada espécie, período de coleta e alterações na região de cultivo desses materiais vegetais. Assim como fatores bióticos e abióticos, como disponibilidade hídrica e nutricional, temperatura, radiação ultravioleta, altitude, estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Matos, 2009).

Em contrapartida, os testes de quantificação das fases acetato de etila, diclorometano e *n*-butanol mostraram resultados positivos, para flavonoides, com concentrações (equivalentes de quercetina), de $1,74 \mu\text{g EQ/mL}^{-1}$ (teor de 0,17%), de $6,72 \mu\text{g EQ/mL}^{-1}$ (teor de 0,67%) e $1,07 \mu\text{g EQ/mL}^{-1}$ (teor de 0,10%) para as três fases, respectivamente. A fase MeOH:H₂O e o EHL-Ag1/5 não apresentaram valores quantificáveis para flavonoides. Também apresentaram teor de polifenóis (equivalentes de ácido gálico) semelhantes ao padrão no EHL-Ag1/5 e em todas as fases, destacando-se a *n*-butanólica com $38,59 \mu\text{g EAG/mL}^{-1}$ (teor de 3,85%) (Tabela 6). Na determinação de taninos, os resultados foram consistentes com os dados do ensaio qualitativo, os quais não foram detectados no EHL-Ag1/5 e fases em níveis quantificáveis.

Tabela 6 – Teor de metabólitos secundários presentes nos caules de *A. glaziovii*.

Amostra	Teor de Flavonoides totais	Teor de Polifenóis totais
EHL	-	3,4%
F. DCM	0,67%	1,97%
F. AcOEt	0,17%	2,03%
F. Butanólica	0,10%	3,85%
F. MeOH:H ₂ O	-	2,88%

Legenda: EHL: Extrato hidroetanólico liofilizado; F: fase; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol; H₂O: água.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A quantificação de compostos fenólicos e flavonoides no extrato hidroetanólico das raízes de *Apodanthera congestiflora* apontaram teor de $14,89 \pm 1,87$ mg AT/g (mg equivalente de ácido tânico) e $11,83 \pm 1,94$ mg RUT/g (mg equivalentes de rutina), apesar de baixo teor ainda foram maiores que os de *A. glaziovii*. No entanto, os resultados para taninos corroboram ao encontrado para a espécie de estudo, com ausência desse metabólito em ambas as espécies do gênero *Apodanthera* (Videres, 2017).

Uma característica marcante da família Cucurbitaceae é a alta quantidade de seiva succulenta, que alguns de seus gêneros desenvolveram como adaptação à escassez de água. Isso pode explicar o elevado teor de saponinas nos caules dessas plantas, logo, os resultados para espécie *A. glaziovii* sendo da mesma família são congruentes (Shyaula; Manandhar, 2021). Grande parte do potencial terapêutico relatado para espécies da família Cucurbitaceae e do gênero *Apodanthera* estão atreladas as saponinas presentes nesses vegetais. Diversos estudos atribuem atividades como cardiovascular, hepatoprotetora, imunorreguladora e anti-inflamatória a essa família e as cucurbitacinas (saponinas triterpênicas) presentes nela (Rolnik; Olas, 2020).

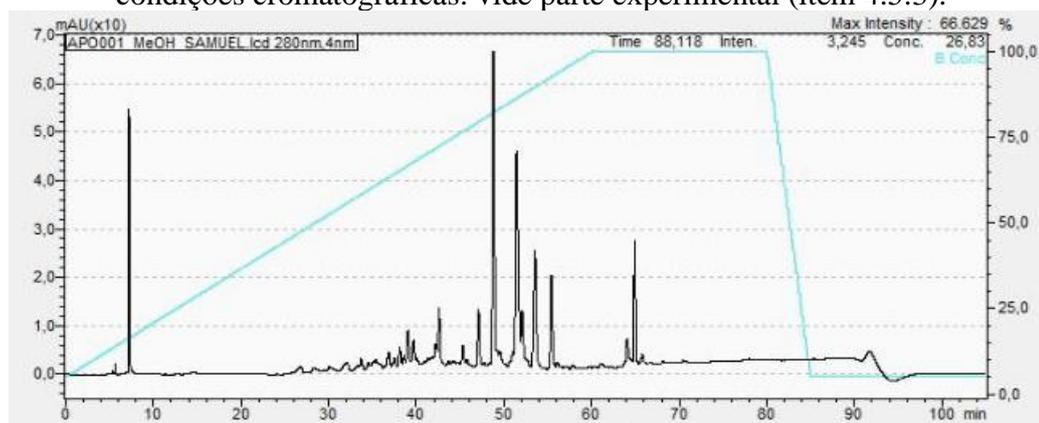
5.1.3 Caracterização cromatográfica dos extratos hidroetanólico de *A. glaziovii*

A análise do perfil cromatográfico simplifica a amostra, permitindo a observação das características de absorção dos compostos presentes no material vegetal. Além disso, essas técnicas podem reduzir a complexidade da amostra por meio de métodos de separação, como cromatografia em coluna e CLAE preparativa (Prado, 2012).

A variação na coloração dos extratos de *A. glaziovii* foi atribuída à diferença de polaridade dos compostos extraídos. Nos estágios iniciais das extrações, ocorreu uma

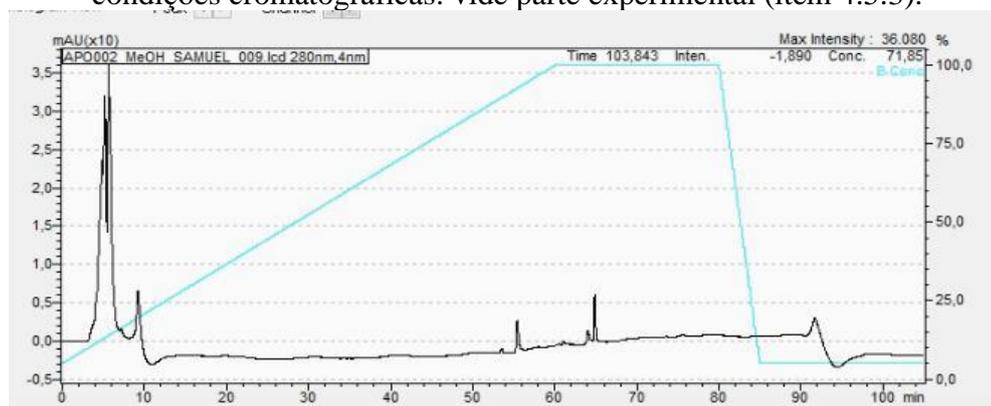
predominância na extração de compostos polares, resultando em uma coloração mais intensa, avermelhada, atribuída às extrações dos dias 1 ao dia 5 (Figura 26 a Figura 30). À medida que o processo de extração avançou, os compostos apolares foram sendo extraídos em maior quantidade, levando a uma alteração na coloração, para esverdeada, atribuída aos dias 6 ao 9 (Figura 31 e Figura 34). Isso pode ser observado nos cromatogramas abaixo (Figura 26 a Figura 34).

Figura 26 – Perfil cromatográfico da primeira extração (dia 1) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



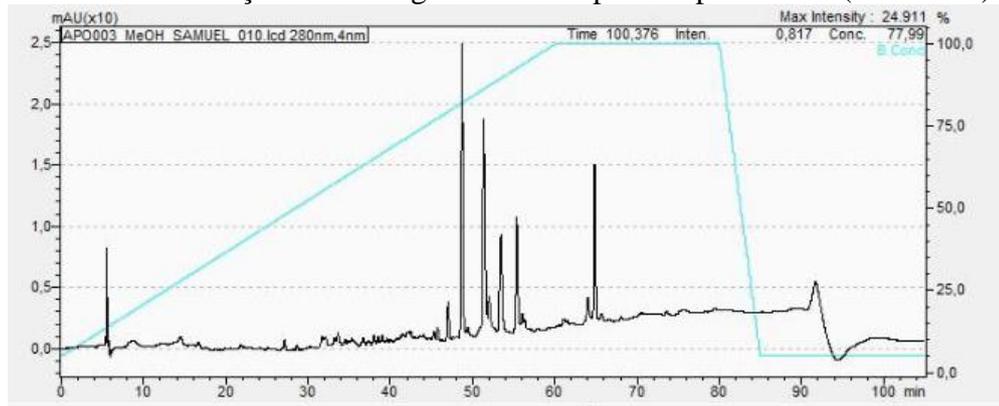
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 27 – Perfil cromatográfico da segunda extração (dia 2) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



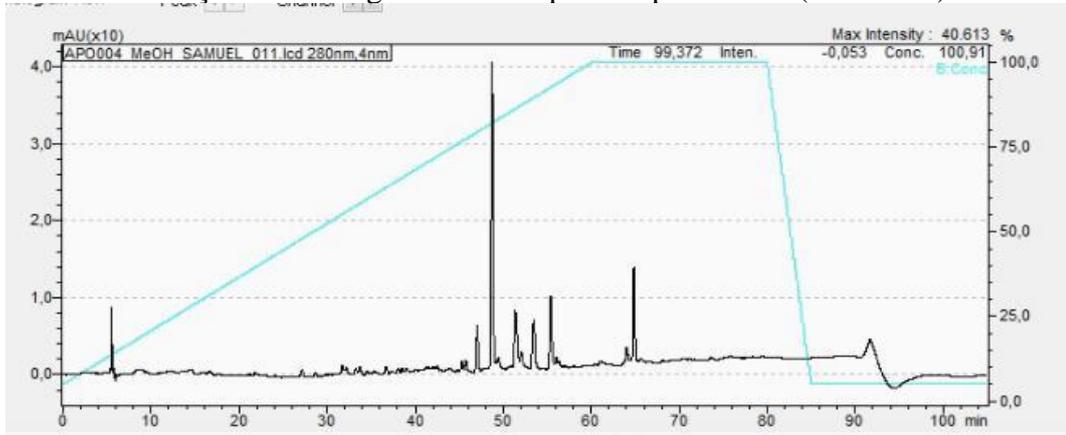
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 28 – Perfil cromatográfico da terceira extração (dia 3) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



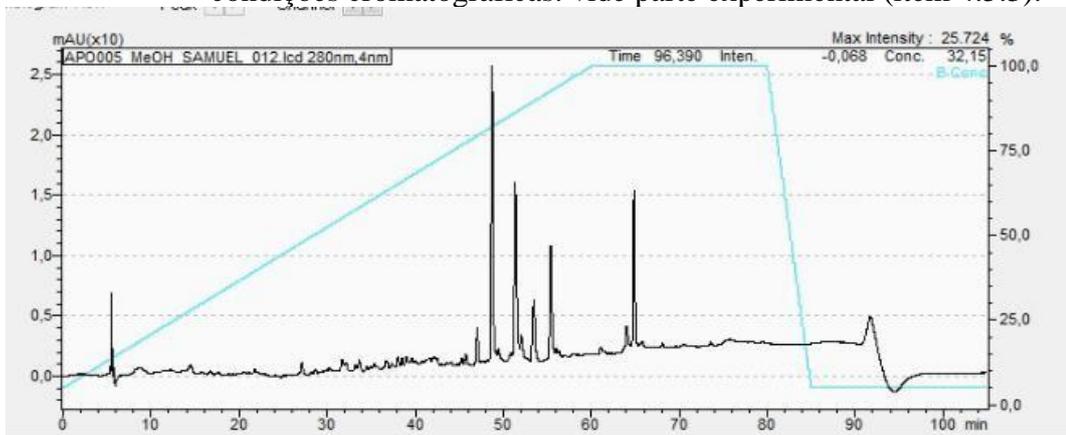
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 29 – Perfil cromatográfico da quarta extração (dia 4) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



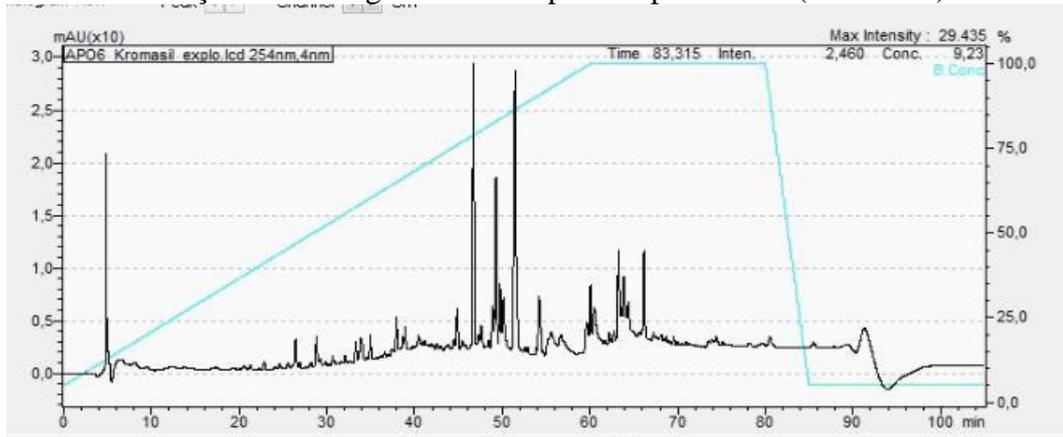
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 30 – Perfil cromatográfico da quinta extração (dia 5) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



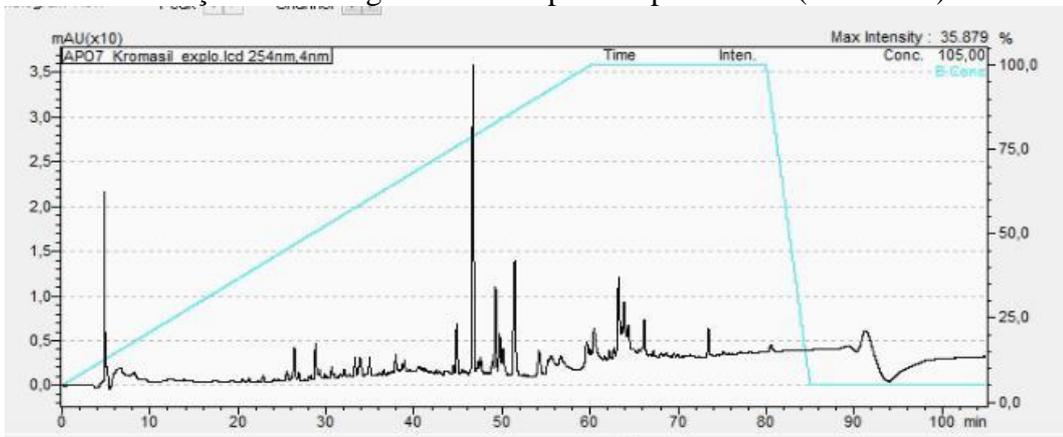
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 31 – Perfil cromatográfico da sexta extração (dia 6) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



