



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PABLO DE ATAIDE FERREIRA**

**Otimização da Obtenção da Associação em Dose Fixa do Sulfato de  
Hidroxicloquina e o Liófilo de *Baccharis trimera* (LESS.) DC.: Avaliação da  
Toxicidade Experimental Aguda e Crônica**

Recife,  
2017.

PABLO DE ATAIDE FERREIRA

**Otimização da Obtenção da Associação em Dose Fixa do Sulfato de Hidroxicloquina e o Liófilo de *Baccharis trimera* (LESS.) DC.: Avaliação da Toxicidade Experimental Aguda e Crônica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Linha de Pesquisa: Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Bernadete S. Maia

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife,  
2017.

PABLO DE ATAIDE FERREIRA

**Otimização da Obtenção da Associação em Dose Fixa do Sulfato de Hidroxicloquina e o Liófilo de *Baccharis trimera* (LESS.) DC.: Avaliação da Toxicidade Experimental Aguda e Crônica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Bernadete Sousa Maia (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivone Antônia de Souza (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>ª</sup>. Lariza Darlene Santos Alves (Examinador externo)

Natusense Indústria Cosmética Ltda

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Monica Felts de La Roca Soares (Suplente)

Universidade Federal de Pernambuco

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete Sousa Maia e ao meu co-orientador Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto que possibilitaram o desenvolvimento e concretização deste trabalho. Pela confiança, amizade e ensinamentos durante toda essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, pela colaboração e apoio, imprescindíveis para o desenvolvimento e finalização deste trabalho, juntamente ao Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais – NEPLAME. Meu muito obrigado à todos.

Ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos – LTM, pela oportunidade de realizar este trabalho e a todos os seus integrantes pela aprendizagem diária.

Aos companheiros de trabalho, Leslie Ferraz, Ricardo Tadeu, Sarah Raquel Gomes de Lima Saraiva, Juliane Cabral Silva, Ana Paula de Oliveira e Tâmara Coimbra Diniz.

Aos professores Dr. Ricardo Santana Lima, Dr. Luciano Augusto de Oliveira Ribeiro e Dr. Julianeli Tolentino (Reitor da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF), pelo grande apoio e colaboração.

Ao meu Pai, Francisco de Assis Ferreira, pelo amor, dedicação e ensinamentos. Muito Obrigado! Se não fosse você, não seria o homem que sou. Essa conquista é sua.

A minha mãe, Rosa Maria de Ataíde Ferreira, por seu amor, por suas palavras de estímulo, suas preocupações, e seu apoio incondicional. Mãe, muito obrigado por tudo.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos Afonso Gustavo de Ataíde Ferreira e Raphael de Ataíde Ferreira pelo apoio, companheirismo, amizade e amor.

À Nerilin Trajano, secretária do PPGCF, por sempre ter me ajudado e ter sido tão solícita e compreensiva. Muito Obrigado!

À Fundação e Amparo a a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pelo suporte financeiro.

Ao PPGCF/UFPE e seu corpo docente, pela enorme contribuição na minha formação.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O sulfato de Hidroxicloroquina (SHC) integra a relação de fármacos recomendados no consenso brasileiro de doenças reumáticas. Associação em Dose Fixa (ADF) é uma combinação de dois ou mais insumos farmacêuticos ativos em uma razão fixa de doses em uma mesma forma farmacêutica. Por associar atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e antiartrítica, *B. trimera* (Less.) DC, popularmente conhecida como carqueja, é um material vegetal promissor para compor uma ADF com a SHC, como alternativa inovadora para o tratamento da artrite reumatoide. Comodidade para o paciente e conseqüentemente, incremento na adesão ao tratamento são razões aventadas para estimular desenvolvimento de uma ADF. Este trabalho teve como objetivo otimizar a obtenção desta em ADF em escala piloto, assim como avaliar a toxicidade aguda e crônica da ADF em modelos experimentais. Foram desenvolvidos também, estudos acerca dos modelos de indução de artrite em roedores. Os resultados para o lote-piloto obtido, demonstraram estar de acordo com os resultados descritos na literatura. Mediante o estudo de toxicidade aguda, foi possível determinação da DL<sub>50</sub> da SHC na ADF, obtendo-se um valor de 762,34 mg/Kg. O estudo de toxicidade crônica da dose de 150-4,2 mg/Kg (SHC-*B. trimera*) respectivamente, não demonstrou sinais de toxicidade. Em relação ao modelo experimental de indução artrite em camundongos, não foi observada diferença estatística significativa em relação ao índice de artrite apresentado pelo grupo CIA (artrite induzida por cartilagem) e seu grupo controle. Em relação ao modelo de indução de artrite em ratos Wistar, os resultados obtidos demonstraram não haver homogeneidade na indução, pois observou-se um elevado desvio-padrão intra-grupo, assim como houve diferença significativa entre vários grupos de animais induzidos. Portanto, conclui-se que os protocolos experimentais de indução de artrite são de caráter complexo, visto que vários fatores são determinantes na responsividade dos animais frente aos modelos descritos na literatura. O lote-piloto obtido demonstrou estar de acordo com as normas vigentes, conferindo à ADF confiabilidade necessária para o desenvolvimento de ensaios em animais.

**Palavras-chave:** Hidroxicloroquina, *Baccharis trimera*, carqueja, associação em dose fixa, toxicidade, modelo experimental de artrite, artrite reumatoide, adjuvante de Freund.

## ABSTRACT

Hydroxychloroquine sulfate (HCS) integrates the recommended drug ratio in the Brazilian consensus of rheumatic diseases. Fixed Dose Association (FDA) is a combination of two or more active pharmaceutical ingredients in a fixed dose ratio in the same pharmaceutical form. By combining antiinflammatory, immunomodulatory and antiarthritic activity, *B. trimera* (Less.) DC, popularly known as carqueja, is a promising plant material to compose an FDA with HCS as an innovative alternative for the treatment of rheumatoid arthritis. Comfort for the patient and consequently, increased adherence to treatment are reasons to encourage the development of an FDA. The objective of this study was to optimize its use in pilot-scale FDA, as well as to evaluate the acute and chronic toxicity of FDA in experimental models. Studies on the models of rodent arthritis induction have also been developed. The results for the pilot-scale obtained were in agreement with the results described in the literature. Through the acute toxicity study, it was possible to determine the LD50 of SHC in the ADF, obtaining a value of 762.34 mg / kg. The chronic toxicity study at the dose of 150-4.2 mg / kg (SHC-*B. trimera*) respectively showed no signs of toxicity. Regarding the experimental model of arthritis induction in mice, no significant statistical difference was observed in relation to the arthritis index presented by the CIA group (collagen-induced arthritis) and its control group. Regarding the model of induction of arthritis in Wistar rats, the results obtained showed no homogeneity in the induction, since a high intra-group standard deviation was observed, as well as there was a significant difference between several groups of induced animals. Therefore, it is concluded that the experimental protocols of induction of arthritis are complex, since several factors are determinant in the responsiveness of the animals to the models described in the literature. The pilot-lot obtained proved to be in compliance with the current standards, giving the FDA reliability necessary for the development of animal tests.

**Keywords:** Hydroxychloroquine, *Baccharis trimera*, fixed-dose combination, an experimental model of arthritis, rheumatoid arthritis, arthritis collagen-induced, Freund adjuvant.

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2.0 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo específico.....	14
<b>3.0 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
3.1 Artrite reumatoide.....	16
3.2 <i>Baccharis trimera</i> (carqueja).....	19
3.3 Hidroxicloroquina.....	26
3.4 Estudos de toxicidade pré-clínica.....	35
<b>4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 Otimização da associação em dose fixa do sulfato de Hidroxicloroquina e o líofilo de <i>Baccharis trimera</i> .....	38
4.2 Toxicidade aguda e determinação da DL <sub>50</sub> absoluta.....	46
4.3 Avaliação da toxicidade crônica.....	47
4.4 Modelos experimentais de artrite reumatoide.....	49
4.5 Obtenção da forma farmacêutica cápsula.....	51
4.6 Análise estatística.....	52
<b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
5.1 Otimização da associação em dose fixa do sulfato de Hidroxicloroquina e o líofilo de <i>Baccharis trimera</i> .....	54
5.2 Toxicidade aguda e determinação da DL <sub>50</sub> absoluta.....	68
5.3 Toxicidade crônica.....	69
5.4 Avaliação do desenvolvimento de indução de artrite experimental em roedores.....	77
5.5 Obtenção da forma farmacêutica.....	85
<b>6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>87</b>
<b>7.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>8.0 ANEXOS.....</b>	<b>116</b>

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença sistêmica que acomete o tecido conjuntivo e as alterações provocadas por esta patologia, são predominantes nas articulações diartrodiais e nas estruturas periarticulares. Sua principal manifestação clínica é o processo inflamatório de caráter crônico e deformante da membrana sinovial (CHIARELLO et al., 2005).

O tratamento medicamentoso para artrite reumatoide constituiu a principal despesa no SUS, com elevado impacto econômico devido ao infliximabe. Este medicamento foi responsável por aproximadamente R\$ 118 milhões dos gastos em 2008, ficando em terceiro lugar dentro os medicamentos que apresentam maior custo na lista dos medicamentos excepcionais (COSTA et. al., 2014).

O sulfato de hidroxicloroquina (SHC) integra a relação de fármacos recomendados no Consenso Brasileiro de Doenças Reumáticas, como a artrite reumatóide, sendo classificada como uma droga modificadora do curso da doença. Possibilitando, inclusive, o tratamento de doenças reumáticas em pacientes gestantes, por não apresentarem efeitos teratogênicos em humanos nas doses recomendadas, além de sua permissão para utilização durante o período de amamentação (LEVY et al., 2005). Este fármaco tem seu uso aprovado pelo FDA para o tratamento de artrite reumatóide, lúpus eritematoso e antimalárico. (CARDOSO, 2006; ANVISA, 2010).

O fator mais preocupante na utilização terapêutica da SHC deve-se ao aparecimento de distúrbios oculares, principalmente as retinopatias que são lesões na retina ocasionadas pelo acúmulo do fármaco nas estruturas pigmentadas do olho, concentrando-se principalmente na retina e na coróide. Bem como o aparecimento de distúrbios gastrointestinais. As alterações retinianas são potencialmente graves e de caráter dose-dependente (GOUVEIA et al., 2007).

A terapia farmacológica da artrite reumatóide varia de acordo com o estágio da doença. No caso da SHC, as doses variam de 250 a 750 mg por dia. (GOUVEIA et al., 2007). Para o controle da dor e do processo inflamatório articular o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) associados ou não a doses baixas de glicocorticóides, são utilizados na terapêutica de base, pois a SHC não possui efeito analgésico e anti-inflamatório, pelo menos primariamente. Apesar da eficácia, o uso prolongado desses fármacos está relacionado a uma grande incidência de efeitos colaterais (BERTOLO et al., 2009).

A OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, tendo em conta que 80% da população mundial

utiliza estas plantas ou preparações destas no que se refere à atenção primária de saúde (ROSA, 2011).

O Brasil destaca-se nesse aspecto por possuir quase um terço da flora mundial representada em dez biomas com uma biodiversidade exuberante, entretanto, o uso de fitomedicamentos ainda não é uma realidade no âmbito do SUS, apesar de todas as vantagens relacionadas. Com o objetivo de contornar esse impasse, o Ministério da Saúde, a partir da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, desenvolve ações com vistas à sua implementação, dentre elas a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (MACEDO; GEMAL, 2009).

Nesta lista, constam 71 espécies vegetais que apresentam potencial para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dentre as plantas divulgadas na RENISUS, encontra-se a *Baccharis trimera* Less, sinóníma de *Baccharis genistelloides* Less, popularmente conhecida como carqueja, umas das espécies mais utilizadas no Brasil (RUIZ et al., 2008).

O infuso aquoso da espécie vegetal em questão teve seu efeito anti-artrítico comprovado em modelo de artrite induzida por colágeno. Essa ação foi atribuída ao seu efeito imunossupressor e anti-inflamatório, também descrito em outro estudo (PAUL et al., 2010) advindo da presença de flavonóides e saponinas, frequentemente relatado em outras plantas que possuem esta mesma atividade. Neste estudo também foi avaliado a citotoxicidade, onde não foi evidenciado nenhum efeito tóxico nos rins, nem no fígado, bem como análises bioquímicas e hematológicas não demonstraram alterações (COELHO et al., 2004).

Por associar atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e antiartrítica a *B. trimera* L. é uma planta promissora para compor uma associação em dose fixa (ADF) com o fármaco hidroxiquina (que possui utilidade consagrada no tratamento da artrite reumatóide), porém, por se tratar de uma alternativa inovadora, não existem estudos científicos que garantam a segurança desta associação.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo otimizar a forma farmacêutica associação em dose fixa (ADF) do fármaco Hidroxiquina e o líofilo de *Baccharis trimera*, e avaliar o efeito da ADF em modelo experimental de toxicidade aguda e crônica, monitorando-se as possíveis alterações toxicológicas geradas por tal associação em roedores.

# OBJETIVOS

---

## 2. Objetivo geral

Obter a associação em dose fixa (ADF) do fármaco Hidroxicloquina (SHC) e o liófilo de *B.trimera* (LB) em escala piloto e avaliar a toxicidade experimental desta associação, objetivando-se propor uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da artrite reumatóide.

### 2.1. Objetivos específicos

- Reproduzir e avaliar a forma farmacêutica (FF) associação em dose fixa (ADF) obtida;
- Avaliar a toxicidade aguda da ADF;
- Determinar a DL<sub>50</sub> da ADF;
- Avaliar a toxicidade crônica da ADF;
- Realizar ensaios preliminares
  - ✓ Avaliar o desenvolvimento de artrite não clínica em camundongos machos isogênicos C57BL/6, em modelo de indução por adjuvante completo de Freund e cartilagem hialina de galinha (CIA);
  - ✓ Avaliar o desenvolvimento de artrite não clínica em modelo de indução por adjuvante completo de Freund (AIA) em ratos Wistar<sup>®</sup> de ambos os sexos;

# REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Artrite reumatóide

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença sistêmica que acomete o tecido conjuntivo e as alterações provocadas por esta patologia, são predominantes nas articulações diartrodiais e nas estruturas periarticulares. Sua principal manifestação clínica é o processo inflamatório de caráter crônico e deformante da membrana sinovial (CHIARELLO et al., 2005).

A AR tem incidência de 0,5 a 1% na população adulta, aumentando para 4,5% nas pessoas na faixa etária dos 55 aos 75 anos. Afeta ambos os sexos, mas tem predomínio sobre as mulheres na proporção de 3:1. No Brasil em 1993 foi realizado estudo em vários centros, e foi constatado que a prevalência da doença variou de 0,2 em Curitiba e 1,0 em Belém (CHIARELLO et al., 2005).

Segundo Rebelatto e Morelli (2005), aproximadamente 1 a 2% da população mundial adulta têm artrite reumatóide, e esta incidência não está relacionada com a raça. Pode acometer pessoas de qualquer idade, sendo mais comum dos 20 aos 45 anos e acomete mais a população urbana que a rural. Atinge indivíduos quando seu potencial de produção está no auge e, as donas de casa, quando os filhos ainda estão sob seus cuidados, ou seja, quando passam por fases importantes da vida.