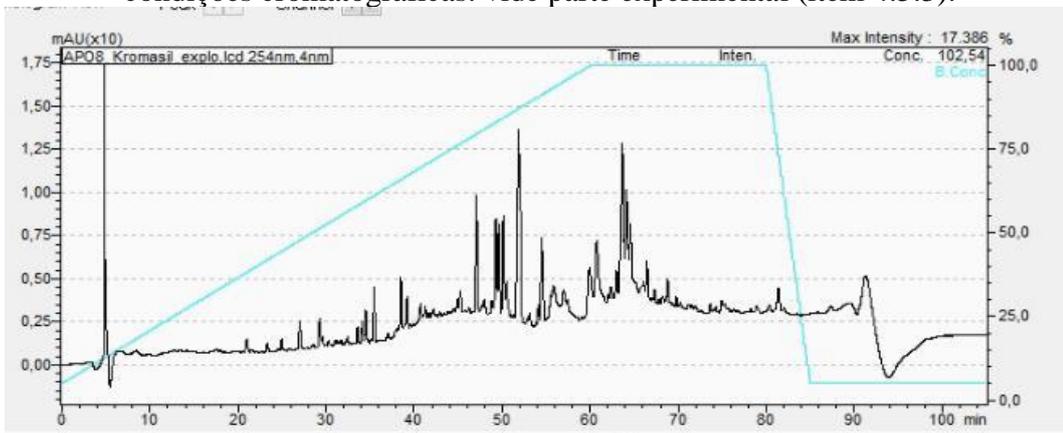
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 32 – Perfil cromatográfico da sétima extração (dia 7) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



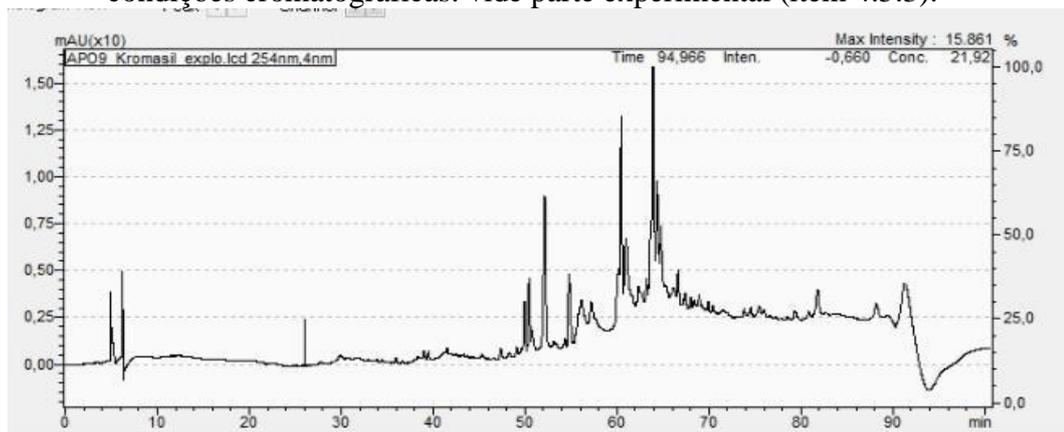
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 33 – Perfil cromatográfico da oitava extração (dia 8) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 34 – Perfil cromatográfico da nona extração (dia 9) do EHL de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



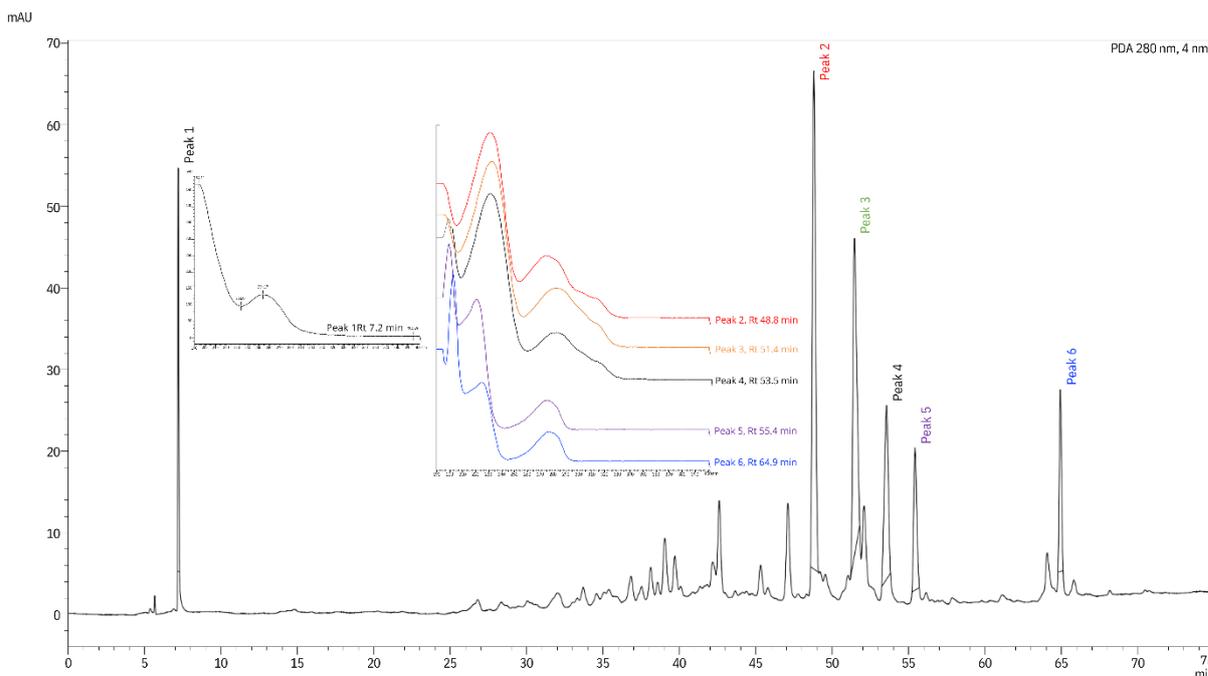
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Nas etapas iniciais das extrações, observam-se picos mais proeminentes e próximos à fase móvel no tempo inicial, na proporção em que o solvente, neste caso a água acidificada, é mais polar. Conforme as extrações avançam para os dias 6 a 9 (Figura 31 e Figura 34), a intensidade dos picos diminui, e ocorre uma maior extração de compostos próximos ao solvente menos polar utilizado, como o metanol. Também foi possível observar algumas características dos constituintes químicos do extrato por CLAE, realizada empregando um gradiente exploratório de eluição (5 - 95% de MeOH em 60 min).

Como é possível observar, a região entre 50 e 70 minutos altera conforme as extrações foram ocorrendo, mesma região que possui maior concentração do solvente B MeOH, o que caracteriza uma maior extração de compostos apolares, para a sexta extração (dia 6), sétima extração (dia 7), oitava extração (dia 8), e, nona extração (dia 9). A partir da avaliação desses cromatogramas foram reunidas as extrações de 1 a 5 e desta foi realizada o processo de partição líquido:líquido.

Os picos principais identificados no cromatograma (Figura 35) foram numerados de 1 a 6. O pico 1, com tempo de retenção (Rt) de 7,2 min e bandas de absorção de 233 e 254 nm, esta substância de alta polaridade é sugestiva de um composto fenólico, que corresponde a este comprimento de onda. Os picos 2 e 3, com Rt de 48,8; 51,4 min; e os picos 4, 5, e 6, correspondentes aos Rt 53,5; 55,4; 64,9 min, respetivamente, apresentaram espectros de absorção semelhantes no PDA, com picos de absorção de 235, 275 e 315 nm. Este perfil de absorção é indicativo das norcucurbitacinas, também conhecidas como cayaponósidos, que são saponinas triterpenóides com um anel A aromático (Himeno, et al., 1992).

Figura 35 – Perfil cromatográfico do EHL-Ag1/5 dos caules de *A. glaziovii*. Sob condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.5.3).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

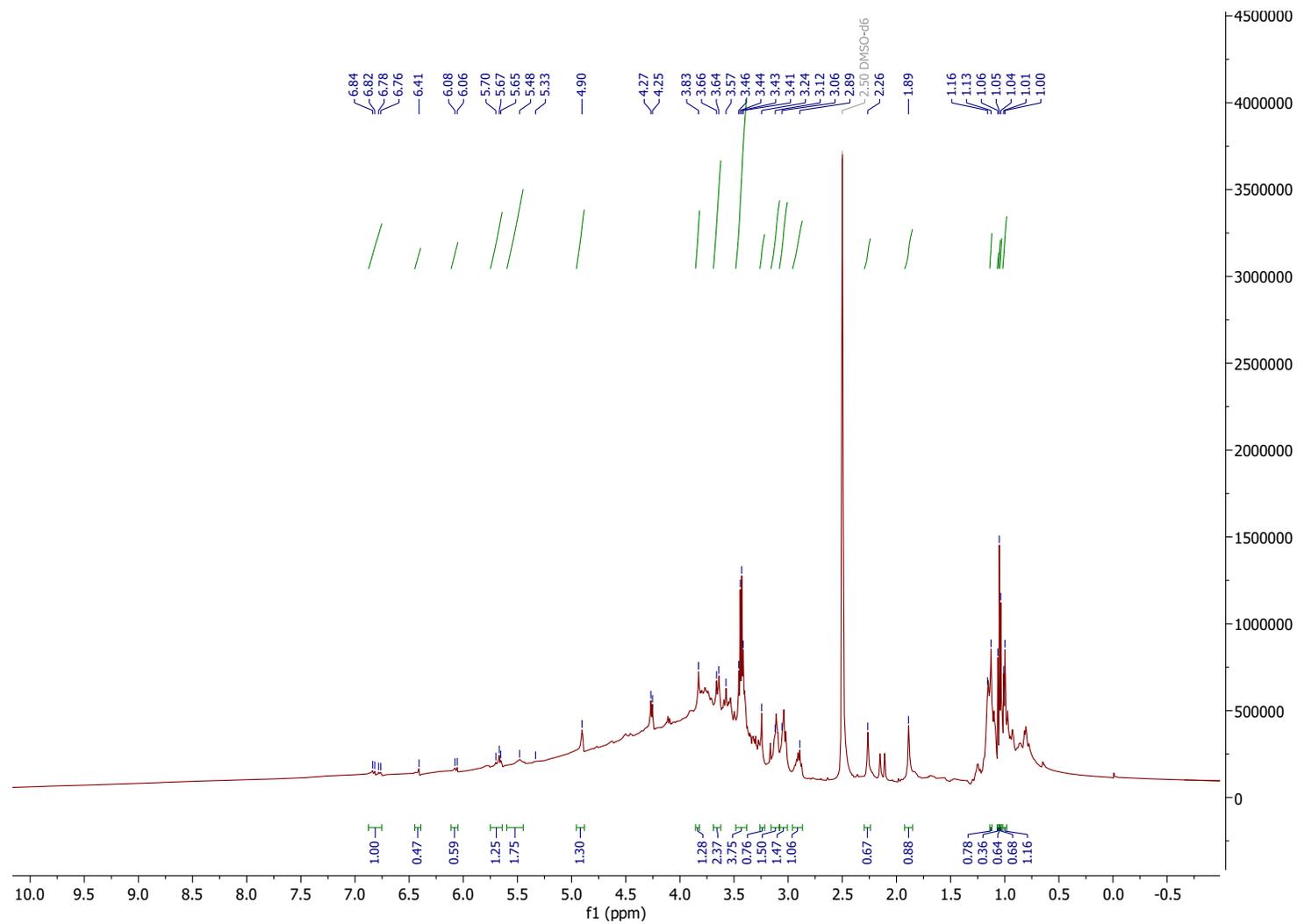
No espectro de RMN de ^1H (DMSO 500) do EHL-Ag1/5 (Figura 36) foram observados sinais entre de deslocamento químico δ_{H} 6,84 e 5,67, indicativos de hidrogênio ligados a carbonos sp^2 com o pico em δ_{H} 6,41 (s, 1H) característico de hidrogênio aromático presente em estruturas do tipo norcucurbitacinas (Achenbach, et al., 1993). Foi visualizado, também, um envelope de sinais entre δ_{H} 3,06 e 1,00 indicativos e grupos metilênicos e metílicos, o que reforça a presença de núcleo triterpenoide. Foi possível verificar, ainda, sinais entre δ_{H} 3,83 e 3,06 indicando presença de unidades osídicas no extrato, além de sinais em δ_{H} 4,90 (m) e δ_{H} 4,26 (d) indicativos de hidrogênios anomérico e característico da presença de açúcares nas moléculas, o que sugere presença de saponinas como compostos majoritários presentes no espectro (Achenboch et al 1993, Nokomo et al, 1994).

No espectro de RMN de ^{13}C (DMSO 500) (Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

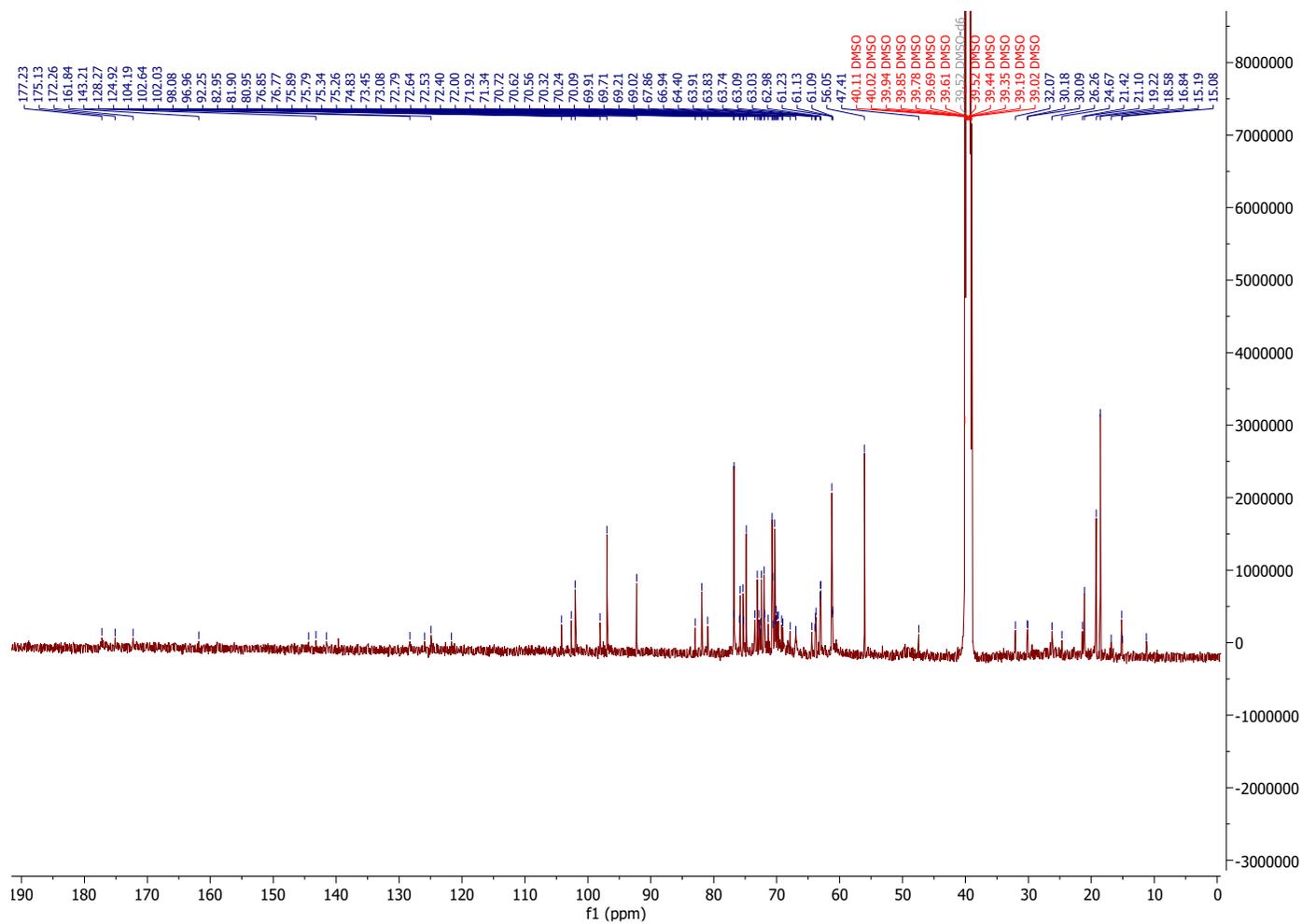
Figura 37) foram visualizados sinais de deslocamento químico entre δ_{C} 144 e 125 ppm indicativos da presença de carbonos aromáticos de núcleos de norcucurbitacinas (Achenbach, et al., 1993). Os sinais entre δ_{C} 53 e 42 ppm podem ser atribuídos a carbonos metínicos e metilênicos de estrutura triterpênicas, além dos sinais entre δ_{C} 30 e 11 ppm características de metilas de núcleo cucurbitano. Foram observados ainda de δ_{C} 76 a 61 ppm e em δ_{C} 104 e 102 ppm sinais de carbonos oximetínicos e de carbonos anomérico que indicam a presença de

açúcares no espectro e permitem sugerir que os compostos majoritários do extrato são saponinas triterpênicas (Himeno, et al., 1992).

Figura 36. –Espectro de RMN ^1H do Extrato Hidroetanólico Liofilizado de *Apodanthera glaziovii* (EHL-Ag1/5) (DMSO, 500 MHz).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 37 –Espectro de RMN ^{13}C do Extrato Hidroetanólico Liofilizado de *Apodanthera glaziovii* (EHL-Ag1/5) (DMSO, 500 MHz).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

5.1.4 Identificação do composto 1 do EHL-Ag1/5

O composto 1 apresentou-se como sólido amorfo de cor amarela, solúvel em metanol. O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) mostrou um envelope de sinais característicos de núcleo esteroidal e/ou triterpênico, além de sinais entre δ_{H} 4,61 e 3,47 que sugerem a presença de uma unidade de açúcar, evidenciando a presença de uma saponina. Em δ_{H} 6,54 (s, 1H) foi visto um sinal sugestivo de hidrogênio da posição 1 de cucurbitacinas que tem o anel A aromático pentassubstituído, denominadas de norcucurbitacinas (Himeno, et al., 1994).

Na expansão do espectro de RMN de ^1H foi visto um sinal em δ_{H} 6,91 (d, $J=10,1$ Hz, 1H) sugestivo da presença de insaturação entre os C-6 e C-7, além de mais 2 sinais em δ_{H} 5,77 (dd, $J = 5,4$ e $15,7$ Hz, 1H) e δ_{H} 5,84 sugestivos de mais uma insaturação entre os C-23 e C-24. O sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,96 que está vizinho ao lado do C-23 citado acima, é sugestivo para o carbono C-22 (Tabela 7) (Himeno, et al., 1994).

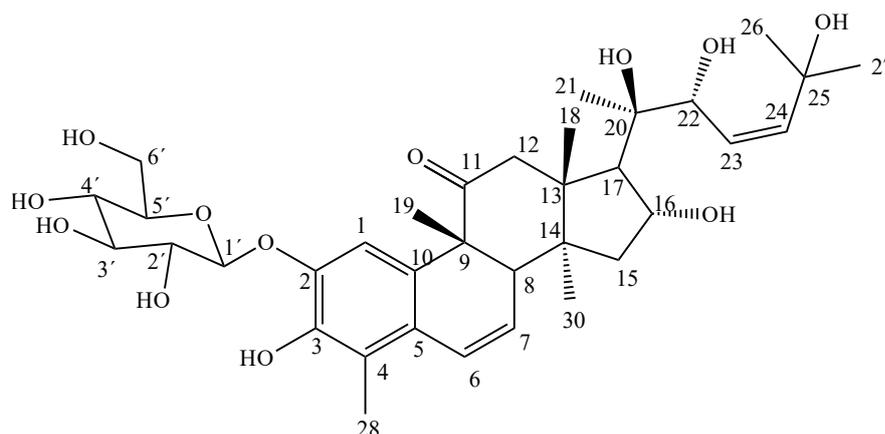
Foram observados ainda os sinais em δ_{H} 2,24 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 1,05 (s, 3H) e 1,27 (s, 6H). Todos eles são característicos da presença de metilas com destaque para os sinais em δ_{H} 2,24, 1,21 e 1,27 (6H) que podem caracterizar a presença dos grupos metílicos das posições 28, 21 e 26 e 27, respectivamente. Isso fornece suporte ao grau de substituição do anel A, a presença de um carbono quaternário em C-20 ligado a uma hidroxila e uma metila em C-21 e das metilas terminais da cadeia lateral C-26 e C-27 ligadas a mais um carbono quaternário oxigenado, respectivamente (Himeno, et al., 1994).

A presença dos sinais de deslocamento químico entre δ_{H} 3,39 - 3,56 em δ_{H} 3,83 (d, $J=4,1$ Hz, 1H) e δ_{H} 3,95 (d, $J=4,3$ Hz, 1H), sendo estes 2 últimos sugestivos dos H6a e H6b indicam presença de uma unidade osídica. Além disso, o sinal em δ_{H} 4,61 (d, $J=7,3$ Hz, 1H) é característico do Hidrogênio anomérico. Tais dados sugerem a presença de uma β -glicose ligada a molécula (Achenbach, et al., 1993; Silvestre, et al., 2021).

Os dados de RMN de ^1H juntamente com os valores comparados a literatura citada, permitem identificar o composto 1 como sendo o caiaponosídeo D2 (

Figura 38), isolado pela primeira vez em *A. glaziovii* e citado anteriormente em *Cayaponia tayuya* Cogn. do gênero *Cayaponia* e mesma família de *A. glaziovii*.

Figura 38 – Estrutura da substância caiaponosídeo D2.



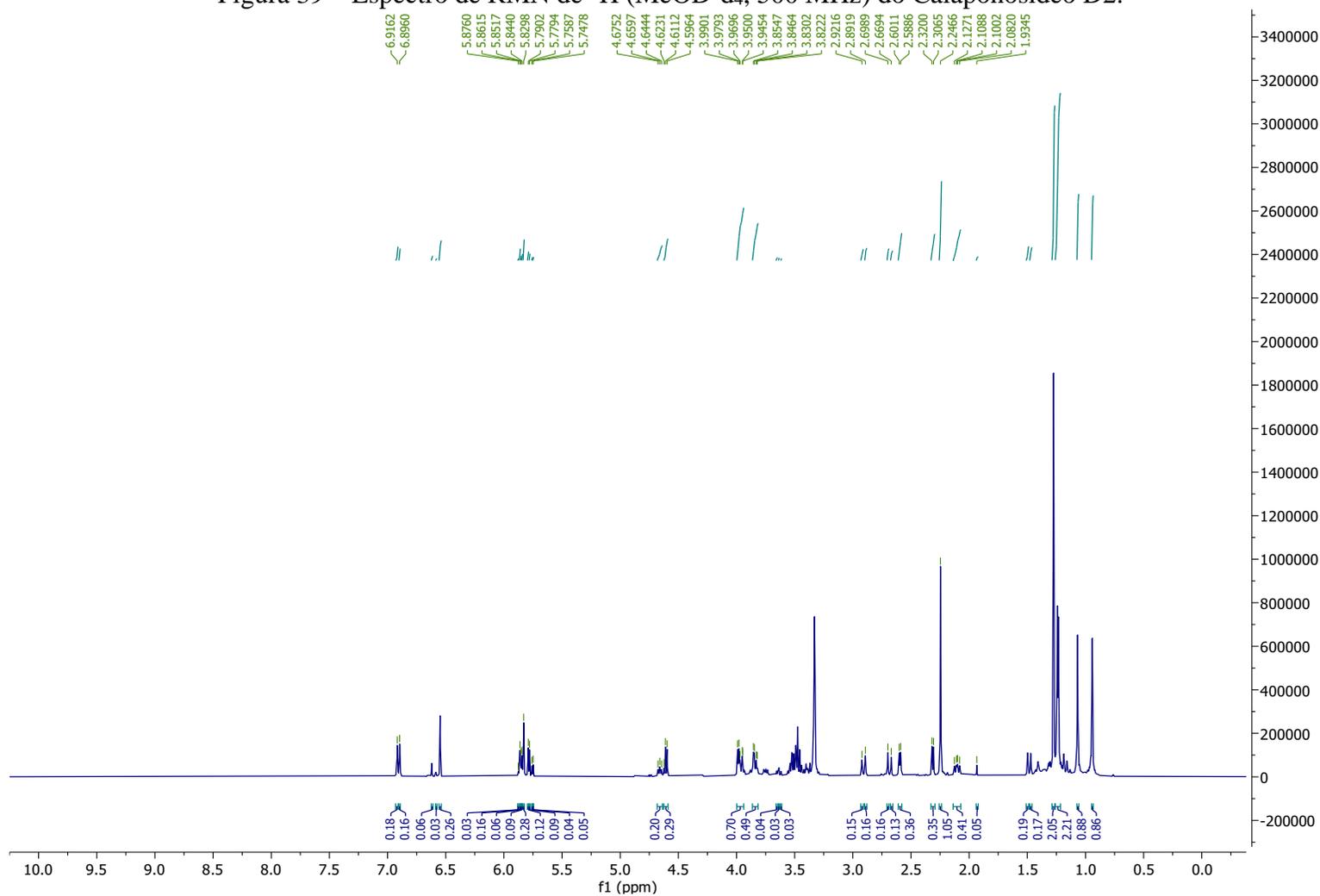
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Tabela 7 – Dados comparativos com a literatura dos espectros de RMN de ^1H do composto caiaponosídeo D2.

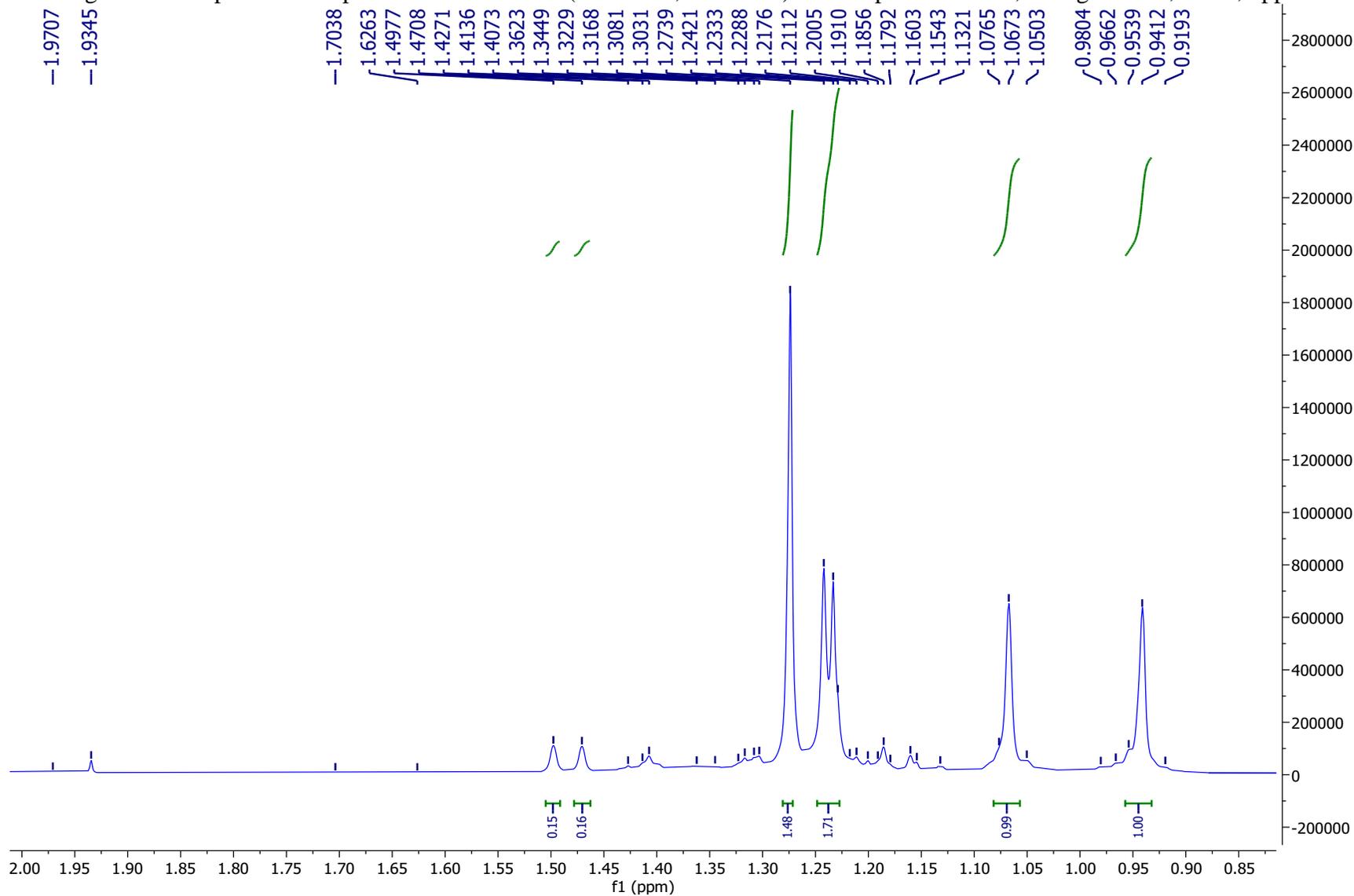
Carbono	caiaponosídeo D2	Referência (Himeno,
	δH	1994b)
		δH
δH (J em Hz)		
1	6,54 (s)	6,53 (s)
6	6,91 (d, 10,1)	6,88 (d, 10)
7	5,88 (d, 6,9)	5,82 (dd, 6, 10)
8	2,58 (d, 6,25)	2,57 (d, 6)
12	2,73 (d, 14,55)	2,67 (d, 15)
	2,90 (d, 14,75)	2,88 (d, 15)
15	1,50 (d, 13,45)	1,47 (d, 14)
	2,10 (dd, 9,05, 13,6)	2,08 (dd, 9, 14)
16	4,65 (m)	4,64 (dd, 7, 9)
17	2,31 (d, 6,7)	2,29 (d, 7)
18	0,92 (s)	0,92 (s)
19	1,23 (s)	1,22 (s)
21	1,21 (s)	1,21 (s)
22	3,96 (m)	3,96 (dd, 1,0 e 6,0)
23	5,77 (dd, 5,4, 15,7)	5,75 (dd, 6, 15)
24	5,86 (d, 6,05)	5,83 (dd, 1, 15)
26	1,27 (s)	1,25 (s)
27	1,27 (s)	1,25 (s)

28	2,24 (s)	2,23 (s)
30	1,05 (s)	1,05 (s)