A etiologia da AR ainda é desconhecida, mas acreditam na possibilidade de ser uma doença multifatorial. Alterações na resposta imunológica em indivíduos predispostos, sem a descoberta dos fatores precipitantes dessa disfunção. Alterações neuroendócrinas, que segundo Rebelatto e Morelli (2005) foi uma teoria aceita após a descoberta da terapêutica com cortisona, mas que hoje é refutada, fatores ambientais e infecciosos estão sendo estudados, porém sem comprovação ainda (CHIARELLO et al., 2005).

A AR compromete primariamente a membrana sinovial, mais semelhante a um processo crônico do que agudo, onde a membrana torna-se edemaciada, hiperemiada e as vilosidades aumentam de volume. Acredita-se que auto-antígeno ainda desconhecido desencadeie esta resposta antígeno-específica na própria sinovia (CHIARELLO et al., 2005; REBELATTO E MORELLI, 2005). Segundo Wells e colaboradores (2006), a *American Rheumatism Association* definiu critérios para determinação do diagnóstico de artrite reumatóide, onde quatro das seguintes condições estabelecidas pela associação devem estar presentes para se estabelecer um diagnóstico de artrite reumatóide: rigidez matinal, artrite em três ou mais áreas

articulares, artrite nas articulações da mão, artrite simétrica, nódulos reumatóides, fator reumatóide alterações radiológicas.

O tratamento da AR para ser mais efetivo, deve ser associado a um diagnóstico precoce e intervenção adequada na tentativa de impedir o dano articular irreversível. O objetivo do tratamento é aliviar as dores, melhorar ou manter a capacidade funcional, prevenir as incapacidades, adaptar o paciente ao meio e melhorar sua qualidade de vida (REBELATTO E MORELLI, 2005).

Nos casos de quadro grave da doença, os pacientes podem ser beneficiados com procedimentos cirúrgicos tais como a tenossinovectomia, o reparo tendinoso e a colocação de próteses articulares. É também muito importante que a paciente seja informado a respeito da doença e das vantagens e limitações da terapia farmacológica (WELLS et al., 2006).

A terapia farmacológica envolve as drogas modificadoras do curso da doença (DMCD), anti-inflamatórios não esteróides (AINES), corticosteróides, opióides e agentes biológicos (WELLS et al., 2006).

Os DMCD podem ser usados em quase todos os pacientes, com exceção para aqueles com doença limitada ou com doença da classe IV, onde não existe expectativa substantiva de reversão, e devem ser prescritos nos três primeiros meses desde o início dos sintomas. São considerados como DMCD de primeira linha o metotrexato, a HC, a sulfassalazina e a leflunomida. Não existe um critério de escolha definido para tais fármacos, visto que cada uma tem suas particularidades, e o profissional deve analisar as características do paciente na hora de fazer a escolha, prescrevendo o que melhor se adaptar a realidade do portador (WELLS et al., 2006).

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) são os analgésicos mais frequentemente utilizados nos quadros dolorosos, principalmente nas alterações músculo-esqueléticas. A analgesia destes fármacos deve-se a redução da síntese das prostaglandinas pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), com maior eficácia no tratamento das doenças inflamatórias. Nas dores de maior intensidade e nas dores neuropáticas os AINES não proporcionam uma analgesia satisfatória e podem causar efeitos adversos gastrointestinais, renais e distúrbios na função plaquetária. Os inibidores seletivos da COX-2, teoricamente, não ocasionariam estas complicações, mas sua potência analgésica seria semelhante a dos AINES não seletivos (RIBEIRO et al., 2002).

O uso de analgésicos opióides na dor crônica benigna é assunto de muitos debates e controvérsias, mas apesar desta problemática, opióides, principalmente os chamados opióides fracos (tramadol ou codeína), têm sido frequentemente utilizados nas clínicas de dor em todo

o mundo. A escolha destes fármacos deve-se primeiramente à falsa idéia de que eles causariam menos dependência psicológica do que os chamados opióides fortes e também pelo fato de suas prescrições, em alguns países, não exigirem um receituário especial (RIBEIRO et al., 2002). Contudo, ver-se a complexidade desta enfermidade e a necessidade de terapias alternativas que venham melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por tal doença.

### **3.1.1 Modelos Experimentais de Artrite Reumatóide**

Os modelos experimentais de artrite são muito utilizados no estudo da imunopatologia, genética, no conhecimento da patogênese e na validação de alvos terapêuticos (TRENTHAM; TOWNES; KANG, 1977).

A artrite experimental inflamatória aguda e crônica, semelhante à artrite reumatóide em humanos, pode ser mimetizada em linhagens de vários mamíferos como: ratos, camundongos e, em alguns casos, coelhos, porcos e macacos. Os modelos experimentais em roedores são os mais utilizados para avaliar e compreender a complexidade fisiopatológica desta doença (CROFFORD, 1997; WILDER, 1999). Além disso, a artrite experimental, principalmente em murinos constitui um grande desafio para os pesquisadores desta área, devido a complexidade da doença, as peculiaridades das linhagens utilizadas nestes estudos e a reprodutibilidade destes experimentos. (KOLLIAS, et al., 2011)

Os protocolos experimentais para avaliação da artrite reumatóide erosiva dão-se de várias formas. O modelo a ser utilizado dependerá de vários fatores, como: quais as características fisiopatológicas de interesse destes protocolos, espécie e linhagem, disponibilidade de linhagens isogênicas susceptíveis a determinadas técnicas (ex: DBA/1 e C57BL/6), custo das substâncias empregadas nestas técnicas e reprodutibilidade experimental. (CROFFORD, 1997 ; WILDER, 1999).

Basicamente, os modelos se dividem em três grupos. O primeiro se caracteriza por hiperimunização de linhagens susceptíveis a antígenos específicos, como o colágeno tipo II (artrite induzida por colágeno – CIA), ou matriz proteica da cartilagem oligomérica (artrite induzida por COMP), associadas à adjuvante completo de Freund (CFA) ou albumina sérica bovina metilada (mBSA). (ROSSATO, 2011)

Por seguinte, temos o segundo grupo que é induzido por administração i.d. (intradérmica) de substâncias de caráter lipofílico (óleos). Neste grupo, artrite induzida por adjuvante (AIA), destacam-se o adjuvante incompleto de Freund (85% de óleo mineral e 15%

de tensoativo natural), o pristane (terpenóide extraído do óleo do fígado de tubarão) e a Avidrina (hidrocarboneto sintético) (ROSSATO, 2011).

Por fim, o último grupo caracteriza-se por indução através das seguintes substâncias: parede celular de células de streptococcus (SCW), proteoglicanos isolados de cartilagem humana (PGIA), e modelo de artrite espontânea usando o factor de necrose tumoral transgênica (TNF-transgenic) (BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M.J.; TAK, P.P., 2010 ; WILLIAM, 2007 ; BENDELE et al., 1999)

Além de existir alguns modelos de ocorrência espontânea de artrite em animais, a susceptibilidade à artrite experimental também está associada aos genes do complexo principal de histocompatibilidade MSHC (H-2) de classe II e seu desenvolvimento é acompanhado por uma robusta resposta de células T e B a componentes articulares. As principais características desses modelos incluem sinovite proliferativa com infiltração de polimorfonucleares e mononucleares, formação de pannus, degradação da cartilagem, erosão óssea e fibrose. (WILLIAMS, 2007 ; BENDELE et al., 1999; CROFFORD, 1997 ; WILDER, 1999)

### **3.2 *Baccharis trimera* (Carqueja)**

*Baccharis* é o maior gênero da família Asteraceae, com mais de 500 espécies distribuídas pelos continentes Norte e Sul Americanos, sendo que 90% ocorrem na América do Sul. As espécies deste gênero estão distribuídas principalmente nas regiões temperadas e tropicais do Brasil, Argentina, Paraguai, Bolívia, Colômbia, Chile e México (MARTINEZ; BENITO, 2007).

Espécies desse gênero são importantes economicamente para o homem, pois ajudam no combate à erosão do solo e podem ser utilizadas como plantas ornamentais, embora também possam se apresentar como pragas de difícil combate em pastagens, podendo intoxicar o gado. Entretanto, o destaque maior está na medicina, onde várias espécies são utilizadas popularmente (CORRÊA, 1984; CARNEIRO; FERNANDES, 1996).

A origem do nome *Baccharis* (*Bakkharis*) é grega, utilizada como antiga denominação para algumas plantas arbustivas, e chegou a ser empregada para designar espécies que nada têm a ver com as que hoje em dia recebem este nome (BUDEL et al. 2005). São popularmente denominadas de “carqueja”, sendo indicadas tradicionalmente para o tratamento de distúrbios do sistema digestivo, embora hajam outras diversas atividades

biológicas relatadas (BELTRAME et al., 2009). Além de carqueja, apresenta ainda uma ampla variedade de nomes vulgares: carqueja-amarga, bacanta, bacorida, cacalia-amarga, carque, quina-de-condamine, vassoura, vassoura de botão, tiririca-de-babado e carqueja-doce (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

Figura1. *Baccharis trimera* (LESS.) DC.



Fonte: (HEIDEN, 2015).

No Brasil, a espécie *B. trimera* está inserida no bioma pertencente à Mata Atlântica, uma das florestas tropicais com maior diversidade biológica do planeta. Por esse motivo, intervenções científicas que busquem sua preservação e diminuição do extrativismo tornam-se necessárias. O estado do Paraná é considerado o centro de dispersão no país, mas sua ocorrência é destacada em Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul (SOUSA, 2005).

A importância da espécie *B. trimera* para a medicina popular no Brasil incentivou a sua inclusão na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), como parte da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde brasileiro (MACEDO; GEMAL, 2009). Nesta lista, constam 71 espécies vegetais que apresentam potencial terapêutico comprovado para gerar fitoterápicos que poderão ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (RUIZ *et al.*, 2008).

### 3.2.1 Composição Química

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o início de 1900. Cerca de 120 espécies do gênero *Baccharis* foram estudadas quimicamente e entre estas, em torno de 30 apresentam estudos de atividade biológica (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005), sendo que mais de 150 compostos foram isolados e identificados a partir deste gênero (MARTINEZ; BENITO, 2007).

Os compostos mais importantes em *Baccharis* são diterpenóides, e são representados principalmente por neo e ent-clerodanos e, menos comum, ent-labdanos e kauranos. Os flavonóides, juntamente com os diterpenos, são os compostos de maior ocorrência no gênero *Baccharis* e são descritos como bons marcadores quimiotaxonômicos para os mais baixos níveis hierárquicos da família Asteraceae. Apresentam-se normalmente como agliconas livres e muito raramente na forma glicosilada, o que é uma característica da família Asteraceae (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Dentre as espécies do gênero *Baccharis*, a *B. trimera* é a que apresenta o maior número de estudos fitoquímicos e farmacológicos (BELTRAME *et al.*, 2009). Nessa, estudos químicos revelaram a presença de diterpenos do tipo clerodano, saponinas e de seus glicosídeos, e flavonóides (SILVA *et al.*, 2007).

No que se refere aos flavonóides, uma série deles já foram isolados: eupafolina, quercetina, luteolina, nepelina, apigenina, hispidulina, eupatorina, genkwanina, cirsimaritina, rutina, cirsilinol, canferol, eupatrina, eriodictiol, 5-OH-6,7,3',4'-OMe flavona, 5,7,3',4'-OH-3-O-ramnosil-glicosil flavona (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005) e a 5,6-diidroxio-7,3',4'-trimetoxiflavona (BORELLA *et al.*, 2006). Deve-se ressaltar que grande parte das ações farmacológicas citadas para esta espécie se deve a este complexo flavonoídico presente na composição química, e que o teor desses sofre influência da sazonalidade, sendo sua concentração maior no verão. No que se referem as substâncias afroegênicas, como as saponinas, observou-se que estas não há influência da biossíntese desse tipo de metabólito na *B. trimera* (BORELLA *et al.*, 2006).

Os derivados do ácido quínico estão presentes em uma variedade de espécies vegetais (TIMMERMANN *et al.*, 1983; BASNET *et al.*, 1996; CHUDA *et al.*, 1996) e são responsáveis por um grande número de atividades farmacológicas. Deste grupo de compostos citados, estão presente na espécie *B. trimera* os ácidos 5-*O*-cafeoilquínico 3,4-*O*-dicafeoilquínico, 3,5-*O*-dicafeoilquínico e o 4,5-*O*-dicafeoilquínico (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005). E como componentes majoritários do extrato aquoso, esses compostos justificam seu

uso popular por apresentar as atividades antioxidante (CHUDA *et al.*, 1996), hepatoprotetora (BASNET *et al.*, 1996), antibacteriana (SHOLZ *et al.*, 1994), anti-inflamatória (GONGORA, *et al.*, 2002), e antiviral (MATSINGOU *et al.*, 2000).

Em relação aos marcadores, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª Ed., (2010) os de identificação de *B. trimera* são a quercetina e a 3-O-metil-quercetina, semelhante à 4ª Ed.(1996) Paralelamente, o doseamento da F. Bras. 5ª Ed., (2010) é feito em relação a ácidos cafeícos totais expresso na forma de ácido clorogênico, enquanto que na anterior em flavonóides totais calculados como quercetina. Além desses, na 4ª Ed. era descrito o doseamento do carquejol e acetato de carquejila no óleo essencial, enquanto que na última edição essa análise encontra-se ausente. Dessa forma, observa-se a complexidade da análise dessa espécie, visto a sua semelhança com outras espécies do seu gênero.

### **3.2.2 Farmacologia**

*B. trimera* é uma espécie vegetal muito utilizada na medicina popular, principalmente em problemas hepáticos ou relacionados com digestão. Além disso, a Carqueja, como popularmente é denominada, também é utilizada popularmente como: anti-inflamatório, antidiarréico, antihipertensivo, antibacteriano, antireumático, analgésico, entre outras situações (BORELLA; FONTOURA, 2002).

#### **3.2.2.1 Atividade antioxidante**

É bem conhecido que os radicais de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser gerada no organismo durante processos metabólicos devido a estímulos do ambiente ou durante o "estouro" das células fagocíticas em uma infecção pela ação da NADPH oxidase (EMERIT & CHAUDIERE, 1989; BABIOR, 2000). ROS são capazes de oxidar diversas biomoléculas, incluindo DNA, proteínas, carboidratos, ácidos graxos e muitas outras estruturas celulares (BAGCHI & PURI, 1998). Há evidências de que ROS podem estar envolvidos em mais de 100 doenças e eventos nosológicos, tais como câncer, arteriosclerose, artrite reumatóide e lesões de órgãos pós-isquêmica (HALLIWELL, 1994). Em muitos desses eventos, a origem do ROS parece estar diretamente relacionadas com a ativação dos neutrófilos. (WEISS, 1989). Neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares que desempenham um papel crucial na defesa do organismo contra bactérias, fungos e protozoários, sendo as principais células efetoras da imunidade inata. O papel dos neutrófilos (PMN) na

produção de ROS na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias tem atraído o interesse com a descoberta de novos compostos para modular esse processo (MIDDLETON JR. et al., 2000). O extrato hidroetanólico de *B. trimera* reduziu a liberação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos em ambos *in vitro* e *in vivo* modelos experimentais. Demonstrando seu grande potencial antioxidante (PADUA et al., 2010).