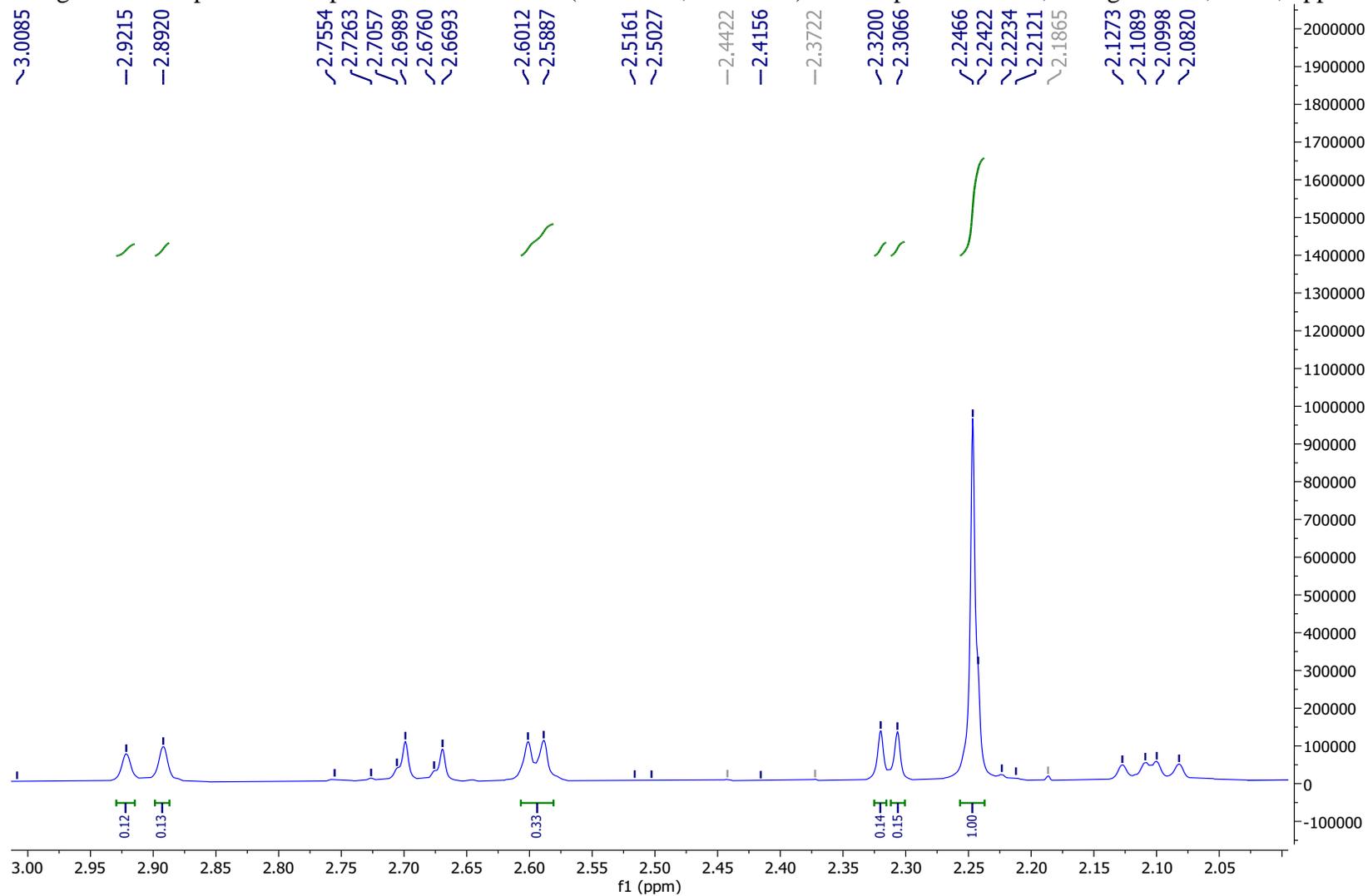
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2.

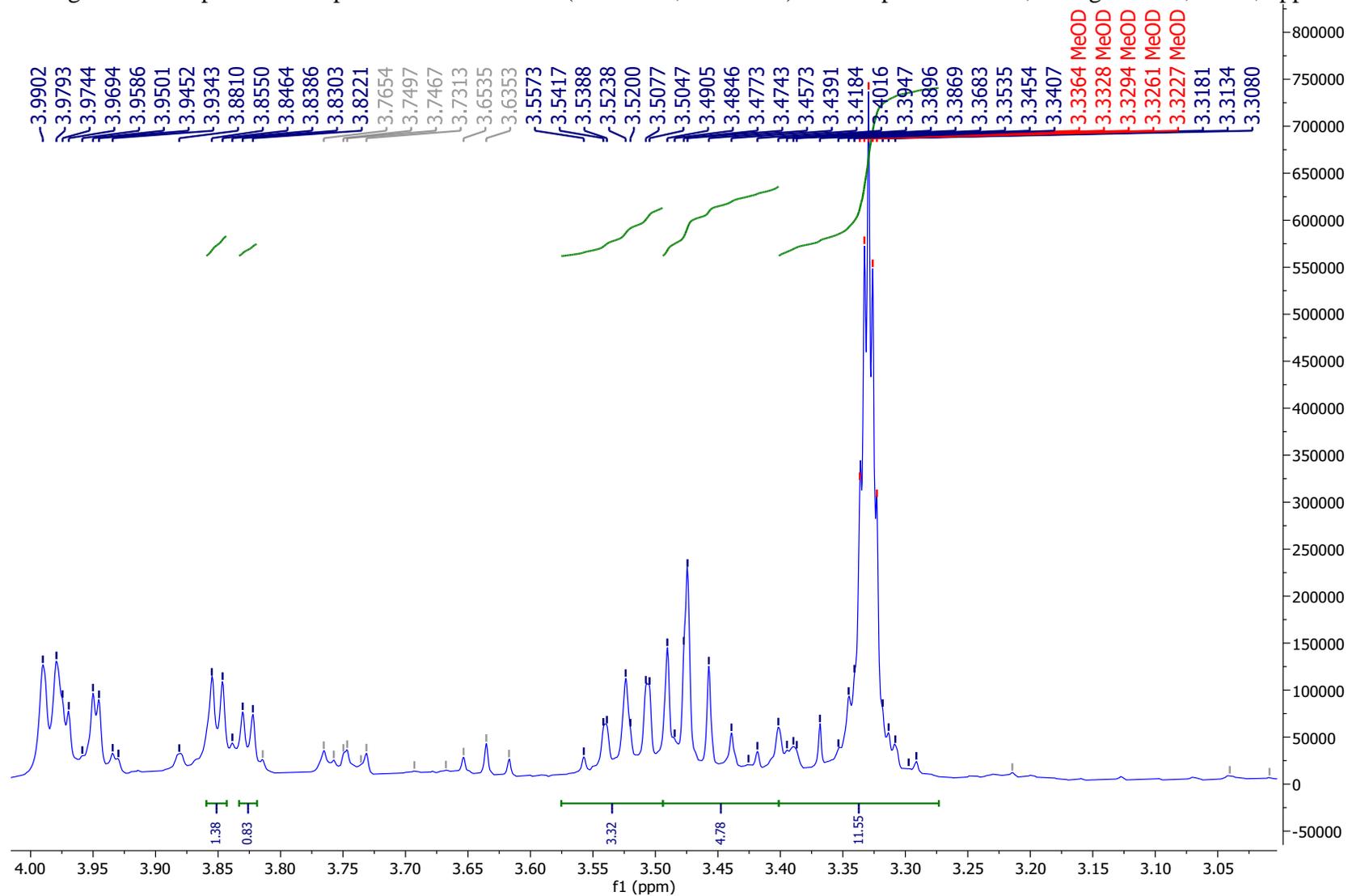
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 0,85 a 2,0 ppm.

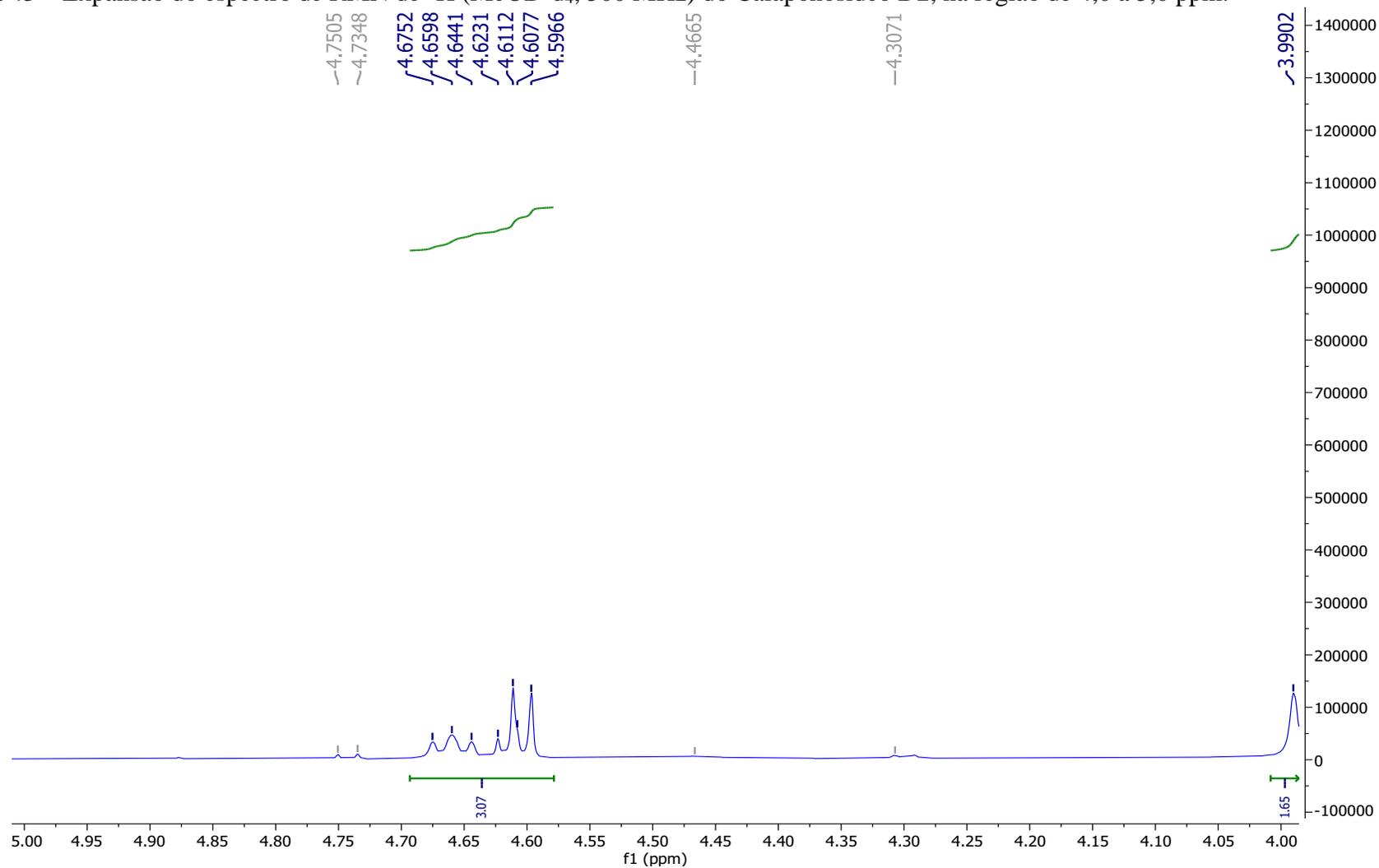
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 2,05 a 3,0 ppm.

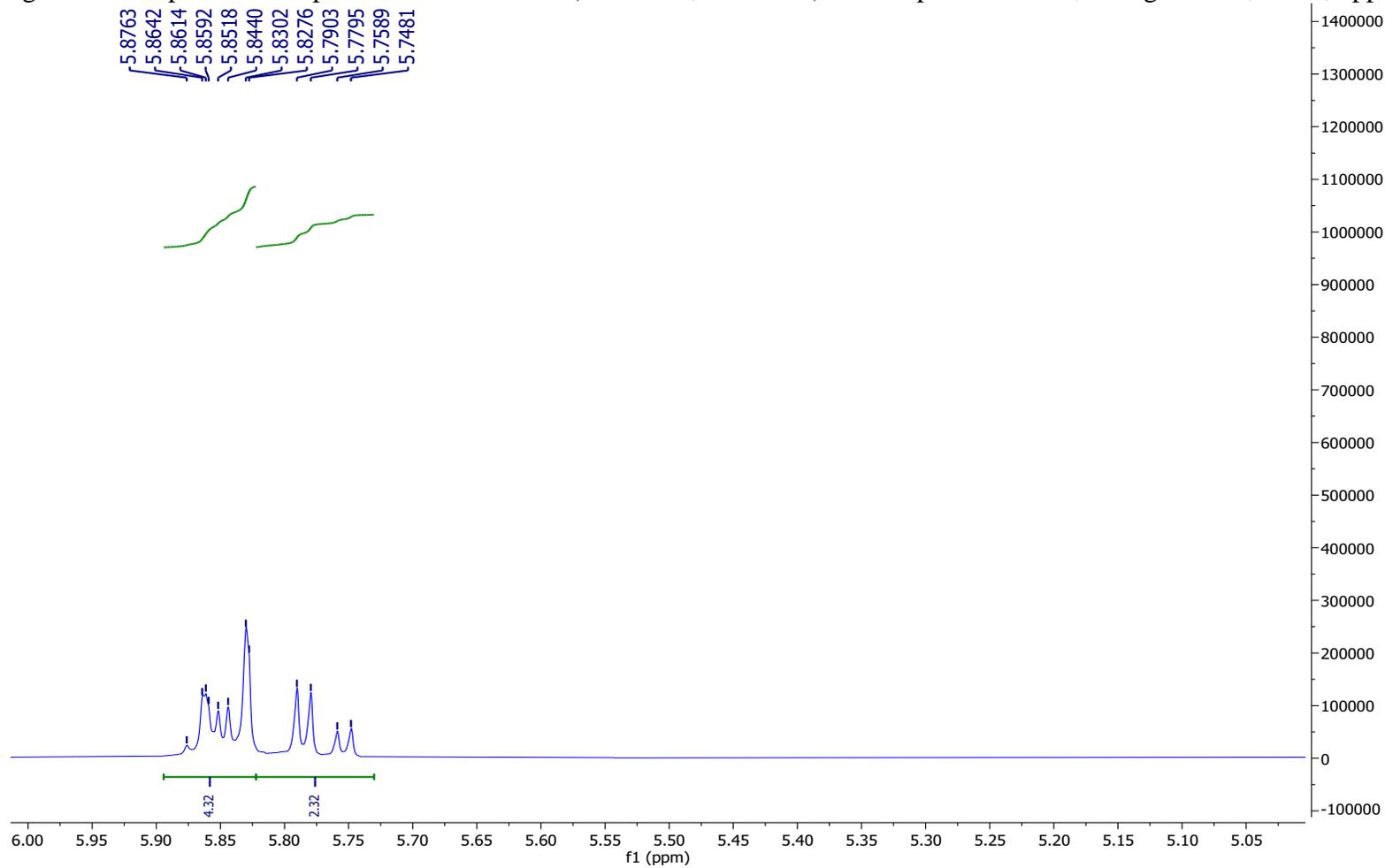
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 42 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 3,05 a 4,0 ppm.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

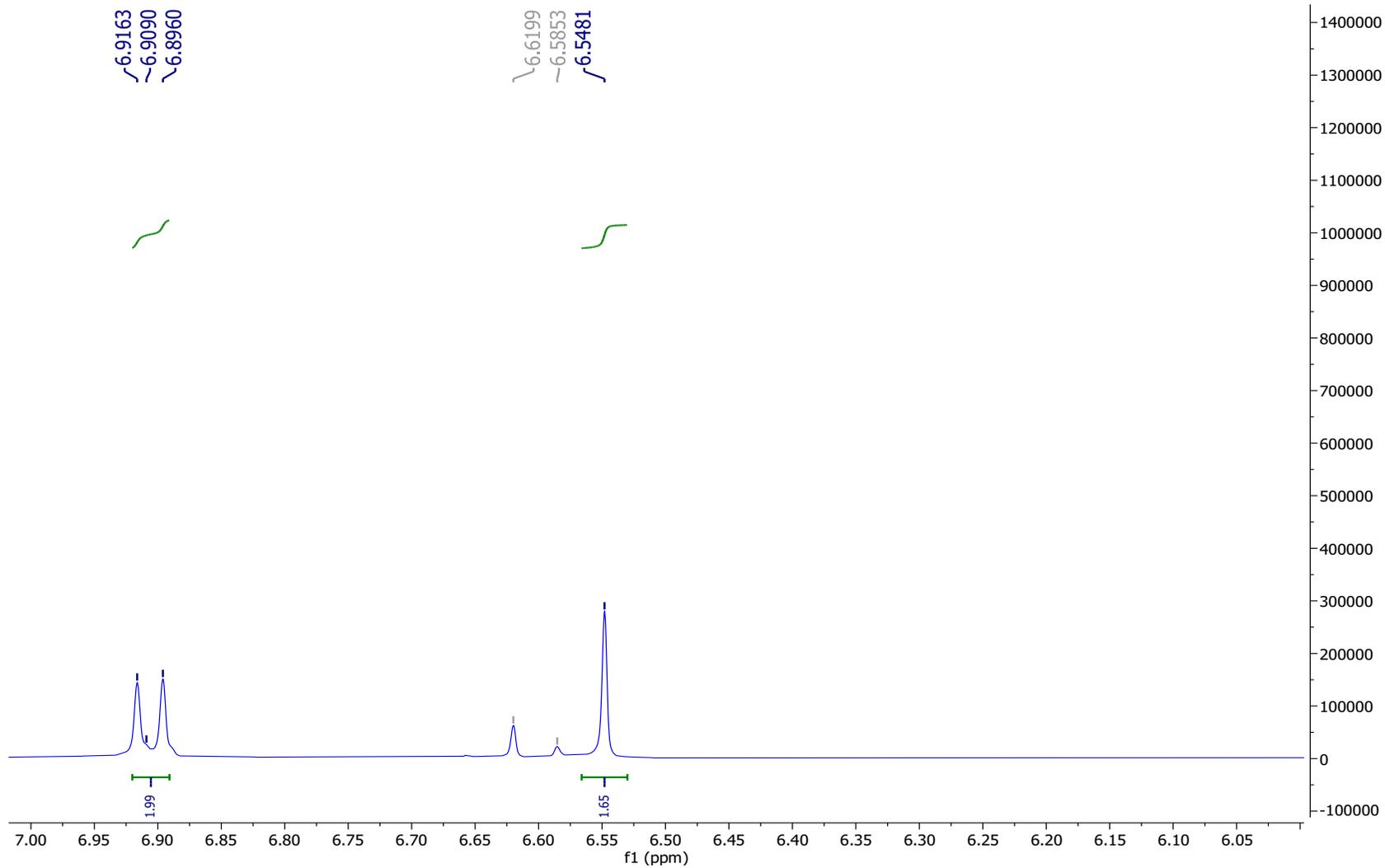
Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 4,0 a 5,0 ppm.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 44 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 5,05 a 6,0 ppm.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 45 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (MeOD- d_4 , 500 MHz) do Caiaponosídeo D2, na região de 6,0 a 7,0 ppm.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

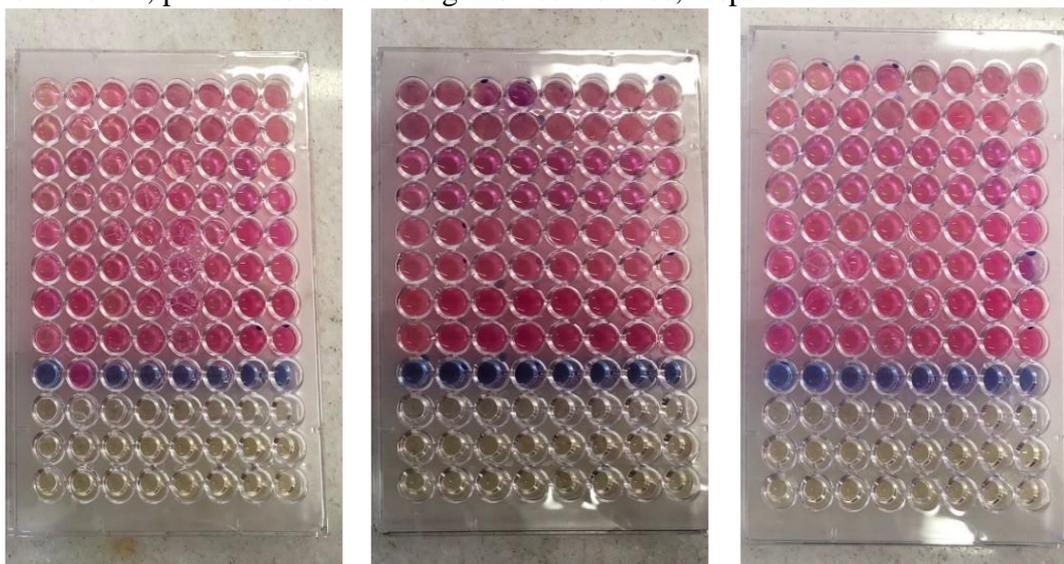
Os caiaponosídeos, cucurbitacinas mais polares que podem diferenciar-se quanto a cadeia lateral, foram relatadas diversas vezes para família Cucurbitaceae, no gênero *Cayaponia*, *Ziziphus* Mill, *Luffa* e *Apodanthera*. Para o gênero *Apodanthera* foi isolado da espécie *Apodanthera congestiflora* o C_{5b} (Krepsky, 2003; Santos, 2018; Silvestre, et al., 2021). No entanto, mesmo sendo relatado para o gênero, o caiaponosídeo D2 foi isolado pela primeira vez para a espécie *A. glaziovii*.

5.2 Atividade Antimicrobiana

O teste de CIM, consta como a menor concentração necessária dos produtos que inibe o crescimento bacteriano e fúngico. Utiliza-se a resazurina como indicador de oxidação-redução, quando ocorre inibição do crescimento microbiano a coloração não altera e continua azul, já quando não há inibição ocorre a redução da resazurina, tornando-a rosa (Palomino, et al., 2002). O método de microdiluição é o mais utilizado para testar a CIM, com revelação por resazurina, são considerados inibidores potentes, extratos que inibem o crescimento com concentração de 100 µg/mL a 500 µg/mL, moderados os que inibem de 501 µg/mL e 1000 µg/mL e fracos aqueles com CIM de 1001 µg/mL a 2000 µg/mL (Freires, et al., 2015).

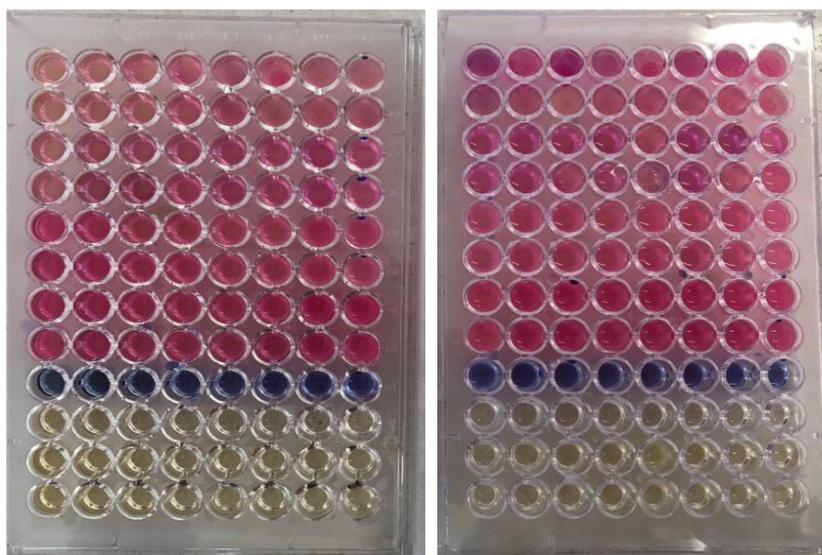
As figuras abaixo (Figura 46 e Figura 47) apontam que todos os poços possuem coloração rosa, com exceção dos poços com controles positivos, ceftriaxona, cefepime, ceftazidima e cefoxitina, os demais indicam que houve redução da resazurina e crescimento dos microorganismos *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (ATCC 33591), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Figura 46 – Resultado negativo no teste de microdiluição para fase acetato de etila, extrato bruto e fase butanólica, para todos os microorganismos testados, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Figura 47 – Resultado negativo no teste de microdiluição para fase diclorometano e fase aquosa, para todos os microorganismos testados, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Para a espécie *A. glaziovii* os resultados obtidos foram negativos tanto para o extrato EHL-Ag1/5 quando para as fases testadas, indicando que não possuem efeito antimicrobianos frente aos micro-organismos testados. Alguns fatores podem implicar nesse obtido, como as características intrínsecas da planta, à composição química de seus constituintes e às propriedades dos microorganismos testados podem influenciar essa atividade. Embora, possa haver compostos ativos em espécies vegetais contra cepas bacterianas e fúngicas, estes podem

estar em concentrações ineficientes (Biswas; Ahmed; Mondal, 2024). Pois, muitas vezes essa atividade é relacionada a concentração do ativo na planta.

A sensibilidade dos microorganismos é influenciada por vários fatores, incluindo a possibilidade de serem intrinsecamente resistentes aos compostos presentes nos vegetais testados. Além disso, o metabolismo dos microorganismos pode neutralizar os efeitos dos compostos testados. Um dos mecanismos intrínsecos dos microorganismos que contribuem para a resistência aos antimicrobianos é o uso de bombas de efluxo, que podem inativar os agentes antimicrobianos, removendo-os do ambiente celular e impedindo sua acumulação, tornando-os ineficazes (Biswas; Ahmed; Mondal, 2024).

Para família Cucurbitaceae, o extrato etanólico dos frutos de *Luffa operculata* Cogn. inibiu o crescimento bacteriano. Concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL foram testadas contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente. No entanto, as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* mostraram-se resistentes ao extrato (Badin; Manaças; Souza, 2023). Esses resultados indicam que, apesar das variações nos métodos e nas diferentes partes vegetais utilizadas, a espécie *Luffa operculata* não apresentou atividade contra as cepas testadas, o que é consistente com os achados observados para *A. glaziovii*, outra espécie da mesma família, que também não demonstrou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

No entanto, este mesmo extrato de *Luffa operculata* Cogn. inibiu o crescimento das cepas de fungos *Candida albicans*, na concentração de 100 mg/mL e 50 mg/mL e *Candida tropicalis* em 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL, diferente de *A. glaziovii* que não mostrou resultados positivos frente ao fungo *Candida albicans* (Badin; Manaças; Souza, 2023).

Quanto ao gênero, o extrato metanólico das cascas de *Apodanthera smilacifolia* testada contra as cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), pelo método de difusão em disco, também não apresentou formação de halo, o que caracteriza ausência de atividade antibacteriana (Ferreira, et al., 2018). Esses achados estão em concordância com os resultados deste estudo, apesar da utilização de técnicas diferentes.

Ainda no gênero *Apodanthera*, o extrato hexânico e fase acetato de etila da espécie *A. congestiflora* apresentou baixa inibição para os microorganismos *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 352), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e *Candida albicans* (UFPEDA 1007), pelo método de microdiluição (Videres, 2017).

Os metabólitos secundários como alcaloides, compostos fenólicos, terpenos e algumas saponinas podem apresentar ação antimicrobiana, mas alguns fatores podem interferir em sua ação, como teor desses metabólitos presentes no extrato e a disponibilidade destes para apresentar inibição do crescimento microbiano (Lima Neto, et al., 2015). Dessa forma, os resultados obtidos nessa pesquisa inviabilizam a utilização dessa espécie frente a uma infecção por estes microrganismos resistentes. No entanto, os mesmos resultados estimulam a continuidade de testes antimicrobianos com substâncias isoladas, em concentração ideal, de *A. glaziovii* considerando o uso de substâncias naturais com potencial terapêutico antimicrobiano.

5.3 Toxicidade em hemácias

A avaliação do potencial dos extratos em provocar danos na membrana eritrocitária foi realizada por meio do ensaio hemolítico, o qual possibilita a investigação da habilidade de um composto em induzir a formação de poros ou ocasionar a ruptura das membranas dos glóbulos vermelhos. Para que um composto seja considerado hemolítico seu CE_{50} deve ser $\leq 200 \mu\text{g/mL}$ (Militão, et al., 2012). Ainda, como definido por Espitia-Baena e colaboradores (2009) o material vegetal não deve superar 10% de danos a membrana eritrocitária. Tradicionalmente, metabólitos como saponinas e taninos são associados a um alto potencial hemolítico. No entanto, os resultados deste estudo revelaram que mesmo o EHL-Ag1/5 sendo rico em saponinas, não apresentou atividade hemolítica.

A concentração hemolítica da maior concentração testada (2000 $\mu\text{g/mL}$) foi de 4,80%, o que indica que uma concentração 10 vezes maior resultou em apenas 5% de hemólise. Considerando que para ser hemolítico um composto deve induzir 50% ou mais de hemólise em 200 $\mu\text{g/mL}$, ou apresentar 10% de hemólise, o que não ocorreu. Além disso, um estudo semelhante realizado com as raízes de *A. congestiflora* também identificou a presença de saponinas no ensaio qualitativo e ausência de atividade hemolítica (Videres, 2017).

Por muito tempo, o potencial citotóxico e hemolítico das saponinas foi atribuído à sua natureza química anfifílica. Correspondente a um componente hidrofóbico porção aglicona (triterpenóide) e a porção hidrofílica relacionada à estrutura glicosídica (Oda, et al., 2000). Entretanto, a porção mais polar das saponinas possui uma influência direta a capacidade hemolítica e citotóxica. Parâmetros como ligações interglicosídicas, tipos de unidades de açúcar e padrões de substituição podem influenciar tanto a atividade citotóxica quanto a hemolítica das saponinas (Chwalek, et al., 2006).

Modificações na estrutura da aglicona também desempenham um papel crucial na atividade hemolítica e citotóxica das saponinas. Estudos com derivados sintéticos da Pulsatilla saponina D revelaram que a dupla ligação no anel C, especialmente entre os carbonos C-12 e C-13, era essencial para essas atividades. Além disso, observou-se que o aumento da lipofilicidade estava correlacionado com um aumento na atividade citotóxica. Esses estudos identificaram um derivado com essa dupla ligação entre os carbonos C-12 e C-13 que não era hemolítico, mas demonstrava potencial citotóxico (Chen, et al., 2018).

Considerando a estrutura das cucurbitacinas e caiaponosídeos, que podem estar presentes no EHL-Ag1/5, com base na família botânica, nos dados dos ensaios fitoquímicos preliminares e nas absorções na CLAE, observa-se que o anel C geralmente não apresenta a dupla ligação associada à atividade citotóxica e hemolítica. Essas características podem explicar a ausência de atividade hemolítica nessas substâncias. Além disso, o tipo de açúcar ligado a essas estruturas também pode exercer influência nesse processo. É importante ressaltar que, mesmo com a ausência de atividade hemolítica, é necessário realizar ensaios de citotoxicidade com o extrato, pois essas atividades não estão necessariamente relacionadas.

5.4 Toxicidade aguda *in vivo*

Para definir o nível de segurança do EHL-Ag1/5 das doses de 2000 mg/kg e 500 mg/kg foi conduzido o ensaio de toxicidade oral aguda. A dose oral de 2000 mg/kg induziu alteração comportamental estimulante, como aumento da ambulação e movimento de autolimpeza, observados nos primeiros 30 minutos e após 60 minutos foram cessados. Também, a administração do EHL-Ag1/5 na concentração de 2000 mg/kg interferiu significativamente no consumo de água e comida (Tabela 8), dados que podem justificar os sinais de toxicidade avaliados nos testes seguintes (hematológicos e bioquímicos), uma vez que os animais consumiram menos água e menos ração comparado ao controle, parâmetro reprodutivo em sinais de toxicidade (Breunig, 2021).