### **3.2.2.2 Atividade antiartrítica**

O efeito antiartrítico do extrato aquoso da *Baccharis genistelloides* var. *trimera*, preparado por infusão, foi demonstrado em modelo de artrite induzida por colágeno *in vivo*. Os resultados demonstraram uma redução drástica do desenvolvimento da doença com diminuição da migração, ativação e proliferação de linfócitos para o local da lesão. Esses efeitos foram atribuídos aos flavonóides presentes no extrato (COELHO et al., 2004).

### **3.2.2.3 Atividade protetora da mucosa gástrica**

A ação citoprotetora dos extratos aquoso, etanólico, diclorometânico e hexânico de *Baccharis genistelloides* var. *trimera* foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados indicaram que o extrato hexânico promoveu citoproteção gástrica, inibindo as úlceras em 64,3% enquanto o extrato aquoso inibiu em 52,8%, ambos comparados à inibição de 85,7% do controle (Atropina) (GONZALES et al., 2000).

### **3.2.2.4 Atividade citoprotetora**

A ação citoprotetora dos extratos aquoso, etanólico, diclorometânico e hexânico de *B. Baccharis genistelloides* var. *trimera* foi avaliada em modelo de úlcera induzida por etanol. Os resultados indicaram que o extrato hexânico promoveu citoproteção gástrica, inibindo as úlceras em 64,3% enquanto o extrato aquoso inibiu em 52,8%, ambos comparados à inibição de 85,7% do controle (Atropina) (GONZALES et al., 2000).

### **3.2.2.5 Atividade anti-hiperglicemiante**

Em relação ao efeito anti-hiperglicemiante do extrato da carqueja, estudos com camundongos, com diabetes induzida por estreptozotocina, tratados durante 7 dias, duas vezes

ao dia (2000 mg/Kg) com a fração aquosa do extrato etanólico de *B. trimera*, demonstraram efeito anti-hiperglicemiante relevante (OLIVEIRA et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2005). Resultado semelhante ao obtido por Coelho e colaboradores (2004), que trataram ratos saudáveis com o extrato aquoso de *B. genistelloides* (4,2 mg/Kg, 37dias) e observaram uma redução não apenas na glicemia, mas também nos níveis séricos de triglicérides (COELHO et al., 2004).

#### **3.2.2.6 Atividade hepatoprotetora**

A atividade hepatoprotetora foi avaliada em modelo de intoxicação por faloidina em camundongos, substância tóxica extraída da *Amanita phalloides* capaz de causar injúria ao sistema nefrohepático. Avaliou-se a capacidade do extrato bruto (acetato de etila), uma fração enriquecida, flavonóides isolados (quercetina, luteolina, apigenina, nepetina, hispidulina) e uma mistura entre eles, aumentar ou não a sobrevida dos animais tratados. Foi observado que o flavonóide hispidulina (32 mg/Kg) conseguiu aumentar a sobrevida dos animais em 80 %, sendo que a mistura de flavonóides, em proporções iguais, obteve 70%. O extrato bruto e a fração enriquecida aumentaram a sobrevida dos animais dose-dependente em até 100% (SOICKE & LENG-PESCHLOW, 1987)

#### **3.2.2.7 Relaxante da musculatura lisa vascular e intestinal**

O extrato aquoso das partes aéreas da carqueja diminuiu a produção de ácido gástrico e inibiu a indução de lesões por estresse ou por etanol em ratos, além de um diterpeno identificado e isolado desta mesma espécie possuir a capacidade de relaxar a musculatura lisa intestinal de ratos (TORRES et al., 2000).

#### **3.2.2.8 Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora**

Em modelos pré-clínicos de inflamação em ratos, pleurisia induzida por carragenina, o extrato aquoso de *B. trimera* apresentou ação anti-inflamatória. Os extratos nas concentrações de 400 e 800 mg/Kg causaram efeitos inibitórios significantes tanto no influxo de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares), como no aumento de exsudato na cavidade pleural. Efeito imunomodulador foi avaliado em modelo de proliferação, *in vitro*, de linfócito

T. Os extratos de *B. trimera* nas concentrações 25, 50 e 100 mg/mL reduziram significativamente a produção dessas células frente à fitohemaglutinina (PAUL *et al.*, 2009).

### **3.2.2.9 Atividade anti-inflamatória e analgésica**

A atividade anti-inflamatória de *B. trimera* foi avaliada por modelo de edema de pata usando vários agentes flogísticos. Os resultados mostraram que a fração butanólica do extrato aquoso (40 a 100 mg/kg) inibiu marcadamente a inflamação induzida por carragenina e dextrana. O efeito analgésico foi avaliado através do modelo de contrações abdominais por ácido acético, onde o extrato reduziu consideravelmente o número de contrações abdominais (GENÉ, 1996).

### **3.2.2.10 Atividade espasmolítica**

Gamberini e colaboradores (1991), comprovaram cientificamente a ação antidiarréica e espasmolítica utilizada popularmente, pois, constataram que o extrato aquoso de *B. trimera* reduziu significativamente o trânsito intestinal de ratos e camundongos. Além disso, observou-se uma redução da secreção ácida no estômago e no aparecimento de lesões gástricas, respaldando seu uso popular como antidiarréico e antiácido.

### **3.2.3 Toxicologia**

Apesar do uso terapêutico das plantas medicinais e de seus produtos (chás e tinturas), em certos casos, elas podem se tornar um problema, pois algumas das substâncias que as compõem podem desencadear efeitos deletérios que resultam em um quadro clínico severo, algumas vezes, fatal. Quanto a sua toxicidade, em doses usuais e durante períodos de tempo prolongado, diversos estudos demonstraram que extratos de *B. trimera* apresentam poucos efeitos adversos ou tóxicos quando comparado às outras plantas terapêuticas também utilizadas com frequência pela população (RUIZ *et al.*, 2008).

O principal efeito tóxico relatado para *B. genistelloides* é a indução de aborto, relatada popularmente e comprovada experimentalmente em animais, sendo atribuída a uma ação uterotônica (RUIZ *et al.*, 2008).

Na literatura também é possível encontrar diversos estudos minuciosos de avaliação do potencial citotóxico do infuso de *B. trimera* sobre as células das raízes de *Allium cepa*. A dose

usual do chá de carqueja (20 g/L) aumentou o número de anomalias do ciclo mitótico das células, já a dose dez vezes mais concentrada (200 g/L), inibiu a divisão celular, caracterizando efeitos mutagênicos e antiproliferativos. Ainda neste estudo, a avaliação do efeito do infuso sobre linfócitos humanos evidenciou a ocorrência de aberrações cromossômicas dose dependente, levando os autores a recomendar moderação no consumo do chá de carqueja (PINHO et al., 2010).

Losqui et al, (2009) verificaram, também, que a carqueja possui ação inibitória na diferenciação de células neuronais *in vitro* quando tratadas cronicamente. Observou também uma redução na sobrevivência de células neuronais e diminuição da proliferação de células gliais. Essa redução da proliferação de células da glia poderia estar interferindo na sobrevivência e diferenciação neuronal.

Estudos conferem aos taninos presentes na espécie a atividade enzimática responsável pela inibição da divisão celular de *Allium cepa*. Estas espécies também contêm flavonoides, os quais têm demonstrado possuir atividade citotóxica (FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

Entretanto, Peron et al, (2008) verificaram que a infusão de carqueja em doses extrapoladas das usadas pelos humanos, não foram citotóxica e nem clastogênica em células da medula óssea de ratos Wistar<sup>®</sup> e segundo Rodrigues (2009) não foram observados efeitos genotóxicos sobre as células sanguíneas e hepáticas de ratos que receberam as doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg durante três dias consecutivos.

Estudos de toxicidade aguda e dose repetida em ratos (machos e fêmeas), com diferentes doses de extrato aquoso obtido por infusão, indicaram a ausência de alterações significativas do perfil hematológico assim como dos marcadores de funções hepática e renal, tais como transaminases e creatinina. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal, aspecto, cor e peso relativo do fígado, rins, timo e pulmões entre os grupos que receberam o extrato (PEDRAZZI et al., 1997; COELHO et al., 2004). Outro estudo em ratos demonstrou a atividade hipotensora do extrato de carqueja, não se recomendando, assim, o consumo por pacientes hipotensos (ALONSO, 2009).

### **3.3 Hidroxicloroquina**

Desenvolvido inicialmente como agente antimalárico, o SHC quimicamente (7-cloro-4-[4-[N-etil-N-(2-hidroxi-etil)-amino]-1-metilbutilamino]-quinolina sulfato – é frequentemente utilizado como fármaco antirreumático de ação lenta no tratamento de desordens de tecido conectivo (OLSEN et al., 2013; MCLACHLAN et al., 1993; TETT et al., 1989).

Como antimalárico, a hidroxicloroquina é significativamente eficaz contra a forma eritrocítica dos agentes etiológicos da malária: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, além de grande parte das cepas do *Plasmodium falciparum*. Entretanto, recentemente vem sendo observada uma certa resistência ao *Plasmodium falciparum* cloroquina-resistente, além de casos de resistência contra cepas de *Plasmodium vivax*. E, apesar de ser utilizada há muito tempo nesse tipo de terapêutica, não se conhece seu exato mecanismo de ação (SEMENIUK et al., 2008; SHAPIRO & GOLDBERG, 2006).

A SHC tem sido ainda utilizada como fármaco secundário no tratamento de uma variedade de doenças crônicas. Assim, são administrados em conjunto com outros agentes, resultando em eficácia clínica de doenças como: artrite reumatoide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus discoide (LD), sarcoidose, síndrome de Sjögren (SS) e doenças de fotossensibilidade (SHAPIRO & GOLDBERG, 2006).

O tratamento de doenças autoimunes com antimaláricos tem sido senso comum por mais de meio século. Muitos estudos de longo prazo evidenciaram melhores resultados em termos de danos a órgãos e de sobrevida global dos pacientes que recebem estes medicamentos. Ao longo das últimas duas décadas, mais dados vêm sendo acumulados sobre os efeitos sistêmicos do SHC, expandindo os usos potenciais dessa medicação em diferentes classes terapêuticas (OLSEN et al., 2013).

### **3.3.1 Aspectos clínicos**

O SHC traz benefícios em longo prazo no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico e da artrite reumatoide e tornou-se um componente padrão de terapia para pacientes com estas doenças. A Tabela 1 traz um resumo sistemático da eficácia do tratamento com SHC sobre as manifestações clínicas das principais enfermidades onde o uso de fármaco é recomendado.

**Tabela 1.** Revisão sistemática de evidência da eficácia do SHC no tratamento da artrite reumatoide e lúpus eritematoso

Enfermidade	Avaliação da eficácia	Tipo de evidência	Referência
Artrite reumatoide	Contagem de inchaço das juntas e dor;	Revisão de literatura sistemática;	Gaujoux-Viala et al., 2010
	Índices articulares;	Ensaio clínico controlado, duplo-cego;	Pavelka et al., 1989
	Dor e sensibilidade articulares;	Ensaio clínico randomizado, controlado, duplo-cego;	Nuver-Zwart et al., 1989
Lúpus eritematoso sistemático	Frequência de crises;	Ensaio clínico randomizado, controlado, duplo-cego, envolvendo retirada da terapia;	The Canadian SHCQ Study Group, 1991
	Falha de órgão;	Estudo de coorte longitudinal; estudo de caso-controle;	Costedoat-Chalumeau et al. 2010; Fessler et al., 2013
	Sobrevivência;	Análise de coorte prospectiva; Análise de coorte longitudinal;	Ruiz-Irastorza et al., 2006; Shinjo et al., 2010
	Início tardio da doença;	Estudo de caso-controle aninhado;	James et al., 2007
	Manifestações cutâneas;	Análise de coorte prospectiva;	Francès et al., 2012
	Prevalência de nova doença renal;	Análise de coorte prospectiva;	Shinjo et al., 2010
	Glomerulonefrite;	Análise de coorte longitudinal;	Pons-Estel et al., 2009
	Remissão renal completa para nefropatia membranosa.	Análise de coorte retrospectiva;	Kasitanon et al., 2006

Fonte: (OLSEN, 2013).

Relatos apontam a eficácia do SHC em doenças diferentes daquelas que apresentam condições reumáticas. Alguns desses relatos estão descritos a seguir (OLSEN et al., 2013).

A primeira informação diz respeito à diabetes mellitus. Condições hipoglicemiantes em pacientes tratados com SHC e CQ vêm sendo observadas há décadas. Três pequenos ensaios clínicos, randomizados e controlados, utilizando pacientes desprovidos de outras complicações reumáticas e recebendo uma dose relativamente alta de SHC (600 mg), reforçaram tal situação (QUATRARO et al., 1990).

Um breve estudo prospectivo com obesos, não diabéticos e não portadores de doenças autoimunes demonstrou a melhoria da sensibilidade à insulina, em tratamento usando SHC durante seis semanas. Esses resultados sugerem que há uma redução não só da incidência de diabetes tipo dois em pacientes que estão sendo tratados com SHC para outras condições, como também da taxa de glicemia sanguínea e da resistência à insulina. É provável que esse efeito da SHC sobre a glicose esteja relacionada a alterações do pH intra-endossomal, ação essa que resulta na redução da degradação da insulina no tecido adiposo humano (OLSEN et al., 2013; MERCER et al., 2012).

Outro achado interessante é a capacidade da SHC de reduzir eventos tromboembólicos. Há mais de duas décadas, JOHNSON & CHARNLEY (1979) relataram a utilidade profilática do SHC para evitar significativos eventos trombóticos em condições pós-operatórias de artroplastia total do quadril. Uma análise de coorte prospectiva demonstrou efeito protetor dos antimaláricos no desenvolvimento de trombose, bem como em melhoria significativa da sobrevivência. Um estudo mais recente – análise de coorte-base, utilizando 1930 pacientes portadores de LES – analisou os fatores que foram associados a um ou mais eventos trombóticos, no qual se evidenciou que o uso de SHC foi significativamente associado a um risco reduzido de trombose, principalmente em pacientes jovens (RUIZ-IRASTORZA et al., 2010; KAISER, CLEVELAND & CRISWELL, 2009; WALLACE, 1987; ERNST, ROSE & LEE et al., 1984; JOHANSSON, FORSBERG, & JOHANSSON, et al., 1981).

Vários mecanismos têm sido propostos para os efeitos antitrombóticos do SHC. O mais provável parece ser a redução de agregação plaquetária ou ainda, a inibição da liberação dos alfa-grânulos, estruturas que possuem os fatores que participam da cascata de coagulação. Porém, esses achados limitam-se a estudos *in vitro*. No entanto, a concentração necessária para que seja possível observar tal efeito (25 mg/ml) é 200 vezes maior do que os níveis no sangue que são relatados em pacientes tratados, de modo que pode ser explicada a razão deste efeito permanecer apenas especulativo (FRANCÈS et al., 2012; PROWSE et al., 1982; JOHANSSON, FORSBERG, & JOHANSSON, et al., 1981).

A redução do risco cardiovascular, devido ao efeito geral benéfico sobre o perfil lipídico quando em tratamento com o SHC, já é reconhecido há duas décadas. Petri et al, (1994), em estudo de coorte longitudinal, mostraram associação significativa entre o tratamento com SHC, com doses entre 200 a 400 mg por dia, e menores níveis de colesterol. Resultados semelhantes foram obtidos por RAHMAN et al, (1999), destacando ainda a recuperação dos níveis de colesterol quando na descontinuação da terapia com o SHC. Assim, estudos recentes vêm comprovando a redução de níveis lipídicos, colesterol total e até mesmo de lipoproteínas de baixa densidade em pacientes portadores de AR ou LES, os quais recebem tratamento com o fármaco em questão, por períodos de tempo relativamente diminutos (CAIROLI et al., 2012; MORRIS et al., 2011; MIRJAFARI et al., 2011; O'DELL et al., 2001; KAVANAUGH et al., 1997; MUNRO et al., 1997).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações do perfil lipídico com SHC não estão bem elucidadas. Estudos postulam que isso ocorre devido à taxa de depuração significativamente mais elevada de frações lipídicas ou até mesmo à regulação positiva do receptor de lipoproteínas de baixa-densidade (SACHET et al., 2007).

Talvez o fator mais inesperado seja a grande quantidade de literatura publicada documentando a utilidade de antimaláricos, SHC em especial, no tratamento de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Há pouco mais de uma década, dois ensaios clínicos controlados demonstraram a eficácia do SHC na infecção pelo micro-organismo.

O primeiro destes, um estudo controlado com placebo, no qual 40 pacientes com níveis de linfócitos T CD4+ maiores do que 200 células/mm<sup>3</sup>, foram randomizados para receberem 800 mg/dia de SHC ou placebo, durante 8 semanas. O grupo tratado mostrou um declínio significativo nos níveis de ácido ribonucleico (RNA) viral, enquanto que este valor foi maior no grupo de tratamento com placebo. A percentagem de células T CD4+ permaneceu estável (SPERBER et al., 1995).

O segundo estudo trazia 72 pacientes, soropositivos para o HIV, os quais foram randomizados para receber a mesma dosagem do fármaco, mas dessa vez, ao invés do placebo, estes receberiam 500 mg/dia de zidovudina (ZDV), em um esquema duplo-cego. O grupo tratado com o antimalárico mostrou uma diminuição significativa do RNA viral plasmáticos, após 16 semanas de tratamento, mantendo estável o nível de células T CD4+, além de baixos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) e de imunoglobulina G (IgG) após o tratamento. O grupo tratado com ZDV também obteve um número significativamente menor de cargas virais, entretanto, não houve alterações de grande magnitude nos níveis séricos de IL-6 ou de IgG. Uma vez que níveis elevados de IL-6 são geralmente associados a um maior

risco de progressão do HIV, estes resultados com SHC foram encorajadores em termos de modulações imunológicas, uma vez que estas são geralmente favoráveis e podem contribuir para a eficácia global da terapia em, pelo menos, alguns pacientes infectados (OLSEN et al., 2013; SPERBER et al., 1997).

PATON & ABOULHAB (2005) em um estudo recente utilizando uma dose menor de SHC (200 mg/dia), hidroxiureia e didanosina – inibidor da transcriptase reversa –, atestaram a significativa redução da carga viral em cerca da metade dos pacientes, com níveis indetectáveis no final do estudo, permanecendo constante o nível de linfócitos T CD4+.

A princípio, a ideia de se confeccionar formas farmacêuticas contendo um fármaco relativamente barato para a terapia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi considerada plausível, visando utilizá-las em países menos ricos com altas taxas de infecção pelo HIV. Em contrapartida, a disponibilidade de medicamentos genéricos de baixo custo e o apoio do governo nesse tipo de tratamento reduziu a urgência e interesse sobre a abordagem. No entanto, o uso da SHC adjuvante em associação de dose fixa com determinados fármacos para o tratamento da AIDS vem sendo bastante discutido (AGUIRRE-CRUZ et al., 2010; SAVARINO et al., 2001).

O mecanismo dessa ação antimicrobiana parece ser a alcalinização de vesículas ácidas intracelulares, o que inibiria o crescimento dos micro-organismos. Estudos também sugerem que a redução na carga viral na infecção pelo HIV ocorre devido à perturbação da glicosilação pós-transducional do envelope protéico do vírus (proteína gp120), resultando na redução da capacidade infecciosa de partículas virais recém-produzidas (ROLAIN et al., 2007; SAVARINO et al., 2001; CHIANG et al., 1996).

Os riscos do tratamento com SHC são relativamente baixos. Em geral, correspondem à intolerância gastrointestinal (náuseas, vômitos, dor abdominal), hiperpigmentação da pele, branqueamento dos cabelos, cefaleia, tontura. No entanto, continua a existir um potencial específico para efeitos adversos mais graves, como a lesão de retina (retinopatia) e neuromiotoxicidade (OLSEN et al., 2013; MARMOR et al., 2011; WOLFE & MARMOR, 2010; TANENBAUM et al., 1990).

Muitos desses efeitos adversos parecem ocorrer devido ao acréscimo do pH endossomal, o que altera o processamento de certas proteínas e a ligação de componentes biológicos aos receptores. Outros estudos postulam diferentes mecanismos, como: fortes ligações *in vitro* fármaco: ácidos nucleicos e inibição do cálcio de sinalização em células linfoides (KUZNIK et al., 2011; GOLDMAN et al., 2000).

Os efeitos adversos oculares e cutâneos da SHC são possivelmente reações fototóxicas. Dos relatos de substâncias medicamentosas que causam fototoxicidade, um número significativo deles contém cloro, como a SHC. Sugere-se que o radical livre cloreto, formado da quebra da ligação C-Cl, seja um dos responsáveis pelos danos, uma vez que esse se combina com proteínas da pele, por exemplo (MOORE & HEMMENS, 1982; MOORE & TAMAT, 1980; TØNNESEN et al., 1988).

Por razões como estas, o uso de antimaláricos exige um acompanhamento regular e supervisão médica.

A toxicidade ocular associada aos agentes antimaláricos foi observada pela primeira vez em 1957. Em 1959, Hobbs & Sorsby reconheceram pela primeira vez a toxicidade retiniana associada ao uso de SHC (WEINBERG & D'AMICO, 1994; HOBBS, SORSBY & DREEDMAN, 1959).

Trabalhos mostram que a frequência da retinopatia causada pelo acúmulo de SHC varia de 0,001 a 40%, mas milhares de pessoas utilizam este medicamento para diversos fins. Contudo, a toxicidade oftalmológica deste fármaco é uma preocupação séria, pois, mesmo após a retirada da medicação, há pouca ou nenhuma recuperação visual, e, por vezes, há progressão da perda visual (EASTERBROOK, 1993; RAINES et al, 1989; ELMAN, et al., 1976; HOBBS, EADIE & SOMERVILLE et al., 1961; HENKIND & ROTHFIELD, 1963).

O mecanismo que causa toxicidade ocular não é bem compreendido. Agentes antimaláricos têm efeitos agudos sobre o metabolismo das células da retina, incluindo fotorreceptores. Entretanto, não é claro se estes efeitos metabólitos são as causas, em curto prazo, dos danos lento e crônico, que caracterizam o estado clínico de toxicidade. A SHC se liga à melanina no epitélio pigmentado da retina e esta ligação acaba por concentrá-lo e contribuir ou prolongar os seus efeitos tóxicos (MICHAEL et al., 2011).

Novos dados demonstraram que o risco de toxicidade aumenta abruptamente para 1% depois de 5 a 7 anos de uso, ou uma dose cumulativa de 1000 g de SHC, tendo em vista que a dose individual é de, geralmente, 400 mg ou calculada por peso-dependência. O risco aumenta ainda mais com o uso continuado da droga. A falha renal ou hepática deve ser considerada, uma vez que esses órgãos são os responsáveis pela depuração do fármaco. A idade, fatores genéticos e pacientes portadores de maculopatia devem também ser considerados como fatores de risco determinantes para a descontinuação do tratamento. É desaconselhado o tratamento prolongado em crianças e em portadores de hipersensibilidade às 4-aminoquinolonas (MICHAEL et al., 2011).

Aos pacientes que irão se submeter ao uso de antimaláricos, um exame inicial é aconselhado para servir como um ponto de referência e para descartar maculopatia. Este é um agravamento da retinopatia de caráter genético, o que pode vir a ser uma contraindicação ao uso desses agentes terapêuticos. O protocolo de rastreio anual deve ser iniciado após 5 (cinco) anos de exposição continuada ao fármaco. Testes como eletrorretinograma multifocal, tomografia de coerência óptica, fundo autofluorescência, além de exames habituais como campos de visão e exames de fundo de olho são altamente preconizados. (MICHAEL et al., 2011).

Aconselha-se que os pacientes devam estar cientes do risco de toxicidade e dos fundamentos para a triagem, visando à detecção ou minimização da incidência do efeito. Os medicamentos devem ser interrompidos, se possível, quando a toxicidade é reconhecida ou fortemente suspeita. Esta é uma decisão a ser tomada em conjunto: pacientes e seus médicos (MICHAEL et al., 2011).

A utilização do fármaco em questão é segura durante a gravidez, pois a molécula de SHC é grande e não é capaz de atravessar a barreira placentária. Estudos transversais sugerem que é possível reduzir o risco de anormalidades cardíacas fetais em mães com auto anticorpos contra antígenos que participam dos processos que envolvem a RNA-polimerase (IZMIRLY et al., 2012; IZMIRLY et al., 2010; LEVY, 2005; COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2005).

### ***3.3.2 Aspectos Farmacocinéticos***

O SHC é comercializado e administrado ao paciente como racemato, mistura equimolar de dois enantiômeros: (+)-SHC e (-)-SHC. Entretanto, não há informação disponível sobre possibilidades de disposição estereosseletiva e atividades farmacológicas dos enantiômeros isolados (SOLOMONS & FRYHLE, 2005; MCLACHLAN et al, 1993).

Apesar deste fato, diversos estudos buscam mensurar a concentração de cada um dos enantiômeros da SHC e de seus respectivos metabólitos. McLachlan et al, (1993) sugeriram a existência da atuação de um ou mais processo(s) estereoseletivo(s) no arranjo da molécula da SHC em plasma e urina. Tais processos seriam: inversão quiral, absorção, distribuição e excreção renal. Entretanto, considerando a estabilidade dos grupos vicinais do centro quiral da molécula, a possibilidade de haver inversão quiral parece ser remota. Os demais se demonstraram estereosseletivos (BROCKS & MEHVAR, 2003; BROCKS, PASSUTTO &

JAMALI., 1992; MCLACHLAN et al., 1993; MCLACHLAN et al. 1994; DUCHARME et al., 1994).

As altas concentrações de (-)-R-SHC no sangue e plasma, comparadas àquelas vistas com o (+)-S-SHC, corroboram a existência de processo(s) estereoseletivo(s) na disposição do fármaco em questão. Postula-se que o enantiômeros (R) é preferencialmente concentrado pelos compostos celulares do sangue e, uma vez fixado, deixaria o enantiômero (S) mais disponível para o metabolismo. Entretanto, estudos mostram que este e os demais processos estereosseletivos apresentam significativa variabilidade entre diferentes indivíduos (MCLACHLAN et al., 1994; MCLACHLAN et al., 1993; GUSTAFSSON et al., 1986).

Não há informações disponíveis capazes de garantir a eficácia e toxicologia de cada um dos enantiômeros. Também não se sabe qual deles é o responsável pela atividade antiartrítica. Haberkorn e colaboradores (1979) indicaram limitados dados de toxicidade em ratos, demonstrando que o (+)-R-CQ é o isômero mais tóxico por possuir menor dose letal que o seu enantiômeros (S). O trabalho ainda evidencia que a (+)-S-CQ, que tem a estrutura muito similar a SHC, demonstrou atividade antimalárica mais potente que a (-)-R-CQ, em ratos. Entretanto, a simples semelhança estrutural não permite a extrapolação dos dados supracitados para o tratamento da artrite reumatoide (BROCKS et al., 1992).

O SHC apresenta absorção oral e intestinal variáveis com biodisponibilidade de aproximadamente 74% e distribui-se pelo organismo apresentando retenção prolongada nos olhos, fígado, epiderme, pulmões, outras áreas ricas em melanina. Na epiderme, a concentração do fármaco pode chegar a ser 100 a 200 vezes maior que os níveis plasmáticos. Nos eritrócitos, a concentração é de 2 a 5 vezes maior do que a plasmática, uma vez que a SHC possui substancial capacidade de ligação às proteínas plasmáticas (KANSKI, 2000; DUCHARME et al., 1994; TANENBAUM, DENNY & TUFFANELLI, 1980).

O metabolismo dos derivados da 4-aminoquinolona é complexo e extenso. Depois de longa administração, o plasma contém níveis significativos de SHC e de seus três principais metabólitos, os quais ainda possuem o centro quiral. Portanto, todos existem em pares de enantiômeros, oito diferentes substâncias (IREDALE et al., 1993).

Deve-se esperar o acúmulo do fármaco e seus metabólitos, quando em dosagens crônicas. O composto possui longa meia-vida plasmática, estimada em mais de 40 dias, logo pode atingir altas concentrações (6.000 a 80.000 vezes maior que o nível plasmático). Além disso, a meia-vida plasmática aumenta proporcionalmente ao aumento da dose. Estudos atuais são capazes de mensurar esse parâmetro farmacocinético por CLAE em sangue total

(COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2006; KANSKI, 2000; TETT et al., 1989; TANENBAUM et al., 1980).

A principal via de excreção é a renal, com 23 a 25% do composto excretado em sua forma inalterada, juntamente com os metabólitos. Ducharme e colaboradores (1995) observaram eliminação mais rápida do enantiômero (+)-(S)-SHC comparada com o (-)-(R)-SHC, provavelmente devido a mais rápida excreção urinária e metabolismo hepático. Esse resultado foi corroborado por Fieger, Iredale & Wainer (1993). O trabalho ainda evidenciou que os metabólitos derivados do enantiômeros (S) representaram 80-90% da dose urinária recuperada e que não foram detectados metabólitos no sangue.

Ao contrário do exposto por Tett et al, (1989), overdoses por SHC, apesar de raramente relatadas, foram evidenciados sete casos em uma revisão da literatura médica realizada por Marquardt & Timothy, (2001). Entretanto, ainda não há harmonização do tratamento dessa situação.

### **3.4 Estudos de toxicidade pré-clínica**

A avaliação da toxicidade animal é realizada com o objetivo de determinar o potencial das substâncias em causar danos à saúde humana. Estes testes são utilizados para classificar, e de maneira correta, rotular substâncias mediante seu potencial de letalidade ou nocividade como determinado pela legislação. Além disso, outros fatores são investigados nestes estudos, como: potencial de toxicidade em órgãos específicos, relação dose-resposta e avaliação comportamental (PURCHASE et, al, 1998; BLAAUBOER, 2003 ; COECKE et al., 2005 ; PRIETO et al., 2006).

#### **3.4.1 Toxicidade aguda**

A avaliação da toxicidade aguda consiste na primeira etapa do estudo toxicológico na fase pré-clínica no desenvolvimento de um medicamento, e ocorre por administração única ou em frações em um período de vinte quatro horas, em doses bastante superiores a dose terapêutica (HAYES, 1994).

Em relação ao modelo animal a ser estudado, devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos. Deve-se utilizar duas vias de administração: (1) a pretendida para administração em humanos e (2) a parenteral. Se a administração endovenosa for a pretendida para uso em humanos, a utilização de apenas esta via para estudos de toxicidade de

dose única é suficiente. Quando a via pretendida para uso em humanos for a oral, é recomendável a administração do produto em animais por gavagem (ANVISA, 2013).