Tabela 8 – Avaliação do consumo alimentar, hídrico e ganho de peso dos grupos controles e tratado com EHL-Ag1/5 durante 14 dias.

Parâmetros	Controle	EHL-Ag1/5 (mg/kg)	
		2,000	500
Consumo de água (mL)	23.09±1.50	19.07±1.04*	24.03±1.86
Consumo de comida (g)	14.11±0.55	10.96±0.97*	13.47±0.83

Ganho de peso (g)	3.51±0.31	3.62±0.25	3.42±0.33
-------------------	-----------	-----------	-----------

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) do controle. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Mesmo que os resultados para dose de 2000 mg/kg não mostrassem registros de óbitos, em razão dos parâmetros bioquímicos e hematológicos observados, o ensaio de toxicidade foi realizado também para dose de 500 mg/kg, uma dose 10 vezes menor foi utilizada no ensaio anti-inflamatório, esta não apresentou alteração nos ensaios mencionados para avaliação toxicológica. A dose de 500 mg/kg não apresentou sinais de alterações comportamentais ou de toxicidade referente a consumo de água e ração observados durante os 14 dias, ou nos sinais bioquímicos e hematológicos. Esses resultados juntamente aos demais inferiram que a dose de 2000 mg/kg apresentou uma leve toxicidade, e a dose de 500 mg/kg se mostrou segura para uso em animais, sem indícios de toxicidade. Ambas as doses avaliadas não afetaram o peso relativo dos órgãos e não promoveu alterações macroscópica no coração, pulmão, fígado, rim, baço ou estômago após os 14 dias de administração do extrato.

5.4.1 Análise Bioquímica e Hematológica

Os valores de ALB, ALT e AST apresentaram um aumento estatisticamente significativo na dose de 2000 mg/kg. Diante dessas alterações observadas, os ensaios foram repetidos com a dose de 500 mg/kg. Esta última não resultou em alterações significativas nos parâmetros bioquímicos após 14 dias de administração do EHL-Ag1/5 (Tabela 9). Esses resultados sugerem uma possível toxicidade associada à dose de 2000 mg/kg, ausente na dose de 500 mg/kg.

Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com extrato do caule de *Apodanthera glaziovii* por 14 dias.

Parâmetros	Extrato (mg/kg)		
	Controle	2,000	500
ALB (g/dL)	20.14±1.62	26.45±1.84*	20.76±1.54
ALT (U/L)	59.36±4.25	70.04±5.18*	60.25±4.34
AST (U/L)	92.05±7.18	115.77±5.39*	90.31±4.90
TP (g/dL)	66.09±5.13	68.29±4.23	65.50±5.68
ALP (IU/L)	11.14±0.42	10.91±0.31	10.77±0.65
GGT (U/L)	10.26±0.65	9.89±0.53	9.71±0.82

Ureia (mg/dL)	0.32±0.06	0.34±0.05	0.36±0.04
CREAT (mg/dL)	7.44±0.59	7.26±0.47	7.31±0.40
CT (mg/dL)	91.03±7.83	96.40±8.26	90.53±5.54
TG (mg/dL)	84.97±5.90	87.64±5.12	83.42±6.65

* Significativamente diferente ($p < 0,05$) do controle. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. ALB: Albumina; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato transaminase; TP: Proteína total; Fosfatase Alcalina; FA: Fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamil transferase; CREAT: Creatinina; CT: Colesterol total; TG: Triglicérides.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Os parâmetros hematológicos foram observados. E como resultado apresentou uma redução para os valores de hematócrito, hemoglobina e HCM, apresentando diferenças estatísticas significativas para dose de 2000 mg/kg, diferente da dose de 500 mg/kg que não mostrou alterações estatisticamente significativas após os 14 dias de administração do EHL-Ag1/5 (Tabela 10). Os resultados indicam que houve uma baixa toxicidade apresentada para dose de 2000 mg/kg que não aconteceu na dose menor de 500 mg/kg.

Tabela 10 – Parâmetros hematológicos do sangue de camundongos tratados com EHL-Ag1/5 por 14 dias.

Parâmetro	Controle	Extrato (mg/kg)	
		2,000	500
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	6.21±0.42	6.07±0.58	6.59±0.41
Hematócrito (%)	31.18±2.63	27.68±2.02*	32.12±2.55
Hemoglobina (g/dL)	13.37±0.40	10.64±0.37*	13.27±0.45
VCM (fL)	38.55±2.95	40.13±3.25	41.51±4.18
HCM (pg)	15.79±0.62	12.88±0.84*	15.10±0.98
CHCM (%)	30.67±2.43	31.02±2.72	32.13±3.06
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7.68±0.56	7.33±0.49	7.09±0.52
Segmentados (%)	63.46±4.87	61.82±3.63	59.66±4.19
Linfócitos (%)	24.55±2.51	25.79±2.49	26.12±2.53
Monócitos (%)	3.42±0.28	3.63±0.31	3.28±0.37

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) do controle. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração média de hemoglobina corpuscular.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Os resultados observados para os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais testados com EHL-Ag1/5 na dose de 2000 mg/kg forneceram dados contundentes de toxicidade, como alterações hepáticas (ALB, ALT, AST), no hematócrito e MCH. Considerando os resultados negativos para o potencial hemolisante do extrato em eritrócitos humanos, pode-se considerar que os efeitos toxicológicos hemáticos identificados no ensaio *in vivo* sugerem que não estão relacionados a alterações das membranas eritrocitárias, mas com algum processo do sistema hematopoiético, podendo está relacionado a produção dessas células.

As alterações bioquímicas relacionadas a atividade hepática também foram mencionadas para a fase diclorometano de *Apodanthera congestiflora*, que mostrou sinais de hepatomegalia no exame histológico macroscópico e aumento no peso relativo do órgão (Silvestre, et al., 2021). Sendo o fígado um dos principais órgãos de metabolização de substâncias químicas, potencialmente os componentes químicos presentes na *A. congestiflora* e *A. glaziovii* podem envolver a cascata metabólica hepática (Hall & Hall, 2021).

A avaliação da toxicidade de uma substância ou extrato vegetal é um parâmetro complexo que não envolve apenas a mortalidade do animal. Dessa forma, sinais de alterações das atividades hepática, renal, cardíaca e outras devem ser avaliados. Este estudo determinou observando os parâmetros hepáticos e hematológicos dos animais, que a dose de 2000 mg/kg apresentou alterações significativas para toxicidade. Sendo necessária mais pesquisas para identificar a via de toxicidade dessas funções metabólicas alteradas e procurar outras possíveis alterações. Dessa forma, o EHL-Ag1/5 encontra-se na categoria 4 descrita pelo regulamento da OECD/OCDE 423, (2001), considerando que a dose de 500 mg/kg não apresentou indícios de toxicidade e demonstra-se segura no ensaio realizado.

5.4.2 Genotoxicidade

5.4.2.1 Micronúcleo

Para avaliar se o EHL-Ag1/5 pode promover alterações nas células do sangue periférico dos camundongos este ensaio foi realizado. Nos achados foi observado que o tratamento com EHL-Ag1/5 não induziu a presença alterações nucleares em eritrócitos em qualquer uma das concentrações avaliadas, mostrando um perfil semelhante ao grupo controle (Tabela 11). Esses resultados implicam que não houve alteração nos genes das células que tiveram contato com a dose testada de 2000 mg/kg.

Tabela 11 – Avaliação da genotoxicidade *in vivo* do EHL-Ag1/5, controle positivo da ciclofosfamida (CPA, i.p.) para determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) de camundongos.

Tratamentos	Tempo de coleta h	MNPCE por animal					MNPCE
		C1	C2	C3	C4	C5	
Controle	24	1	1	0	0	1	0.60 ± 0.04
	48	0	1	1	0	1	0.60 ± 0.04
2.000 mg/kg	24	0	1	0	1	1	0.60 ± 0.04
	48	0	1	1	1	0	0.60 ± 0.04
CPA 50 mg/kg	24	26	28	31	28	26	27.50 ± 2.42*
	48	29	25	27	31	32	28.80 ± 2.30*

No controle negativo, os camundongos receberam solução salina por via oral. *Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). C: Camundongo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

O aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) em animais tratados é um indicador de danos cromossômicos induzidos nas células (Tice, et al., 2000). Foi observada uma indução significativa de micronúcleos (MN) nos eritrócitos dos camundongos expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Momordica charantia* em comparação com seus respectivos grupos controle (Adewumi; Oladele; Taiwo, 2019). Em contraste, os resultados obtidos com *A. glaziovii* não demonstraram alterações, indicando que essa espécie não é genotóxica.

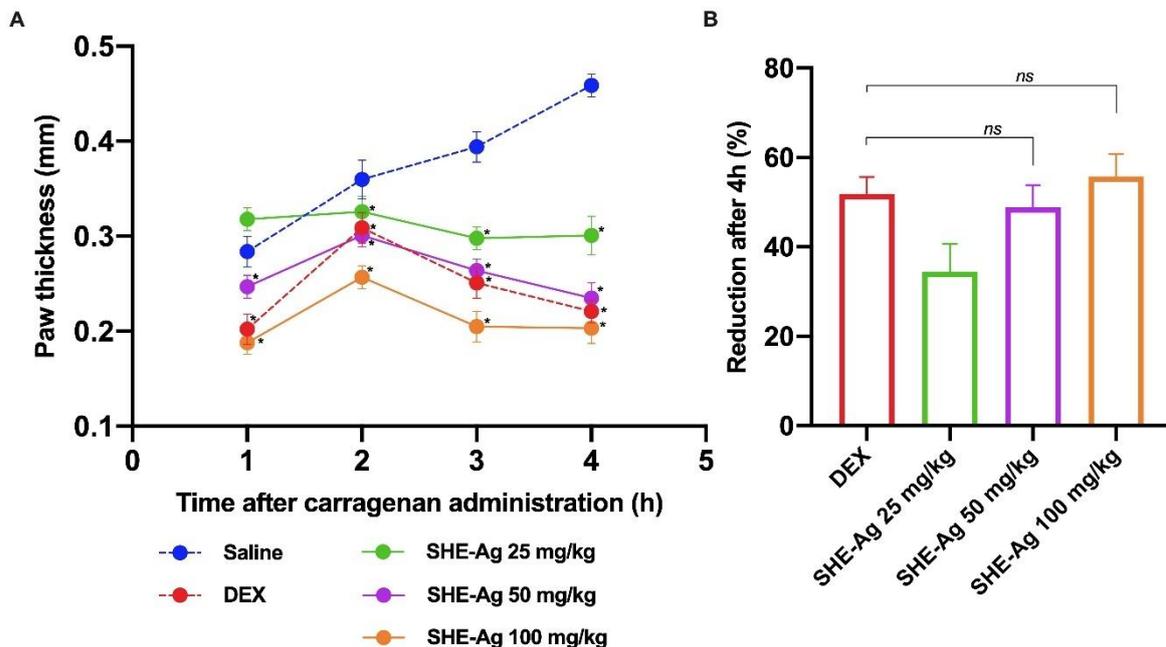
Por outro lado, o melão amargo (*Momordica charantia*), uma espécie da mesma família com uso popular para o controle da diabetes, mostrou indução significativa de MN nos eritrócitos dos camundongos expostos a diferentes concentrações do extrato aquoso. Isso sugere que o melão amargo pode ter efeitos mutagênicos e genotóxicos em modelos animais quando administrado em doses mais elevadas, apesar de seus efeitos hipoglicêmicos no controle da diabetes (Adewumi; Oladele; Taiwo, 2019). Portanto, o perfil genotóxico do melão amargo não justifica seu uso empírico. Esses resultados enfatizam a importância de estudos com produtos naturais para evitar que seu uso popular cause danos significativos, como o uso prolongado de uma espécie com efeitos genotóxico (BARDOLOI; SOREN, 2022).

5.4.3 Atividade anti-inflamatória

5.4.3.1 Edema de pata induzido por carragenina

Para verificar o potencial anti-inflamatório do EHL-Ag1/5 foi realizado o ensaio de edema de pata. Neste ensaio, avalia-se o tecido edemaciado induzido pela carragenina, um agente flogístico, e investiga-se se houve redução desse edema após o tratamento. O tecido edemaciado continuou a progredir após a administração da carragenina, no entanto, os grupos que receberam EHL-Ag1/5 mostraram inchaço com redução significativa nas concentrações testadas de 25 mg/kg (34.42%, $p < 0,001$), 50 mg/kg (48.80%, $p < 0,001$) e 100 mg/kg (55.77%, $p < 0,001$), mostrando ser dose dependente (Figura 48). Todos os grupos tratados com EHL-Ag1/5 apresentaram diferenças estatísticas significativas em comparação com o grupo tratado com solução salina 4 horas após a injeção de carragenina. Os resultados implicam que o EHL-Ag1/5 suprimiu a resposta inflamatória aguda nos camundongos.

Figura 48 – Efeito do EHL-Ag1/5 no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.



Legenda: (A) O edema de pata foi medido a cada hora por até 4 horas usando um paquímetro. (B) A porcentagem de redução do edema após 4 horas da administração de carragenina. O grupo tratado com solução salina foi utilizado como grupo controle. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). ns, não significativo. * $p < 0.05$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Esse estudo utilizou o modelo de indução por carragenina para determinar a atividade terapêutica anti-inflamatória do EHL-Ag1/5. O ensaio por edema de pata nas doses de 25, 50 e

100 mg/kg, estabelecidas de acordo o ensaio de toxicidade aguda, no edema, porém, estudos mais aprofundados da farmacocinética devem ser realizados para compreender o mecanismo. Levantamentos etnofarmacológicos realizados com o gênero *Apodanthera* e a família Cucurbitaceae também ressaltaram efeito anti-inflamatório.

A fase diclorometano de *A. congestiflora* em ensaio de edema de pata semelhante ao deste estudo, apresentou inibição do edema nas doses testadas de maneira que o efeito da fase não é dose-dependente (Silvestre, et al., 2021). No entanto, observaram que o extrato da folha e a fração clorofórmica de *Zehneria scabra* L.F, espécie pertencente a mesma família, Cucurbitaceae, promoveu efeitos anti-inflamatórios no ensaio *in vivo* de edema de pata, se comportando de maneira dose-dependente (Fisseha, et al., 2022).