A dose limite a ser testada será de 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. Em situações, em que essa dose não resulte em uma margem de 10 vezes a exposição clínica e a dose clínica exceda 1 grama por dia, deve ser considerada a menor dose disponível entre 10 vezes a exposição clínica, 2000 mg/kg/dia ou a máxima dose disponível. (ANVISA, 2013)

Os animais do experimento serão observados por no mínimo 14 dias após a administração da substância teste. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes. Posteriormente, no mínimo uma vez ao dia (ANVISA, 2013).

#### **3.4.2 Toxicidade de doses repetidas**

A avaliação da toxicidade de doses repetidas, neste caso a crônica, tem como objetivo caracterizar o perfil toxicológico de substâncias após várias administrações em períodos de tempo previamente determinados. A partir destes estudos, é possível avaliar e determinar os efeitos tóxicos em órgãos-alvo, nas funções fisiológicas, hematológicas e bioquímicas e histopatológicas. (BARLOW et al. 2002 ; WHO, 2004)

Em relação ao modelo animal a ser estudado, devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. A amostra deve contemplar números iguais de machos e fêmeas (a utilização de apenas um dos sexos deve ser justificada pela indicação). As espécies devem ser selecionadas com base em sua relevância para a extrapolação de dados para seres humanos, considerando a farmacocinética, farmacodinâmica e biodisponibilidade da substância teste, incluindo sua biotransformação. (ANVISA, 2013)

Em relação à via de administração, deverá ser utilizada a via em que a droga será administrada em humanos, mas se a absorção em animais for limitada em relação ao homem, também uma via parenteral. (ANVISA, 2013)

As doses utilizadas em estudos de administrações repetidas são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses. Geralmente, três doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e não-roedores ou as situações particulares discutidas no item “dosagem” dos estudos de toxicidade de dose única. As demais doses são estabelecidas em sequência: 8 descendente sugerindo-se intervalos de 2 a 4 vezes (ANVISA, 2013).

Parâmetros analisados:

- Roedores: Mortalidade, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água, patologia clínica (hematologia, bioquímica); duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anátomo e histopatológicas (ANVISA, 2013).
- Não roedores: Mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações na massa corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); oftalmologia; duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anátomo e histopatológicas. (ANVISA, 2013).

# MATERIAL E MÉTODOS

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos, utilizados durante toda a parte experimental do presente trabalho, estão descritos a seguir.

### 4.1 Otimização da associação em dose fixa do sulfato de Hidroxicloroquina e o líófilo de *B. trimera*

A otimização da FF cápsula associação em dose fixa (ADF) do sulfato de Hidroxicloroquina (SHC) e líófilo de *B. trimera* (LB), foi desenvolvida no laboratório de tecnologia dos medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco, e teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade da obtenção da ADF, em escala piloto, possibilitando posteriormente, o desenvolvimento de ensaios não clínicos em modelos de interesse.

#### 4.1.1. Material vegetal

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas na manhã do dia 20 de janeiro de 2011, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil, segundo as coordenadas geográficas: latitude 22° 47' 29.29" S e longitude 47° 6' 31.80" W. O material fresco foi aspergido com álcool etílico a 70%, e em seguida seco em estufa de ar circulante durante cinco dias à temperatura de 40°C. Após secagem o material foi triturado em moinho de facas (Apado<sup>®</sup>), com malha de 30 mesh.

A identificação do material vegetal foi realizada pelo Centro Pluri-disciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (UNICAMP), sendo a exsicata depositada encontrada no herbário da mesma instituição, localizada na cidade de Paulínea-SP, sob número 1286.

#### 4.1.2. Identificação dos marcadores químicos de *B. trimera*

O ensaio de identificação do marcador químico foi baseado no método de Borgo e colaboradores (2010) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A partir deste, realizaram-se adaptações do gradiente da fase móvel, que possibilitaram a identificação da 3-O-metil-quercetina no extrato aquoso de *B. trimera* obtido por infusão de 3,3% (p/v) de droga vegetal em água destilada em ebulição durante 45 min, com posterior filtração e o

armazenamento da amostra em frasco de vidro âmbar. O padrão analítico foi extraído e purificado a partir da droga vegetal.

A análise foi realizada em CLAE Shimadzu<sup>®</sup> com sistema controlador (Shimadzu SCL - 20VP), bombas (Shimadzu<sup>®</sup> LC - 20AD VP), detector PDA (SPDM20AVP), auto-injetor (Shimadzu<sup>®</sup> SIL - 20AD VP), forno (Shimadzu<sup>®</sup> CTO - 20A) e os cromatogramas foram determinados através do programa LC – Solution<sup>®</sup> 1.0. Foram utilizadas as seguintes condições analíticas: coluna fase reversa Shimadzu<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm) de tamanho de partícula de 5 µm; sistema de fase móvel A (água:ácido acético 95,5:4,5v/v) e B (acetonitrila 100%), com fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL; λ=325 nm. Todos os solventes utilizados foram de alta pureza.

O sistema de gradiente utilizado para a análise das amostras, encontra-se descrito abaixo (tabela 2).

Tabela 2. Sistema de gradiente utilizado para as análises de identificação da droga vegetal de *B. trimera* (LESS.) DC. por CLAE.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase móvel A (%)</b>	<b>Fase móvel B (%)</b>
0,01	85	15
15	40	60
18	0	100
21	0	100
24	85	15

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

#### 4.1.2.1. *Distribuição granulométrica da droga vegetal – granulometria*

Para a determinação da distribuição do tamanho das partículas foram utilizados 25 g da amostra e equipamento Tamisador Bertel<sup>®</sup>. O ensaio foi realizado em triplicata e seguiu metodologia descrita pelos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010). Foram utilizados tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poro (850, 600, 425, 250, 150, 90 µm) (BRASIL, 2010). Os dados foram

analisados por método gráfico, construindo-se histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas.

#### 4.1.2.2. *Perda por dessecação (umidade) e teor de cinzas totais da droga vegetal*

A análise foi realizada em triplicata utilizando três pesa-filtros chatos, previamente dessecados por 30 min nas mesmas condições do teste. Sobre eles foi adicionado cerca de 1 g da droga vegetal. Os pesa-filtro com as amostra foram levados à estufa a temperatura de 105°C por período de 2 h, sendo posteriormente resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados. O procedimento foi repetido até peso constante (BRASIL, 2010).

A quantificação do resíduo não volátil do pó de *B. trimera* foi obtida em triplicata pela determinação de cinzas totais (BRASIL, 2010), sendo os cadinhos previamente calcinados em mufla e então resfriados e pesados. A eles foram adicionados cerca de 3 g de pó da droga seca, sendo as amostras carbonizadas em bico de Bunsen e posteriormente incineradas em mufla à  $600 \pm 25$  °C até peso constante.

#### 4.1.2.3. *Prospecção fitoquímica*

Para obtenção da amostra para análise fitoquímica, o material vegetal seco foi submetido à infusão aquosa durante 45 min a 3,3% (p/v). Posteriormente, o material obtido foi resfriado e filtrado a vácuo. O infuso foi particionado seguidamente em acetato de etila e n-butanol. Aliquotas destas frações (cerca de 15 µL) foram submetidas à prospecção fitoquímica efetuada por cromatografia em camada delgada (CCD), usando-se placas de gel de sílica para cromatografia (Macherey-Nagel®). Os reagentes utilizados na caracterização dos principais grupos metabólitos secundários e padrões representativos destes grupos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Sistemas de eluição por cromatografia em camada delgada (CCD) e reagentes empregados na prospecção fitoquímica do extrato líquido de *B. trimera*.

Classe de Metabólito	Sistema de eluição	Revelador	Referência
Alcalóides	AcOEt - SHCOOH - AcOH - H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	Dragendorff	Wagner e Bladt (1996)
Cumarina	Éter - Tolueno - AcOH 10% <sup>2</sup>	UV (365nm)	Wagner e Bladt (1996)
Derivados Cinâmicos	AcOEt - SHCOOH - AcOH - H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	NEU	Wagner e Bladt (1996) NEU (1956)
Flavonóides	AcOEt - SHCOOH - AcOH - H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	NEU	Wagner e Bladt (1996) NEU (1956)
Taninos hidrolisáveis	n-BuOH - H <sub>2</sub> O - AcOH <sup>3</sup>	NEU	Xavier (2002)
Triterpenos / Esteróides	Tolueno - AcOEt <sup>4</sup>	LB	Harborne (1998)

Legenda: <sup>1</sup> 100:11:11:27 v/v; <sup>2</sup> 50:50:50 v/v; <sup>3</sup> 40:50:10 v/v; <sup>4</sup> 90:10 v/v; AcOEt = Acetato de etila, SHCOOH = Ácido Fórmico, H<sub>2</sub>O = água, UV = ultravioleta, NEU = ácido etilborilaminoestér a 1% em metanol, n-BuOH = n-butanol, LB = Lieberman e Burchard. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Adicionalmente, para a identificação de saponinas foi efetuado o teste de afrogenicidade que consiste na vigorosa agitação das soluções obtidas durante 1 min, seguido de repouso. A presença de espuma abundante e persistente após 15 min de repouso foi o critério usado para confirmar a presença de saponosídeos (COSTA, 2010). O tempo de observação da altura da espuma persistente foi estendido por 2 h após o repouso.

#### 4.1.2.4. Doseamento de ácidos cafêicos da droga vegetal de *B.trimera*

O doseamento de ácidos cafêicos foi realizado segundo monografia da espécie (BRASIL, 2010), determinado pela quantificação de ácido clorogênico na amostra por CLAE (Shimadzu<sup>®</sup>). A solução amostra de *B. trimera* foi preparada na concentração de 2,4 mg.mL<sup>-1</sup> de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5<sup>a</sup> ed. (2010). Para determinação da concentração de ácidos cafêicos foi construída uma curva de calibração com ácido clorogênico padrão (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, pureza de 99%) a partir de uma solução-mãe de 1,12 mg.mL<sup>-1</sup>. A curva analítica foi construída com as concentrações de 336, 224, 112, 84, 56, 28 e 11,2 µg.mL<sup>-1</sup>. O resultado do doseamento foi expresso em gramas de ácido clorogênico por 100 g da droga (%), considerando a perda por dessecação.

#### 4.1.2.5. *Obtenção e controle do extrato fluido de B. trimera*

Realizou-se uma infusão aquosa (45 minutos) da droga vegetal na proporção 3,3% (p/v). Como controle de qualidade desta etapa do processo, foram avaliados o pH e a densidade do extrato fluido.

#### 4.1.2.6. *Obtenção do liófilo de B. trimera*

A obtenção do extrato seco de *B. trimera* realizou-se através do extrato fluido, anteriormente descrito, que foi congelado em ultrafreezer a  $-90^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  por 24 h, e posteriormente liofilizado (Liotop<sup>®</sup>) sob pressão de 24µmm de Hg; vácuo  $220 \pm 2$  Vca. por 96 h. O produto foi acondicionado em frasco-ampola hermeticamente fechado e armazenados à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.2.7. *Doseamento de ácidos cafêicos por CLAE do liófilo de B. trimera*

Para o doseamento dos ácidos cafêicos presentes no liófilo, efetuou-se o método adaptado, e posteriormente validado, por Santos em 2015. Este ensaio teve como objetivo determinar quantitativamente o 5-CQA, 3,4-diCQA e 4,5-diCQA de acordo com as normas da Farmacopeia Brasileira 5ª edição, adotando os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), robustez

A solução amostra de extrato liofilizado foi obtida a partir de uma solução mãe de 100 mg de extrato liofilizado para balão de 100 mL em água, obtendo-se uma solução de concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A linearidade foi avaliada pelo cálculo da regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. A precisão foi avaliada pela análise do ponto médio da solução extrativa, em sextuplicata, no mesmo dia e pela análise desse mesmo extrato duas vezes em dois dias diferentes, feito por dois diferentes analistas (precisão entre-dias ou precisão intermediária). Especificidade foi verificada por determinação da recuperação do 5-CQA (ácido clorogênico), 3,4-diCQA (ácido 3,4 dicafeoilquínico), 3,5-diCQA (ácido 3,5 dicafeoilquínico) e 4,5-diCQA (ácido 4,5 dicafeoilquínico) em três diferentes concentrações e pelo cálculo do desvio padrão relativo (coeficiente de variância). O mesmo foi realizado para o extrato contaminado com o padrão do material vegetal. A seletividade foi determinada através da observação da pureza de

todos os picos, devido a posse e utilização de um detector DAD. LD e LQ foram calculados através do quociente entre o desvio padrão do coeficiente linear de três curvas de calibração obtidas para o teste da linearidade; e a média dos slopes das curvas obtidas multiplicado por três e dez, respectivamente. A robustez foi avaliada modificando o tipo de agitação visando a obtenção da solução extrativa. Três diferentes tipos de agitação foram aplicados: agitação manual, agitação magnética e sonicação, através do equipamento Sonicator Limp Sonico®.

Para avaliar se há diferenças entre os tipos de agitação, a comparação entre as médias foi realizada utilizando ANOVA one-way. Todos os tratamentos foram realizados com um intervalo de confiança de 95%.

#### 4.1.2.8. *Determinação da reologia do liófilo de B. trimera*

A densidade foi determinada através de ensaio com 10 g do extrato seco em compactador automático (Tap Density, Varian®) provido de proveta normatizada, em triplicata. O volume inicial ocupado pelo produto foi medido, e posteriormente foram realizadas 10 compactações para acomodação do pó. Em seguida, foram realizadas 1250 compactações. A relação entre a massa das amostras e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as densidades aparente (dAP) e de compactação (dCP). A compressibilidade do pó foi avaliada através do Fator de Hausner (FH) e o Índice de Carr (IC) de acordo com as seguintes equações:  $FH = dCP/dAP$  e  $IC (\%) = (dCP - dAP)/dCP \times 100$ , respectivamente (WELLS, 2005).

O ângulo de repouso foi medido pelo cone de pó formado através do escoamento da matéria-prima através de um funil de dimensões padronizadas sobre uma superfície plana munida de papel milimetrado. O ângulo formado entre o cone e a superfície foi mensurado através do cálculo da tangente. O tempo de escoamento foi determinado pela medida do tempo necessário para o escoamento de uma quantidade pré-definida de fármaco através do funil, utilizando-se um cronômetro digital (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995).

#### 4.1.2.9 *Determinação da higroscopicidade do liófilo de B. trimera*

Para determinar a estabilidade dos extratos secos frente à umidade relativa (UR) do ambiente em que se encontram, foram seguidas técnicas adaptadas de Lemos Senna e colaboradores (1997) e De Souza e colaboradores (2000).

Amostras de 0,5 g, em quadruplicata, foram acondicionadas em pesa-filtros e mantidas em dessecador, o qual garante a saturação de UR constante, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à exposição de diferentes condições de UR: 28, 74 e 95%, utilizando sílica e soluções salinas de cloreto de sódio e sulfato de zinco, respectivamente, para a saturação do ambiente. Tais condições foram confirmadas através de um termohigrômetro digital J.Prolab<sup>®</sup> modelo SH 122.

As amostras foram analisadas nos tempos: 0, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias e a porcentagem de água absorvida (% U) foi calculada em relação ao peso, em gramas, da amostra seca (Ps) e úmida (Pu), através da equação 1: (Eq.1)  $U = [(Pu-Ps)/Ps*100]$ .