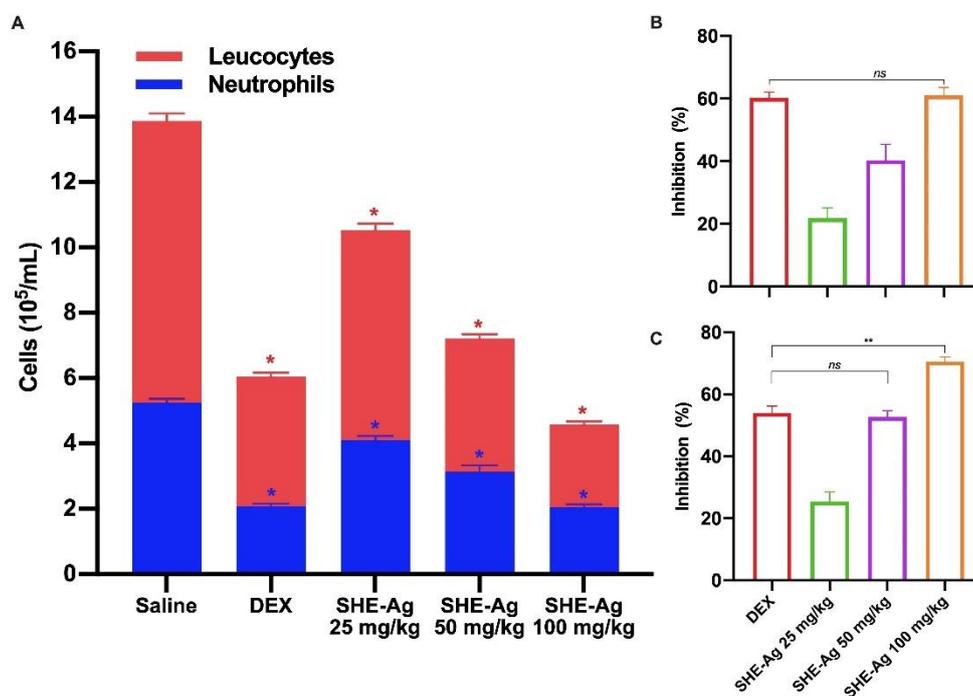
Os levantamentos etnofarmacológicos sobre saponinas sugerem que grande parte de seu mecanismo de ação envolve a redução da resposta imunológica, modulando principalmente citocinas inflamatórias por vias como Nf- κ B, TLR4 e MAPKs (Passos, et al., 2022). Em um estudo com a cucurbitacina E (CuE), conduzido em modelos de condroblastos humanos induzidos por IL-1 β e avaliado por Western blot, observou uma redução dose-dependente na expressão de fatores induzidos por IL-1 β (Wang, et al., 2023). Esses achados, aliados ao resultado anti-inflamatório observado no modelo de edema de pata, sugerem algumas vias pelas quais o EHL-Ag1/5 pode exercer sua atividade.

5.4.3.2 Ensaio de Peritonite

Após as análises dos exsudatos peritoneais, o número total de leucócitos tratados com veículo (solução salina (0,9% v.o.) foi de $5.26 \pm 0.28 \times 10^5$ célula. O controle positivo dexametasona (10 mg/kg) inibiu a migração leucocitária em 60,27% quando comparada ao grupo veículo, sendo representada principalmente pelo influxo de neutrófilos correspondente a 65.65% quando comparada ao veículo. O tratamento inicial com o EHL-Ag1/5 (25, 50 ou 100 mg/kg v.o) antes da administração do agente flogístico resultou na redução no número de leucócitos, com efeito significativo nas três doses, 25 mg/kg (21.86%, $p < 0.05$), 50 mg/kg (40.30%, $p < 0.05$), 100 mg/kg (62.02%, $p < 0.05$).

Nessa perspectiva, a maior migração para cavidade peritoneal entre os leucócitos dos camundongos foi a dos neutrófilos na dose de 100 mg/kg (68.94%, $p < 0.05$). Este estudo demonstrou que a redução da infiltração leucocitária induzida por carragenina, ocorrendo de maneira dose dependente cujo efeito em 100 mg/kg obteve 62,02% (2.05 ± 0.23 , $p < 0.05$) de inibição na migração leucocitária quando comparada ao veículo (Figura 49).

Figura 49– O Efeito do EHL-Ag1/5 na peritonite induzida por carragenina em camundongos.



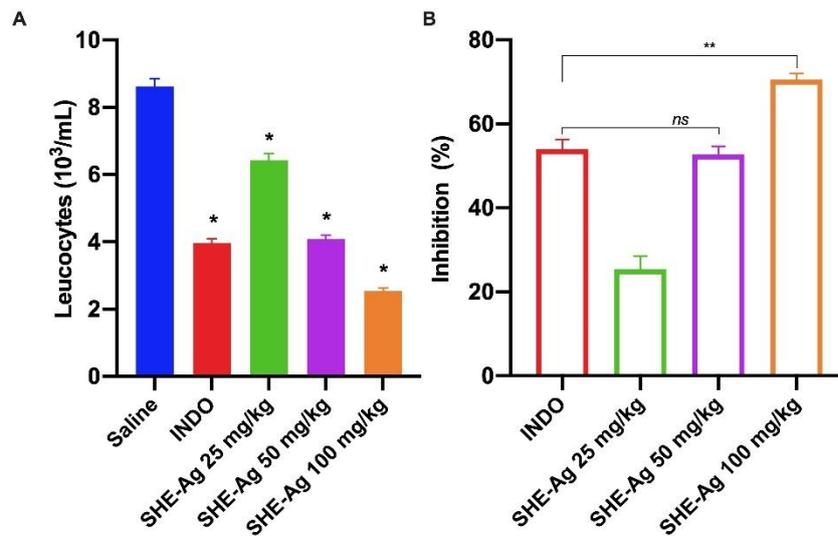
Legenda: (A) Leucócitos totais e neutrófilos no exsudato peritoneal. (B) Percentual de inibição de leucócitos. (C) Percentual de inibição de neutrófilos. Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). ns, não significativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

5.4.3.3 Ensaio de Bolsão de ar

A fim de complementar a avaliação da atividade anti-inflamatória do EHL-Ag1/5 o teste de bolsão de ar foi implementado, sendo avaliado a infiltração de leucócitos no tecido inflamado. Nesse modelo o EHL-Ag1/5 mostrou-se estatisticamente significativo para redução da migração dos leucócitos em todas as doses testadas, sendo uma redução de 25.40, 52.67 e 70.53% para 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente (Figura 50). Também apresentou dose dependente, com resultado positivo principalmente na dose de 100 mg/kg em comparação ao grupo controle negativo. As repercussões desse teste para o extrato hidroetanólico, corresponde a uma redução significativa a migração de leucócitos para a bolsa de ar formada na região dorsal dos camundongos.

Figura 50 – Efeito da administração de EHL-Ag1/5 na migração de leucócitos no modelo de bolsa de ar.



Legenda: (A) Leucócitos totais e neutrófilos 6 horas após a administração de carragenina. (B) Porcentagem de inibição da migração de leucócitos. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). ns, não significativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Os resultados para os ensaios anti-inflamatórios desenvolvidos nesse estudo, permitiram revelar atividade anti-inflamatória significativa para as três doses testadas do EHL-Ag1/5. Ambos os estudos corroboram que a família Cucurbitaceae, o gênero *Apodanthera* e com a contribuição da atual pesquisa, a espécie *A. glaziovii* promovem a inibição dos parâmetros inflamatórios em modelos experimentais de inflamação *in vivo*. Pesquisas aprofundadas das composições químicas e etnofarmacológicas dos compostos presentes em *A. glaziovii* devem ser realizadas para compreender os mecanismos pelos quais esses compostos atribuem contra o processo inflamatório.

6 CONCLUSÃO

A partir dos ensaios desenvolvidos observou-se que as saponinas triterpênicas são os metabólitos em maior presença nesta espécie, com a presença de caiaponosídeos (nor-cucurbitacinas), incluindo o isolamento do composto conhecido como caiaponosídeo D2. Para atividade antimicrobiana, tanto o extrato quando as fases de *Apodanthera glaziovii* não demonstraram atividade frente as cepas testadas. Esta espécie apresentou baixo potencial hemolítico no ensaio de toxicidade hemolítica e em testes de toxicidade *in vitro* pelo ensaio de genotoxicidade, para determinação do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE).

Entretanto, em ensaios de toxicidade *in vivo*, o extrato evidenciou sinais de toxicidade nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, quando foi utilizada a dose de 2000 mg/kg, diferente da dose de 500 mg/kg que não apresentou sinais de toxicidade. Por outro lado, os resultados da atividade anti-inflamatória foram promissores, com reduções significativas do edema de pata, peritonite, e na quantidade de células pró-inflamatórias em testes *in vivo*, como o de bolsão de ar. Esses resultados sugerem que *Apodanthera glaziovii* apresenta potencial anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H. *et al.* Constituents of *Fevillea cordifolia*: New Norcucurbitacin and Cucurbitacin Glycosides. *Journal of Natural Products*, v. 56, n. 9, p. 1506–1519, set. 1993. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.
- ADEWUMI, O. O.; OLADELE, E. O.; TAIWO, I. A. Genotoxicity of *Momordica charantia* Extract in Swiss Albino Mice (*Mus musculus*). v. 3, n. 1, p. 62–68, 2019. Disponível em: <www.nijest.com>.
- ALAMGIR, A. N. M. Progress in Drug Research Series Editor: Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2 Phytochemistry and Bioactive Compounds. Switzerland: *Springer Nature*, 2018. v. 2. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/4857>>.
- BADIN, R. C.; MANAÇAS, L. R. A.; SOUZA, I. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e antitumoral, frente ao sarcoma 180, do extrato bruto de *Luffa operculata* cogn. (cucurbitaceae). *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 27, n. 7, p. 3815, 1 nov. 2023. Disponível em: <<https://openurl.ebsco.com/contentitem/doi:10.25110%2Farqsaude.v27i7.2023-037?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:doi:10.25110%2Farqsaude.v27i7.2023-037>>. Acesso em: 16 abr. 2024.
- BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Universidade Federal do Pará (UFPA)*, 2001.
- BARDOLOI, A.; SOREN, A. D. Genotoxicity induced by medicinal plants. *Bulletin of the National Research Centre*, v. 46, n. 119, dez. 2022.
- BARROS, C. D. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 11, p. 3805–3811, 1 jun. 2010.
- BELGRANO, M. J.; POZNER, R. Sinopsis del género *Apodanthera* (Cucurbitaceae, Coniandreae). *Darwiniana*, v. 5, n. 1, p. 5–50, 2017.
- BISWAS, T.; AHMED, M.; MONDAL, S. Rejuvenating the Potential of Antimicrobials Via Targeted Therapy of Efflux Pumps: The Advent of Phytotherapeutics. In: KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; DEY, A. (Org.). *Medicinal Plants and Antimicrobial Therapies*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 85–105.
- BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários De Plantas Secondary Plant Metabolites. *Revista Agrotecnologia, Ipameri*. [S.l: s.n.], 2020.

- BRASIL.; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E MUDANÇA DO CLIMA. Caatinga. *Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima.*, 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-ecossistemas/ecossistemas/biomas/caatinga>>. Acesso em: 28 mar. 2024.
- BREUNIG, L. R. *Avaliação Da Toxicidade Crônica E Reprodutiva Da Oleuropeína (Segmento I) Em Ratos Wistar*. 2021. 1–69 f. Dissertação – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL , Porto Alegre, 2021.
- CAVALCANTE, G. S. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Saline Extract and Lectin-Rich Fraction from *Microgramma vacciniifolia* Rhizome in Mice. *Chemistry and Biodiversity*, v. 18, n. 6, 1 jun. 2021.
- ČERMÁK, V. *et al.* Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *European Journal of Cell Biology*, v. 99, n. 4, p. 151075, 1 maio 2020. Acesso em: 5 abr. 2024.
- CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3583–3589, 2 jun. 2004. Disponível em: <<https://pubs-acsc-org.ez121.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/jf0352632>>. Acesso em: 29 mar. 2024.
- CHEN, Z. *et al.* Cytotoxicity, Hemolytic Toxicity, and Mechanism of Action of Pulsatilla Saponin D and Its Synthetic Derivatives. *J Nat Prod.*, v. 81, n. 3, p. 465–474, 2018a.
- CHEN, Z. *et al.* Cytotoxicity, Hemolytic Toxicity, and Mechanism of Action of Pulsatilla Saponin D and Its Synthetic Derivatives. *J Nat Prod.*, v. 81, n. 3, p. 465–474, 2018b.
- CHOMICKI, G.; SCHAEFER, H.; RENNER, S. S. Origin and domestication of Cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology. *New Phytologist*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. , 1 jun. 2020
- CHWALEK, M. *et al.* Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1760, n. 9, p. 1418–1427, 1 set. 2006. Acesso em: 30 mar. 2024.
- ÇIÇEK, S. S. *Momordica charantia* L.—Diabetes-Related Bioactivities, Quality Control, and Safety Considerations. *Frontiers in Pharmacology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 17 maio 2022
- CLSI/NCCLS, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15° Suplemento Informativo (M100-S15)*. 15° ed. [S.l.: s.n.], 2005. v. 25. Disponível em:

<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf>.

Acesso em: 11 abr. 2024.

DEWICK, P. M. *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. 3. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2008.

ESPITIA-BAENA, J.E.; *et al.* Neglected tropical diseases: Multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against Trypanosoma and Leishmania. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 23, p. 7339–7359, 10 dez. 2009. Acesso em: 16 abr. 2024.

FEHRENBACHER, Jill C.; MCCARSON, Kenneth E. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. *Current Protocols*, v. 1, n. 8, 1 ago. 2021.

FERREIRA, Valeria *et al.* Análise Fitoquímica, Atividades Citotóxica E Antibacteriana Da Casca De *Apodanthera Smilacifolia* Cong. (Cipó-Azogue) Phytochemical Analysis, Citotoxic And Antibacterial Activities Of The Bark Of *Apodanthera Smilacifolia* Cong. (Cipó-Azogue). *South American Journal*, v. 6, n. 1, p. 02–14, 2018.

FISSEHA, N. *et al.* In-vivo Wound Healing and Anti-Inflammatory Activity of the Solvent Fraction of *Zehneria scabra* L.F. Sond (Cucurbitaceae) Leaves. *Journal of Experimental Pharmacology*, v. 14, p. 367–377, 2022.

FONSECA, M. A. *et al.* Geographical distribution and conservation of Cucurbita in Brazil. *Magistra, Cruz das Almas - BA*, v. 27, n. 3/4, p. 432–442, 2015.

FREIRES, I. A. *et al.* Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules*, v. 20, n. 4, p. 7329–7358, 1 abr. 2015.

GOMES-KLEIN, V.L.; *et al.* *Cucurbitaceae in Flora e Funga do Brasil*. . Rio de Janeiro: [s.n.], 2024. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB17036>>. Acesso em: 4 abr. 2024.

GONÇALVES, J. R. *Desvendando A Estrutura Dos Dentes Cucurbitoides Em Espécies De Cucurbitaceae*. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Federal de Educação, Rio Verde-GO, 2019.

GUO, J. *et al.* Phylotranscriptomics in Cucurbitaceae Reveal Multiple Whole-Genome Duplications and Key Morphological and Molecular Innovations. *Molecular Plant*, v. 13, n. 8, p. 1117–1133, 3 ago. 2020.

HALL, J. E.; HALL, M. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 14. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2021.

HIMENO, E.; *et al.* Structures of cayaponosides A, B, C and D, glucosides of new nor-cucurbitacins in the roots of *Cayaponia tayuya*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n. 10, p. 2885–2887, 1992.