#### 4.1.3. *Sulfato de Hidroxicloroquina (SHC)*

O SHC foi adquirido da FAGRON<sup>®</sup> do Brasil Farmacêutica Ltda., lote 0007HS4RIICX#7 e sintetizado pela indústria Sanofi-Aventis<sup>®</sup>, enquanto o padrão analítico foi adquirido da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, lote #022M4749V.

##### 4.1.3.1. *Identificação do SHC - espectrofotometria de absorção na região do Infravermelho (IV) com transformada de Fourier e do Ultravioleta (UV) e Espectroscopia Raman por transformada de Fourier.*

O espectro de infravermelho por transformada de Fourier foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer<sup>®</sup> (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. As amostras foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR, sendo o resultado obtido da média de 16 varreduras entre 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  (CHAVES et al., 2013).

Para a obtenção da varredura de 200 a 500 nm por espectrofotometria na região UV /utilizou-se espectrofotômetro ultravioleta da marca SHIMADZU<sup>®</sup> UV-2401 PC e cubetas de quartzo de seção transversal de 1 cm.

O espectro de espalhamento Raman por transformada de Fourier foi obtido em espectrômetro Bruker<sup>®</sup>, modelo Vertex 70 acoplado ao módulo RAM II, tendo como fonte de excitação um laser de Nd:YAG emitindo em 1064 nm, com 150 mW de potência de saída. A resolução espectral foi ajustada em 4  $\text{cm}^{-1}$ , e a relação sinal/ruído foi otimizada fazendo-se 100 varreduras na faixa de número de onda de 70  $\text{cm}^{-1}$  a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com detecção em 180 graus.

#### 4.1.3.2. *Método analítico para doseamento do SHC*

O método analítico para quantificação do SHC desenvolvido por Ferraz (2014) foi obtido a partir de adaptações à metodologia descrita em monografia específica na Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013) referente à quantificação do fármaco.

A otimização foi proposta visto que o método farmacopeico não se demonstrou reprodutivo, apresentando cromatograma com pico bastante assimétrico. Sugere-se que o valor indesejável do fator de cauda (diferente de 1) se deva à coeluição dos isômeros da SHC presentes na mistura racêmica. Além disso, o tempo de retenção de mais de 1 hora inviabilizaria a utilização do método na prática laboratorial (FERRAZ, 2014).

#### 4.1.3.3. *Preparo da solução-padrão*

Preparou-se uma solução do padrão analítico do SHC em metanol e água (1:1 v/v), a fim de se obter uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, uma alíquota desta solução foi diluída em fase móvel USP até atingir a concentração de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>

#### 4.1.3.4. *Preparo da solução-amostra*

A fim de obter uma solução de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, o SHC foi dissolvido em metanol e água (1:1 v/v) e mantidos em ultra-sons, em agitação intermitente, durante 15 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada até à temperatura ambiente e uma alíquota foi diluída em fase móvel USP até atingir a concentração de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.1.3.5. *Descrição e tamanho de partícula do SHC*

A matéria-prima foi visualizada a olho nu, para verificação do aspecto e cor. Para a determinação da distribuição do tamanho das partículas do SHC seguiu-se metodologia descrita anteriormente (item 4.1.1.2). Foram utilizados tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poro (600, 500, 250, 150, 90, 44 µm) (BRASIL, 2010).

#### 4.1.3.6. *Propriedades de fluxo do SHC*

A avaliação da reologia do SHC foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita no item 4.1.2.8.

#### 4.1.3.7. *Análise de umidade do SHC*

Para analisar a umidade residual da matéria-prima foi utilizado analisador de umidade eletrônico Sartorius® (modelo MA35). Amostras de 0,5 g foram depositadas na balança do equipamento e submetidas ao aquecimento até que o peso se observasse constante. A análise foi realizada em triplicata.

### **4.2 Toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub> absoluta**

Foram utilizados camundongos albinos swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 2-3 meses e pesando entre 25 e 35 g, oriundos do Biotério Setorial da Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF), Campus Petrolina. Os animais foram mantidos em condições controladas (22-24 °C; ciclo 12 h escuro/claro) e receberam água e a ração (Labina® - Purina) *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIVASF – sob o nº de protocolo 0005/070813 (ANEXO 1).

#### **4.2.1. Ensaio preliminar de toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub>**

##### *4.2.1.1* Ensaio preliminar

Como esta abordagem de toxicidade é de caráter inovador (associação entre fármaco sintético e insumo vegetal), efetuou-se um experimento preliminar, com o intuito de avaliar toxicidade das substâncias separadamente, e posteriormente em associação.

8 grupos de camundongos de ambos os sexos (n=6/grupos), receberam uma única dose, sendo: 2000 mg/kg por via oral de SHC e 2000 mg/kg de *B. trimera*, SHC e *B. trimera* isoladamente, e água destilada (grupo controle). Durante o tratamento, os animais foram observados diariamente durante 14 dias e acompanhados quantos aos sinais clínicos de

toxicidade, consumo de água e ração, registro de mortalidade, de acordo com o guia de estudos não clínicos do Brasil (2013).

#### 4.2.1.2 Determinação da $DL_{50}$ absoluta

Foram utilizados 10 grupos de camundongos de ambos os sexos ( $n = 6/\text{grupos}$ ) que receberam uma única dose da associação em dose fixa em diferentes concentrações de seus constituintes, de acordo com a tabela 6.

Tabela 6. Esquema de tratamento para determinação da toxicidade aguda ( $DL_{50}$ ) do SHC na ADF.

Esquema de tratamento
SHC+ <i>B. trimera</i> (2000mg/Kg+2000mg/Kg)
SHC+ <i>B. trimera</i> (1000mg/Kg+50mg/Kg)
SHC + <i>B. trimera</i> (750mg/Kg+30mg/Kg)
SHC + <i>B. trimera</i> (500mg/Kg+25mg/Kg)
SHC + <i>B. trimera</i> (300mg/Kg+10mg/Kg)

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Durante o tratamento, os animais foram observados diariamente durante 14 dias e acompanhados quanto aos sinais clínicos de toxicidade, consumo de água e ração e presença ou ausência de morte (BRASIL, 2013).

A determinação da dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) foi obtida através da interpolação semilogarítmica dos valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes pelas doses administradas de produto (BLISS, 1935).

### 4.3 Avaliação da Toxicidade crônica

As doses utilizadas em estudos de administrações repetidas geralmente são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses. Geralmente, três doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e não-roedores ou as situações particulares discutidas no item “dosagem” dos estudos de toxicidade de dose única. As demais doses são estabelecidas em sequência (ANVISA, 2013).

Oito grupos de camundongos, quatro de machos e quatro de fêmeas (n=6/grupo), foram tratados por via oral durante 90 dias consecutivos com água destilada (controle), ADF nas doses 150-4,2 mg/Kg, 300-10mg/Kg e 500-30 mg/Kg (SHC - liófilo de *B. trimera*, respectivamente). A conversão da dose utilizada em humanos (SHC) para a espécie animal utilizada no estudo, foi realizada de acordo com REAGAN, NIHAL & AHMAD (2007), bem como, a dose efetiva para o insumo vegetal foi determinada mediante revisão da literatura (COELHO et. al., 2004; NOGUEIRA et. al 2011)

Durante todo o tratamento, a massa corpórea dos animais foi registrada à cada cinco dias e os grupos avaliados diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade, como: piloereção, sialorréia, consumo de água e ração e atividade comportamental.

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos à jejum de 08 horas e anestesiados com xilazina e ketamina *i.m.* 5-90 mg/Kg, respectivamente. Em seguida, procedeu-se a coleta de sangue pelo plexo braquial. O sangue coletado foi colocado em tubos eppendorf com EDTA, para determinação dos parâmetros hematológicos, e sem para análise bioquímica.

#### 4.3.1. *Parâmetros Hematológicos*

Para análise hematológica, os parâmetros foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (CSHCM) leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas.

#### 4.3.2. *Parâmetros Bioquímicos*

Para análise bioquímica os parâmetros analisados foram: glicose, colesterol triglicérides, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e albumina.

#### 4.3.3. *Análise macroscópica dos órgãos*

Para análise macroscópica dos órgãos, foram coletados: coração, pulmão, fígado, rins, estômago, pâncreas e baço de todos os animais. Os órgãos foram lavados imediatamente com solução salina (0,9%). Posteriormente, tiveram suas massas úmidas determinadas em balança

analítica. O material também foi avaliado quanto à coloração, aspecto e tamanho, utilizando o material do grupo controle como padrão.

#### **4.4 Modelos experimentais de artrite reumatóide**

Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar o desenvolvimento de protocolos de indução de artrite em roedores, utilizando-se de técnicas já consagradas na literatura.

##### *4.4.1. Animais*

Nestes experimentos, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com idades compreendidas entre 2-3 meses e pesando entre 30 e 35 g, oriundos do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – FIOCRUZ, Salvador - BA e ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar<sup>®</sup> de ambos os sexos com idades compreendidas entre 6-7 meses e pesando entre 200-250g, fornecidas pelo biotério da Univasf. Os animais foram mantidos nas mesmas condições dos animais utilizados nos estudo de toxicidade aguda, bem como os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIVASF – sob o nº de protocolo 0005/070813. (ANEXO 1).

##### *4.4.2. Preparo da Emulsão Indutora (EI) – Camundogos*

Em um béquer (50 mL), dissolveu-se colágeno tipo II (CII) em ácido acético (0,1 M) para um concentração final de 4 mg/mL em banho de gelo. Em seguida, a cartilagem dissolvida, foi emulsificada com o adjuvante completo de Freund na proporção 1:1 (v/v), também em banho de gelo, e mantida em temperatura de -20 °C até a hora de sua utilização (WILLIAMS, 2007).

##### *4.4.3. Preparo da emulsão indutora (EI) – Ratos*

Com o auxílio de grau e pistilo, a *Mycobacterium tuberculosis* morta e desidratada foi dissolvida em adjuvante completo de Freund para uma concentração final de 10 mg/mL e acondicionada em temperatura controlada de 4 °C.

#### 4.4.4. *Protocolo Experimental*

##### 4.4.4.1 *Camundongos machos*

Dez animais foram divididos em dois grupos (n=5/grupo), grupo controle (artrite induzida por cartilagem). Estes animais foram submetidos a um estudo-piloto para avaliação da reprodutibilidade do protocolo experimental de indução de artrite (WILLIAMS, 2007).

Primeiramente, os animais foram anestesiados com Xilazina e Ketamina, feita a tricotomia da base da calda e assepsia do local da imunização com álcool à 70%. Em seguida, imunizados na base da calda com a administração intradérmica (100 µL) da emulsão indutora (EI). Vinte e um dias após a imunização, os animais receberam um “booster”, uma nova aplicação (100 µL) por via intraperitoneal de apenas CII (100 µg), dissolvida em ácido acético à 0,1 molar. (WILLIAMS, 2007).

Durante 120 dias, os animais foram monitorados diariamente e classificados quanto surgimento das seguintes alterações articulares: 0 – normal, 1– ligeiramente inchado e/ou eritema, 2 – edema pronunciado e 3 – Anquilose (rigidez articular).

A mensuração do protocolo experimental foi feita através do cálculo do índice de artrite (IE), o qual foi determinado pela variação de líquido deslocado pela pata do animal, calculado pelo pletismômetro (à cada cinco dias), determinado pela equação a seguir:

Eq.1

$$IA \% = \frac{\text{volume da pata traseira dia X} - \text{volume da pata traseira dia 0}}{\text{Volume da pata traseira dia 0}} \times 100$$

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

##### 4.4.4.2 *Ratos machos e fêmeas*

Sessenta ratos de ambos os sexos foram divididos aleatoriamente em cinco, dez e doze grupos (n=5/grupo): Estes animais foram submetidos a um protocolo experimental que teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.

Os animais foram anestesiados com Xilazina e Ketamina, feita a tricotomia da base da calda e assepsia do local da imunização com álcool à 70%. Em seguida, imunizados na base da calda com a administração intradérmica (100 µL) da emulsão indutora (EI).

Durante 36-40 dias, os animais foram monitorados diariamente e classificados quanto surgimento das seguintes alterações articulares: 0 – normal, 1– ligeiramente inchado e/ou eritema, 2 – edema pronunciado e 3 – Anquilose (rigidez articular).

A mensuração do protocolo experimental foi feita através do cálculo do índice de artrite (IE), o qual foi determinado pela variação de líquido deslocado pela pata do animal, calculado pelo pletismômetro (à cada três dias), determinado pela equação 1 já descrita anteriormente.

#### **4.5 Obtenção da forma farmacêutica cápsula**

Esta seção descreve o processo de otimização da forma farmacêutica (FF) cápsula, contendo o liófilo de *B. trimera* em associação com o SHC, tendo como objetivo avaliar a reprodutibilidade da FF desenvolvida por Santos em 2015, porém em escala piloto.

##### *4.5.1 Material*

Para obtenção da FF, foi utilizado o liófilo de *B. trimera*, obtido de acordo com o item 4.1.1.7 deste trabalho. O SHC foi adquirido da FAGRON<sup>®</sup> do Brasil Farmacêutica Ltda., lote 0007HS4RIICX#7 e sintetizado pela indústria Sanofi-Aventis<sup>®</sup>. Os excipientes utilizados foram celulose microcristalina (lote 145012388, Microcel<sup>®</sup>), amido parcialmente pregelatinizado (lote 16910, Starch<sup>®</sup>), estearato de Magnésio (lote 255971#6, Magnesia GM<sup>®</sup>), dióxido de silício coloidal (lote 3158071326, Degussa<sup>®</sup>) e talco (lote N-800623, Magnesia GM<sup>®</sup>). Os equipamentos de produção utilizados foram: Balança semianalítica (Shimadzu<sup>®</sup>), Misturador em “V” e Encapsuladeira manual (Multilabor<sup>®</sup>).

##### *4.5.2 Obtenção farmacotécnica das cápsulas*

Para avaliar a reprodutibilidade da obtenção da ADF em escala piloto, cápsulas foram planejadas para conter 20 mg do extrato liofilizado de *B. trimera* e 200 mg do SHC.

Desenvolveu-se um Lote piloto (LP) de 600 cápsulas planejadas para peso médio de conteúdo de 322 mg. Para uniformizar o tamanho de partícula foi utilizado tamis com abertura de malha 590 µm.

Inicialmente, para obtenção do LP, misturou-se o liófilo de *B. trimera* e o dióxido de silício coloidal por cinco minutos. Em seguida, o SHC com a celulose microcristalina, igualmente por cinco minutos, e na sequência, o estearato de magnésio e o talco. Por fim, as misturas prévias foram homogeneizadas. O produto foi encapsulado em invólucro “0” branco e verde (Capsugel<sup>®</sup>) e acondicionado em recipiente de polietileno hermeticamente fechado.

Tabela 5 - Percentual dos componentes utilizados na formulação de cápsulas contendo o liófilo de *B. trimera* (Less.) DC. e SHC para o LP.

<b>Componentes</b>	<b>LP(%)</b>
Liófilo de <i>B. trimera</i>	6,0
Sulfato de Hidroxicloroquina	62,0
Celulose microcristalina - 102 (Microcel <sup>®</sup> )	28,0
Dióxido de silício coloidal (Degussa <sup>®</sup> )	3,0
Estearato de Magnésio (Magnesia GM <sup>®</sup> )	0,70
Talco (Magnesia GM <sup>®</sup> )	0,30

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

#### 4.6 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados obtidos para a avaliação da obtenção da FF cápsula em escala piloto foi analisado por meio do teste T de *Student*.