- HIMENO, E.; *et al.* Studies on the constituents of the root of *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. III. Structures of cayaponosides, 29-nor-1,2,3,4,5,10-exadehydrocucurbit-6-ene glucosides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 42, n. 11, p. 2370–2372, 1994.
- HUSSAIN, F. *et al.* In vitro and in vivo study of inhibitory potentials of α -glucosidase and acetylcholinesterase and biochemical profiling of *M. charantia* in alloxan-induced diabetic rat models. *Am J Transl Res.* [S.l.: s.n.], 2022. Disponível em: <www.ajtr.org>.
- JI, X.; SHEN, Y.; GUO, X. Isolation, Structures, and Bioactivities of the Polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: A Review. *BioMed Research International*, p. 14, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/6285134>>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- KIM, H. *et al.* Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of mulberry (*Morus alba*) leaves fermented with *Hericium erinaceum* mycelium by solid-state culture. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, v. 40, n. 9, p. 1333–1339, 2011.
- KREPSKY, P. B. Contribuição Para O Desenvolvimento De Método Para Análise Quantitativa De Cucurbitacinas Em *Wilbrandia Ebracteata* Cogn. E *Luffa Operculata* (L.) Cogn., Empregando CLAE E Espectrofotometria No UV. 2003. 112 f. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2003.
- KUSHIRO T.; EBIZUKA, Y. Triterpenes. In: LIU, H. B.; MANDER, L. (Org.). . *Comprehensive Natural Products II*. Boston: Elsevier, 2010. v. 1. p. 673–708.
- LAPA, A.J., *et al.* Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica. *Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais*, p. 144, 2008.
- LI, Y. *et al.* Potential of cucurbitacin as an anticancer drug. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. [S.l.]: Elsevier Masson s.r.l. , 1 dez. 2023
- LI, Z. J. *et al.* Inhibitory effect of cucurbitacin B on imiquimod-induced skin inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 459, n. 4, p. 673–678, 17 abr. 2015.
- LIMA, L. F. P. *Estudos taxonômicos e morfológicos em Cucurbitaceae brasileiras*. 2010. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.
- LIMA NETO, G. A. *et al.* Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 4, p. 1069–1077, 2015.
- LOBO, R. A. A. M. *et al.* Ethnomedicinal plants for veterinary use in gypsy communities of the northeast of Brazil. *Boletim Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y*

- Aromáticas*, v. 19, n. 2, p. 179–187, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.2.11>>.
- MABOU, D. F.; YOSSA, I. B. N. TERPENES : structural classification and biological activities. *Journal Of Pharmacy And Biological Sciences* , v. 16, n. 3, p. 25–40, 2021. Disponível em: <www.Iosrjournals.Org>.
- MACHADO, R. V.; COSTA, M. B. Prospecting phytochemical and biological evaluation of leaves and stem of *Melothria fluminensis* gardner (Cucurbitaceae). *Revista Virtual de Quimica*, v. 11, n. 3, p. 878–892, 2019.
- MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology*, v. 19, n. 4, p. 613–621, abr. 1993. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez121.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/BF00984996>>. Acesso em: 29 mar. 2024.
- MATOS, F.J.A. *Introdução a fitoquímica experimental*. . 3. ed. [S.l: s.n.], 2009.
- MEDA, Aline *et al.* Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, v. 91, n. 3, p. 571–577, jul. 2005.
- MEDEIROS, D. S. *et al.* Plantas medicinais utilizadas no tratamento de problemas bucais no estado da Paraíba, Brasil: uma revisão de literatura. *Arch. Health Invest*, v. 8, n. 9, p. 529–535, 2019.
- MILITÃO, Gardenia C.G. *et al.* In vitro and in vivo anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 12, p. 1479–1487, dez. 2012.
- MINHAS, D.; NIDHAAN, A.; HUSNI, M. E. Recommendations for the Use of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Cardiovascular Disease Risk: Decades Later, Any New Lessons Learned? *Rheumatic diseases clinics of North America*, v. 49, n. 1, p. 179–191, 1 fev. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36424024/>>. Acesso em: 28 mar. 2024.
- MORALES-VELA, K.; PÉREZ-SÁNCHEZ, C.; PADRÓN, J. M. *Antiproliferative activity of Cucurbitaceae species*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://orcid.org/0000-0002-7488->>. , 2019
- MOUDGIL, K. D.; VENKATESHA, S. H. The Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Natural Products to Control Autoimmune Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 95, p. 1–32, 1 jan. 2023.
- MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Therapeutic importance of Cucurbitaceae: A medicinally important family*. *Journal of Ethnopharmacology*. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. , 10 jan. 2022

- NINKUU, V. *et al.* Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 11, 1 jun. 2021.
- NORONHA, J. I.; *et al.* Análise Da Prevalência Da Automedicação Com Anti-Inflamatórios Não Esteroidais Em Uma Drogaria De Espírito Santo Do Pinhal-Sp. *Revista Faculdades do Saber*, v. 06, n. 12, p. 814–822, 2021.
- ODA, K *et al.* Adjuvant and Haemolytic Activities of 47 Saponins Derived from Medicinal and Food Plants. *Biol. Chem*, v. 381, p. 67–74, 2000.
- OECD/OCDE 423. *OECD/OCDE 423 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method INTRODUCTION*. . [S.l: s.n.], 2001.
- OLIVEIRA, A. M. *et al.* Genotoxicity assessment of saline extract from *Pilosocereus gounellei* (Cactaceae) and its chemopreventive effect against cyclophosphamide-induced DNA damage. *Heliyon*, v. 6, n. 4, p. e03811, 1 abr. 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S2405844020306563/fulltext>>. Acesso em: 29 mar. 2024.
- PALMITESSA, O. D. *et al.* First Report on the Occurrence of Cucurbitacins in an Italian Melon Landrace (*Cucumis melo* L.). *Horticulturae*, v. 9, n. 11, p. 1206, 6 nov. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2311-7524/9/11/1206/htm>>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- PALOMINO, J. C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aac>>. Acesso em: 16 abr. 2024.
- PARREIRA, N. S. M.; SILVA, P. V.;; Rodrigues, V. R. Automedicação Prolongada De Corticoides: Riscos E Motivações. *Rev. Cient. ITPAC Porto*, v. 1, n. 1, p. 1–11, dez. 2021.
- PASSOS, F. R. S. *et al.* Anti-inflammatory and modulatory effects of steroidal saponins and sapogenins on cytokines: A review of pre-clinical research. *Phytomedicine*, v. 96, 1 fev. 2022.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotec. Biodivers.*, v. 3, p. 146–152, 2012.
- PINTO, Danielle S *et al.* Antibacterial and Hemolytic Activities from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). *Anti-Infective Agents*, v. 10, p. 1–5, 2012.
- PRADO, V. M. J. P. *Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para discriminação de chás de genótipos de Lippia gracilis Schauer através de cromatogramas fingerprint combinados com análises quimiométricas*. 2012. 95 f. Mestrado – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão – Sergipe, 2012. . Acesso em: 15 abr. 2024.

- QING, Z. *et al.* Identification of seven undescribed cucurbitacins in *Cucumis sativus* (cucumber) and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, v. 197, p. 113123, 1 maio 2022. Acesso em: 4 abr. 2024.
- RAHMATULLAH, M. *et al.* An ethnomedicinal survey of cucurbitaceae family plants used in the folk medicinal practices of Bangladesh 1. *Chronicles of Young Scientists*, v. 3, n. 3, p. 212–222, 2012.
- RANA, S.; SINGH, S.; BISHT, A. S. *Digitalis Purpurea L: An Overview On Important Medicinal Plant*. India: Advances in Agriculture For Doubling Farmers' Income, 2022. v. 2. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/b23017-19/digitalis-purpurea-foxglove-plant-tina-vedanshi-pal-manu-pant>>. Acesso em: 5 abr. 2024.
- RIBAS, Camila M. *et al.* Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: Evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 103, n. 1, p. 43–47, jul. 2008.
- ROLNIK, A.; OLAS, B. Vegetables from the Cucurbitaceae family and their products: Positive effect on human health. *Nutrition*, v. 78, p. 110788, 1 out. 2020. Acesso em: 30 mar. 2024.
- ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). *Rev. Bras. Pl. Med*, n. 1, p. 31–42, 2010.
- SAMUEL, A. Cucurbitacins and its Anticancer property: A Review. *Himalayan Journal of Health Sciences*, p. 17–23, 20 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.hjhs.co.in/index.php/hjhs/article/view/46>>. Acesso em: 9 abr. 2024.
- SANTOS, C. H. C. *Metabólitos secundários e avaliação de atividades biológicas de Solmatra brasiliensis (Cogn.) Baill. (Cucurbitaceae) e espécies do gênero Ziziphus Mill. (Rhamnaceae)*. 2018a. Tese – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.
- SANTOS, C. H. C. *Metabólitos secundários e avaliação de atividades biológicas de Solmatra brasiliensis (Cogn.) Baill. (Cucurbitaceae) e espécies do gênero Ziziphus Mill. (Rhamnaceae)*. . Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro : [s.n.], 2018b.
- SEDGWICK, A. D; LEES, P. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents and Actions*, v. 18, n. 4, 1986. Acesso em: 29 mar. 2024.
- SHYAULA, S. L.; MANANDHAR, M. D. *Manandhar / Comprehensive Insights in Vegetables of Nepal 235*. [S.l: s.n.], 2021.

- SILVA, J. R.; ALMEIDA, W. A.; LIMA, R. A. Biomás Brasileiros: Um Jogo Educativo Para O Ensino Fundamental Em Uma Escola Pública No Alto Solimões, Amazonas. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, v. 6, n. 1, p. 408–417, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://teste-periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/2338>>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- SILVESTRE, G. F. G.; LUCENA, R. P.; SILVA, H. A. Cucurbitacins and the Immune System: Update in Research on Anti-inflammatory, Antioxidant, and Immunomodulatory Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry*, v. 29, n. 21, p. 3774–3789, 18 jan. 2022. Acesso em: 28 mar. 2024.
- SILVESTRE, G. F.G. *et al.* Anti-tumor and anti-inflammatory activity *in vivo* of apodanthera congestiflora cogn. (cucurbitaceae). *Pharmaceutics*, v. 13, n. 5, 2021.
- TAI, FOONG WAY DAVID; MCALINDON, MARK E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, v. 21, n. 2, p. 131–134, 1 mar. 2021.
- TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. 2000, [S.l.: s.n.], 2000. p. 206–221.
- VALDUGA, E. *Caracterização morfológica e análise de compostos bioativos em acessos de variedades crioulas de Cucurbitaceae*. 2017. Dissertação – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1069180/1/RosaLiaDissertacaoEduardoValdugaIncluido.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- VIDERES, L C C A. *Apodanthera congestiflora e Myracrodruon urundeuva: Investigação das propriedades biológicas em preparações brutas e produtos isolados*. 2017. Tese – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2017.
- VILAR, C. J.; CARVALHO, M. C.; FURTADO, C. M. *Effects Of The Aqueous Extracts Of Plants Of The Genera Apodanthera (Cucurbitaceae) And Jatropha (Euphorbiaceae) On The Lethality Of The Venom Of Bothrops Jararaca (Serpentes, Viperidae)*. SE. São Cristóvão, SE: [s.n.], 2007.
- WANG, L. *et al.* Cucurbitacin E reduces IL-1 β -induced inflammation and cartilage degeneration by inhibiting the PI3K/Akt pathway in osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Translational Medicine*, v. 21, n. 1, 1 dez. 2023.
- WIJESEKERA, K.; DISSANAYAKE, A. S. *Chemistry of Natural Products: Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants*. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2022.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the 'Rat as an Assay for Antiinflammatory Dkugp. *Merck Znstitute for Therapeutic Research*, v. 111, p. 544–547, 1972.

YIBLET, Y. Overview of Cucurbitaceae Families. *Biological and Abiotic Stress in Cucurbitaceae Crops*. [S.l.]: IntechOpen, 2023. .

ZAMUZ, S. *et al.* *Citrullus lanatus* as source of bioactive components: An up-to-date review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 111, p. 208–222, 1 maio 2021. Acesso em: 4 abr. 2024.

ZAPPI, Daniela C. *et al.* Apodanthera Arn. *Reflora*, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 1 out. 2015.

Disponível em:

<https://reflora.jbrj.gov.br/consulta/?grupo=6&familia=17036&genero=Apodanthera&especie=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo= TODOS&origem= TODOS®iao=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&estado=QUALQUER&domFitogeograficos=QUALQUER&vegetacao= TODOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca= TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica&pagina=1#CondicaoTaxonCP>. Acesso em: 5 abr. 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Comparative transcriptome analysis and identification of candidate genes involved in cucurbitacin IIa biosynthesis in *Hemsleya macrosperma*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 185, p. 314–324, 15 ago. 2022. Acesso em: 9 abr. 2024.

Article

Apodanthera glaziovii (Cucurbitaceae) Shows Strong Anti-Inflammatory Activity in Murine Models of Acute Inflammation

Maria Lorena de Oliveira Andrade ¹, Pedro Artur Ferreira Marinho ², Alisson Macário de Oliveira ², Thalisson Amorim de Souza ³, Samuel Paulo Cibulski ¹ and Harley da Silva Alves ^{1,*}

- ¹ Center of Biological and Health Sciences, Phytochemistry Laboratory, Post-Graduation Program in Pharmaceuticals Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil; maria.lorena.oliveira.andrade@aluno.uepb.edu.br (M.L.d.O.A.); cibulski@servidor.uepb.edu.br (S.P.C.)
- ² Center of Biological and Health Sciences, Pharmacological Analysis Laboratory, Post-Graduation Program in Pharmaceuticals Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil; pedro.marinho@aluno.uepb.edu.br (P.A.F.M.); alissonmacario@servidor.uepb.edu.br (A.M.d.O.)
- ³ Multi-User Characterization and Analysis Laboratory, Research Institute for Drugs and Medicines (IpeFarM), Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059-900, Brazil; thalisson.amorim@ltf.ufpb.br
- * Correspondence: author: harley@servidor.uepb.edu.br; Tel.: +55-83-3315-3526



Citation: Andrade, M.L.d.O.; Marinho, P.A.F.; Oliveira, A.M.d.; Souza, T.A.d.; Cibulski, S.P.; Alves,

H.d.S. *Apodanthera glaziovii*

(Cucurbitaceae) Shows Strong

Anti-Inflammatory Activity in Murine Models of Acute Inflammation.

Pharmaceutics **2024**, *16*, 1298.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101298>

Academic Editors: Katarina Šavikin and Aleksandra A. Jovanovic

Received: 2 September 2024

Revised: 27 September 2024

Accepted: 2 October 2024



Published: 4 October 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Abstract: Background/objectives: *Apodanthera glaziovii* is an endemic species from the semi-arid Brazilian, which has limited toxicological and pharmacological studies. This species belongs to a well-studied family known for its bioactive compounds used in treating inflammatory. This study aimed to identify secondary metabolites in the stems from *A. glaziovii*, evaluate toxicity, and investigate the anti-inflammatory potential of the stem hydroalcoholic extract (SHE-Ag). **Methods:** qualitative and quantitative assays were employed to identify secondary metabolites, along with chromatographic analyses and ¹H and ¹³C NMR. Toxicity was assessed through in vitro hemolytic toxicity, in vivo genotoxicity, and oral acute toxicity tests before the pharmacological assays were conducted. **Results:** phytochemical screening, HPLC and NMR analyses suggested the presence of saponins of the norcucurbitacin class. The SHE-Ag exhibited no hemolytic activity and no mutagenic potential. However, in vivo toxicity at a dose of 2000 mg/kg revealed hematological and biochemical alterations, while the 500 mg/kg dose was safe. In the anti-inflammatory assays, SHE-Ag at 100 mg/kg reduced paw edema by 55.8%, and leukocyte and neutrophil migration by 62% and 68% in the peritonitis model, respectively; inflammatory cell migration by 70% in the air pouch model, outperforming indomethacin, which showed a 54% reduction. **Conclusions:** these findings indicate that SHE-Ag is rich in saponins, confirmed through HPLC and ¹H and ¹³C NMR analyses. The SHE-Ag also demonstrated low toxicity. The inflammation models used showed a reduction in inflammation,