As variáveis quantitativas (desempenho ponderal de massa corpórea, parâmetros bioquímicos e hematológicos, índice de artrite (IE) e massas dos órgãos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (epm) analisados pela análise da variação (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni. Os valores obtidos para consumo de água e ração foram analisados através do teste *t* não paramétrico. O nível de significação foi estabelecido em  $p < 0.05$ . As análises estatísticas foram executadas utilizando software GraphPad Prism 5<sup>®</sup>.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

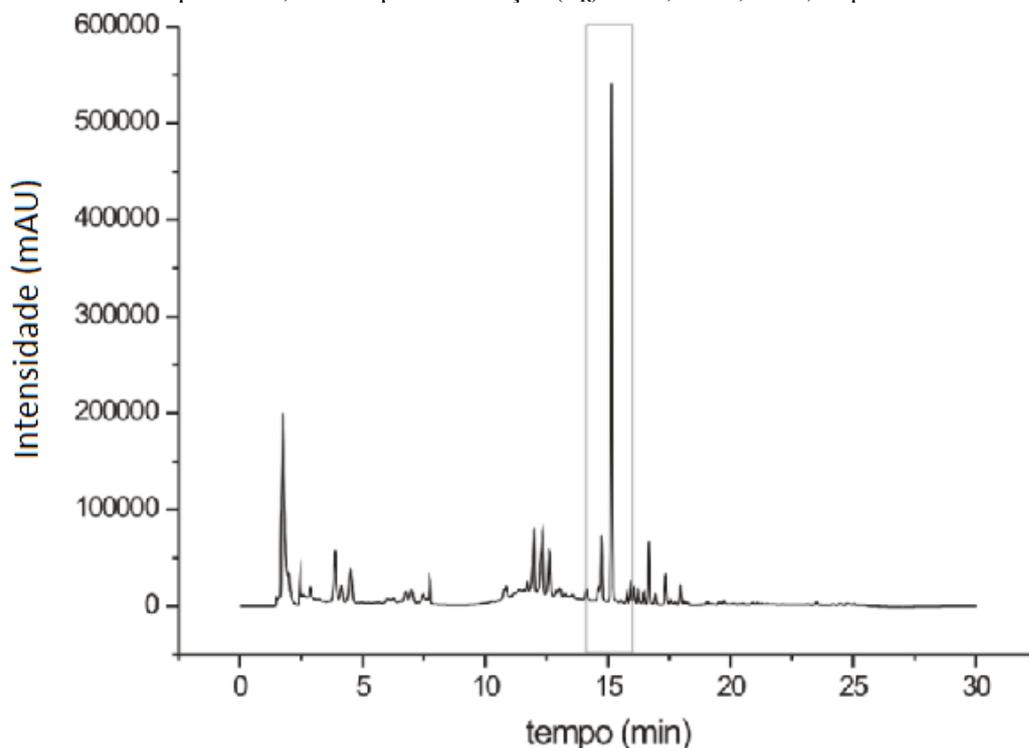
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da associação em dose fixa do SHC e o líófilo de *B. trimera*

#### 5.1.1 Identificação dos marcadores químicos de *B. trimera*

A partir da análise realizada no ensaio de identificação química da droga vegetal, obteve-se o cromatograma abaixo (figura 1). Neste, foi possível demonstrar os picos referentes à quercetina e 3-O-metil-quercetina, nos tempos de retenção ( $T_R$ ) de 14,7 e 15,1 min, respectivamente.

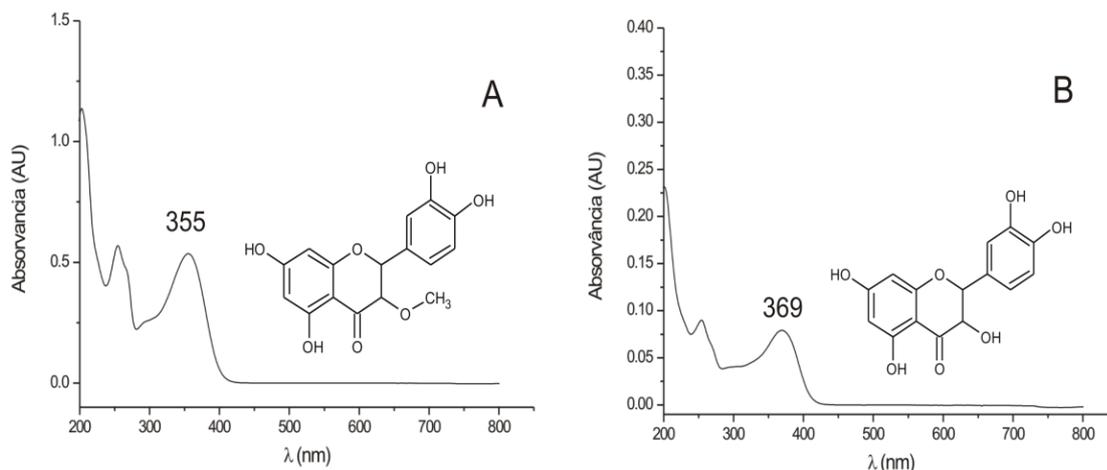
Figura 1. Cromatograma de identificação da droga vegetal de *B. trimera* com os picos referentes a quercetina e 3-O-metil-quercetina, nos tempos de retenção ( $T_R$ ) de 14,7 e 15,1 min, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os espectros de varredura obtidos por detector DAD dos marcadores indicaram que a quercetina em 369 nm, enquanto que a 3-O-metil-quercetina tem absorção característica em 355 nm, (figura 2). Esse resultado corresponde aos dados relatados na literatura (BRASIL, 2010; BORGIO et al., 2010).

Figura 2. Espectros de absorção da 3-O-metil-quercetina (A) e quercetina (B) no extrato aquoso de *B. trimera*.

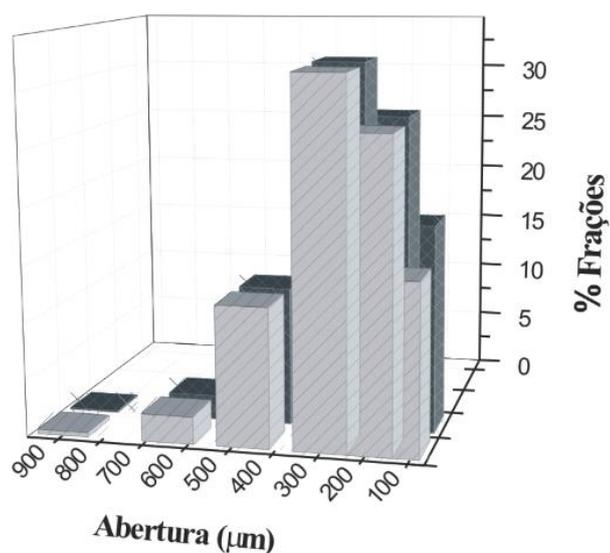


Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

### 5.1.2 Distribuição granulométrica da droga vegetal - granulometria

O resultado do tamanho de partícula analisado através do histograma de distribuição granulométrica do pó de *B. trimera* (figura 3), demonstrou que as partículas do material vegetal ficaram predominantemente retidas no intervalo entre 250 e 350  $\mu\text{m}$  55% de todo material.

Figura 3. Histograma de distribuição granulométrica da droga vegetal *B. trimera*.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O tamanho médio das partículas determinado a partir do ponto de interseção das curvas de retenção e passagem foi de  $239,5\mu\text{m} \pm 9,5$  (CV% 4,0). Seguindo critérios farmacopeicos, os resultados do ensaio de determinação granulométrica classificaram o pó como semifino. Esta determinação é de extrema relevância, visto que o estado de divisão da droga vegetal é um dos principais fatores que interferem na eficiência do processo de extração.

### 5.1.3 Perda por dessecação (umidade) e teor de cinzas totais da droga vegetal

Os resultados dos testes de determinação de perda por dessecação e teor de cinzas totais estão expressos na tabela 7.

Tabela 7. Perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de *B. trimera* lote piloto (LP) e do lote de bancada (LB).

Ensaio	LP (% $\pm$ DP*)	LB(% $\pm$ DP*)
Perda por dessecação	8,8 $\pm$ 1,18	8,5 $\pm$ 1,23
Teor de cinzas totais	5,5 $\pm$ 0,69	5,5 $\pm$ 0,67

DP\*: desvio padrão. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A perda por dessecação da droga vegetal, indicativo do teor de material volátil do vegetal e, indiretamente da umidade residual, o qual se encontra dentro do limite estabelecido pela farmacopeia que é 12% (tabela 7), indicando uma boa conservação e uma secagem eficiente da matéria-prima vegetal. Esta determinação é importante para o controle de qualidade microbiológico, pois um excesso de água na droga vegetal favorece o crescimento de fungos e bactérias, podendo também levar à hidrólise de seus constituintes (SHARAPIN, 2000).

O teor de cinzas totais estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis, obtidas por incineração, representando a soma de material inorgânico integrante da espécie com as substâncias aderentes de origem terrosa (BRAGA et al., 2007; SIMÕES et al., 2007). O resultado da determinação de cinzas totais, apresentou-se dentro do limite estabelecido pela monografia da *B. trimera*, descrita na Farmacopeia Brasileira (8%), indicando não possuir excesso de contaminantes, como terra e/ou areia.

#### 5.1.4 Prospecção fitoquímica

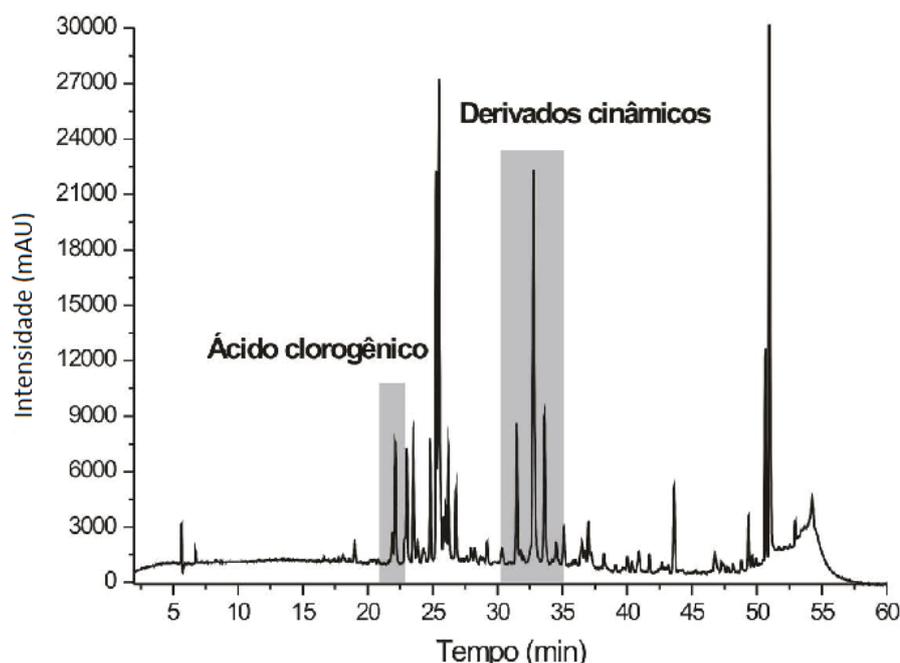
Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica revelaram a presença de flavonóides, saponinas, triterpenos, mono, di e sesquiterpenos e derivados cinâmicos, a partir da presença de bandas correspondentes aos padrões analíticos. Sendo negativo para cumarinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, taninos gálicos, alcalóides. Nenhuma amostra analisada mostrou a presença de alcaloide, resultado também obtido por outros autores anteriormente (MENDES; CARLINI, 2007; TASCHETTO, 2010).

O teste de afrogeniciade foi positivo, onde ocorreu abundância, persistência e altura da espuma compatível com o método utilizado, indicando a presença de saponinas (SIMÕES-PIRES et al., 2005).

#### 5.1.5 Determinação de ácidos cafêicos da droga vegetal

O perfil cromatográfico da droga vegetal está representado na figura 4. A concentração de ácidos cafêicos foi de  $9 \text{ mg.g}^{-1}$  na droga vegetal. Com base nos tempos de retenção relativos descritos para o método na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), foi possível confirmar os tempos no cromatograma obtido, sendo eles: ácido clorogênico = 1 (Tr = 20,7 min), 3,4-dicafeoilquínico = 1,45 (Tr = 31,5 min); 3,5-dicafeoilquínico = 1,51 (Tr = 32,8 min) e 4,5-dicafeoilquínico = 1,54 (Tr = 33,6 min).

Figura 4. Perfil cromatográfico dos ácidos cafêicos de *B. trimera*



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Vários trabalhos citam a importância farmacológica desses ácidos cafêicos, incluindo atividade anti-oxidante (CHUDA et al., 1996), hepatoprotetora (BASNET et al., 1996), antibacteriana (SHOLZ; HEINRICH; HUNKLER, 1994), anti-inflamatórios (GONGORA, 2002), e antiviral (MATSINGOU et al., 2000) atribuída a esses derivados do ácido quínico, justificando a utilização destes como marcadores da espécie.

#### *5.1.6 Obtenção e controle do extrato fluido*

A obtenção do extrato fluido por infusão possibilitou a posterior obtenção do extrato seco a ser utilizado como matéria prima para obtenção de formas farmacêuticas sólidas. Nesse sentido o controle desta etapa se faz de extrema relevância. A extração permitiu a obtenção de 3 L de extrato fluido com pH de 5,39 e densidade de 1,06 g.mL<sup>-1</sup>.

#### *5.1.7 Obtenção do líofilo*

A partir do processo de secagem por liofilização do extrato fluido, obtido possível obter extrato seco com um rendimento de 9% (p/p). Rendimento semelhante foi encontrado no trabalho de Coelho et al. (2004), que utilizou o mesmo procedimento para obtenção do extrato liofilizado que posteriormente foi testado em relação a atividade antiartrítica da espécie.

#### *5.1.8 Determinação dos ácidos cafeicos por CLAE*

Os resultados obtidos para a análise de ácidos cafêicos e ácido clorogênico no extrato seco de *B. trimera* encontram-se de acordo com os demonstrados pelo método adaptado e validado por Santos em 2015. Os valores encontrados para os parâmetros analisados, encontram-se demonstrados na tabela 8 e 9.

Tabela 8. Equações de regressão, determinação dos limites de detecção e quantificação por CLAE dos ácidos cafêicos presentes líófilo de *B. trimera* (LP).

Composto	Equação linear	R <sup>2</sup>	LD (mg/mL)	LQ (mg/mL)
Ácido 5-cafeoilquínico	$f(x) = 223028,88 x - 44767,86$	0,996	0,30	1,00
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	$f(x) = 265491,29 x - 5612,43$	0,998	0,61	2,05
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	$f(x) = 612543,77 x - 24339,46$	0,994	0,65	2,19
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	$f(x) = 243624,90 x - 18684,20$	0,992	0,63	2,10

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: LD – limite de detecção. LQ – Limite de quantificação.

Tabela 9. Precisão para o método de quantificação de ácidos cafêicos presentes no líófilo *B. trimera* (LP).

Composto	Precisão Intra-dias		Precisão Inter-dias	
	F cal	F tab	F cal	F tab
Ácido 5-cafeoilquínico	0,183502	18,51282	1,171079	18,51282
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	0,183502	18,51282	1,171079	18,51282
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	0,399359	18,51282	5,989541	18,51282
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	3,960243	18,51282	0,403206	18,51282

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A padronização obtida para esse extrato é 0,2 mg de ácidos cafeicos em 1g do extrato de extrato seco.

#### 5.1.9 Determinação da reologia do líófilo

Na determinação das propriedades reológicas, o extrato seco por liofilização de *B. trimera* apresentou-se como um pó de bom escoamento quando relacionado apenas o ângulo de repouso. Considera-se que um pó tem boas propriedades de escoamento quando possui

ângulo de repouso igual ou inferior a 30°. Ângulos superiores a 40° sugerem difícil fluxo (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995). O tempo de escoamento do pó apresentou-se como infinito, já que o líofilo é pouco denso, com grande área superficial, o que resulta em grande variação entre a densidade aparente e compactada do extrato seco.

Wells (2005) classifica os pós de acordo com o índice de Carr como: fluxo excelente (5-15%); fluxo bom (12-16%); favorável a intolerável (18-21%); fluxo fraco (23-35%); muito fraco (33-38%) e fluxo extremamente fraco (maior que 40%). Ainda segundo esse autor, pós com fator de Hausner menor que 1,25 indicam bom fluxo e acima desse valor, mau fluxo. Os índices de Carr e fator de Hausner obtidos no teste demonstram que o pó de *B. trimera* necessita de excipientes como diluentes e lubrificantes que incrementem suas propriedades de fluxo para obtenção de forma farmacêutica sólida, visto suas características de fluxo fraco, inerentes a um extrato vegetal seco obtido por liofilização (tabela 10).

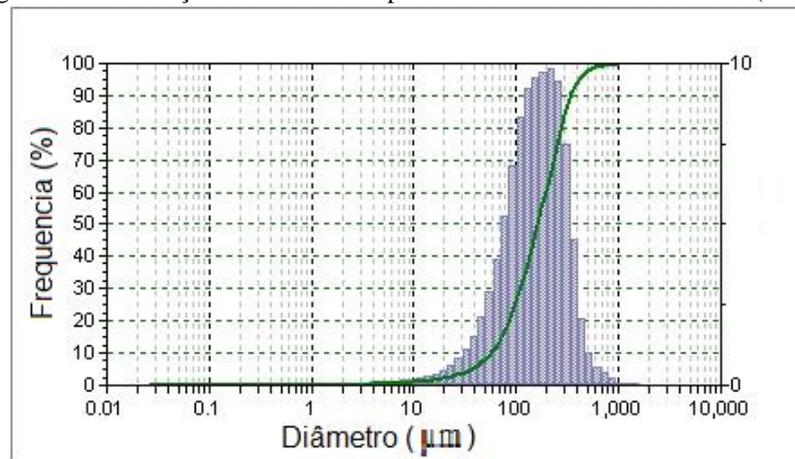
Tabela 10. Propriedades reológicas do líofilo de *B. trimera*, representando a média dos resultados obtidos para o Lote piloto (LP) em comparação ao Lote de bancada (LB)

<b>Propriedades</b>	<b>LP</b>	<b>LB</b>
Densidade aparente	0,25g.mL <sup>-1</sup>	0,24 g.mL <sup>-1</sup>
Densidade compactada	0,39 g.mL <sup>-1</sup>	0,38 g.mL <sup>-1</sup>
Fator de Hausner	1,56	1,58
Índice de Carr	25,10	25,16
Ângulo de repouso	28,5°	27,81°
Tempo de escoamento	Infinito	Infinito

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A granulometria de pós, aliada à outras propriedades físicas, permite inferir sobre a influência destas características nos processos de desenvolvimento de um produto farmacêutico. Os dados da análise de distribuição granulométrica mostraram que a amostra apresentou diâmetro médio das partículas de 188,8 µm sendo classificado como um pó fino de acordo com a figura 6.

Figura 6. Distribuição do tamanho de partículas do liófilo de *B. trimera* (LP).



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

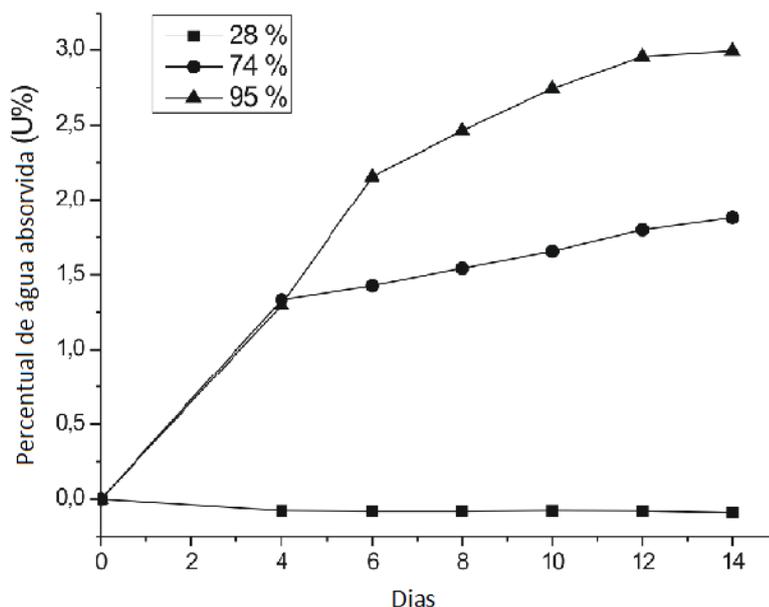
Logo, neste caso, prevê-se que as partículas terão maior propensão à adsorção de umidade e, por conseguinte, podem levar à formação de aglomerados de partículas (BELLAMY et al., 2008).

#### 5.1.10 Determinação da higroscopicidade do liófilo

A umidade é um fator que influencia a estabilidade físico-química e microbiológica dos materiais sólidos pulverulentos, além de poder afetar as características reológicas do produto que são essenciais no desenvolvimento de uma formulação farmacêutica sólida (CHAVES; COSTA; FREITAS, 2009).

As propriedades higroscópicas do liófilo de *B. trimera* foram determinadas pela sorção de água em diferentes condições de umidade. As curvas de sorção de umidade em função do tempo obtidas para UR de 28, 74 e 95% estão representadas na figura 7.

Figura 7. As curvas de sorção de umidade do líofilo de *B. trimera*.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Verificou-se que a absorção de umidade pelas amostras testadas variou em função do teor de umidade do ambiente e do tempo de exposição do extrato a determinada umidade, observando um aumento da umidade absorvida à medida que se aumentou as condições supracitadas. Houve, ao fim de 14 dias, um aumento de aproximadamente 1,8 e 3,0% do peso das amostras nas condições de 74 e 95% de UR, respectivamente, proveniente de absorção de água. Os resultados garantem uma adequada segurança quanto à estabilidade físico-química do extrato seco frente à umidade, já que, mesmo em condições extremistas de UR, o ganho de peso devido absorção de água não é tão significativo e inferior aos 12% estabelecido como limite máximo de umidade (BRASIL, 2010).

#### 5.1.11 Identificação do SHC

A identidade do SHC pôde ser comprovada através da corroboração dos resultados obtidos das diversas metodologias aplicadas. Para isso, foram utilizadas: espectrofotometria de absorção na região do IV e do UV e o espectro de Raman.

Bastante utilizado como ferramenta no controle de qualidade de medicamentos, os espectrofotômetros de IV e Raman oferecem procedimento simples e rápido capaz de identificar pequenas diferenças estruturais entre as moléculas, exceto quando estas estão envolvidas com isomeria óptica. Assim, por se tratar de um sal de mistura racêmica, a molécula de SHC pode apresentar distinções nas bandas características do seu espectro.

A seleção do melhor método depende do princípio da técnica. A absorção no IV corresponde à variação do momento de dipolo da molécula, enquanto o espalhamento Raman, à variação da polarizabilidade. Dessa forma, os espectros de Raman e IV são complementares, embora haja casos de baixa simetria molecular existam bandas nas mesmas posições, variando somente a intensidade. Geralmente, vibrações simétricas e grupos não-polares fornecem as bandas de espalhamento de Raman mais intensas, enquanto vibrações assimétricas e grupos polares fornecem bandas de absorção mais intensas no IV (STEPHENSON et al., 2001; SPONG et al., 2004;).

O espectro de absorção na região do IV do SHC (Figura 8.a) apresenta picos característicos dos seus principais grupos funcionais. Foi possível observar: a deformação axial do álcool (-OH) e deformações N-H, típicas de amins secundárias e terciárias; as bandas referentes aos estiramentos das ligações C-H estão na região compreendida entre 3100 e 2500  $\text{cm}^{-1}$ , estando sobrepostas por uma banda alargada referente a interações intermoleculares entre as ligações de hidrogênio; as bandas específicas relacionadas às deformações simétrica e assimétrica (S=O, oriundas do sulfato); além do pico característico do halogênio ligado ao átomo de carbono (C-Cl). Não foi possível distinguir e especificar as bandas específicas de hidrogênios aromáticos e da deformação axial da ligação C-N, devido à intensa sobreposição de picos (região entre 950 – 1150  $\text{cm}^{-1}$ ). A tabela 11 mostra as principais bandas relacionadas aos respectivos tipos de vibração da ligação, região esperada e grupos funcionais. A enumeração correlaciona os valores das bandas e suas respectivas posições no espectro.

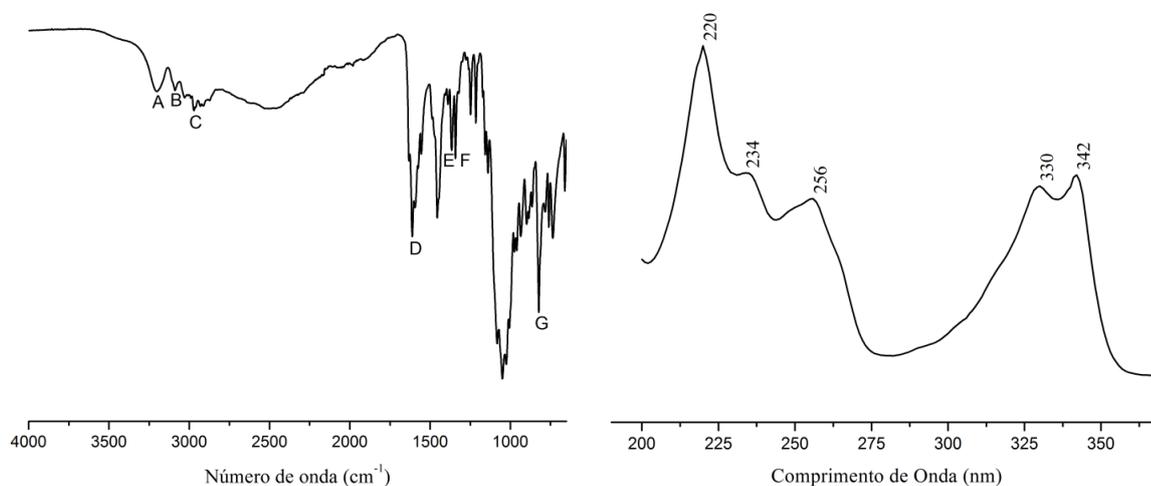
Tabela 11. Correlação entre as bandas, tipos de vibração da ligação e seus respectivos grupos funcionais, obtido do espectrograma de infravermelho do SHC.

<b>Banda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tipo de Vibração da Ligação</b>	<b>Região Esperada</b>	<b>Grupo Funcional</b>
A – 3202	Deformação axial –OH	3584 – 3650 cm <sup>-1</sup>	Álcool
B – 3028	Deformação axial N-H de heteroátomo	3310 – 3350 cm <sup>-1</sup>	Anel heterocíclico
C – 2970	Deformação axial C-H de compostos aromáticos	2950 – 3100 cm <sup>-1</sup>	Esqueleto aromático
D – 1611	Deformação axial do anel (bandas do esqueleto) C=C e C=N	1580 – 1670 cm <sup>-1</sup>	Compostos aromáticos e alcenos
E – 1365	Deformação axial assimétrica S=O	1177 – 1386 cm <sup>-1</sup>	Sulfato
F – 1342	Deformação axial simétrica S=O	1177 – 1386 cm <sup>-1</sup>	Sulfato
G – 822	Deformação axial C-Cl alifática	550 – 850 cm <sup>-1</sup>	Cloro

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A varredura espectrofotométrica do SHC (Figura 8.b) mostrou 5 máximos de absorção nos seguintes comprimentos de onda: 220, 234, 256, 330 e 342 nm. Tais valores correspondem à presença de grupos cromóforos presentes na molécula. Esta última e maior delas é atribuída ao grupo quinolínico (USP 36 – NF 31, 2013)

Figura 8. (a) Espectro de absorção na região do infravermelho e (b) Espectro de absorção na região do ultravioleta do SHC.

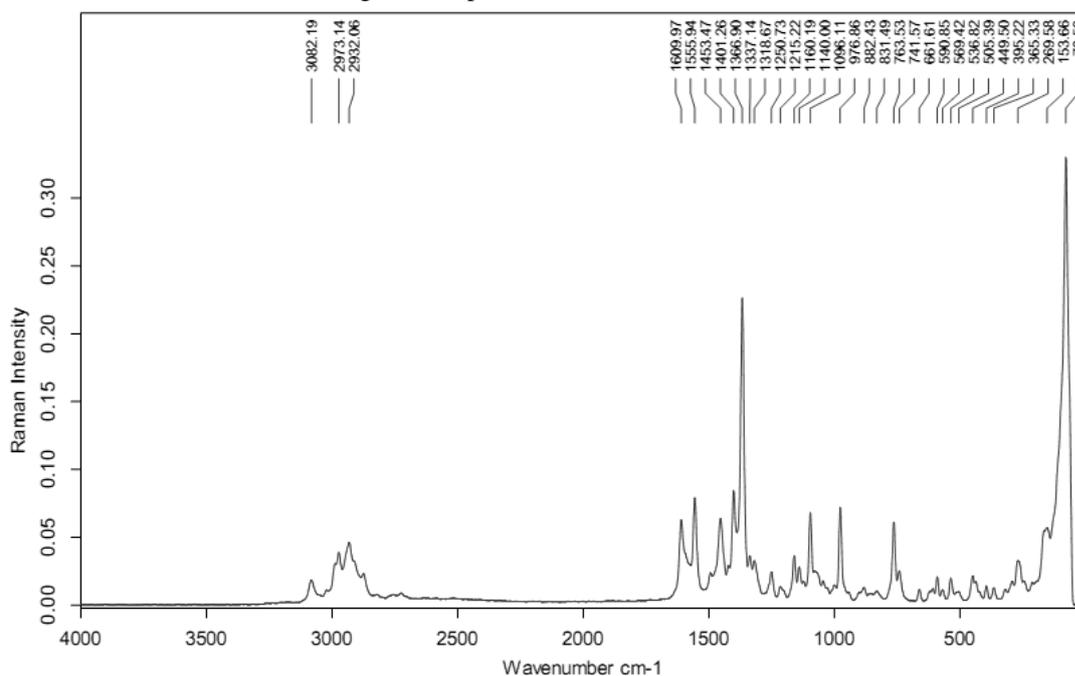


Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A interação da molécula de SHC com o ânion sulfato e com as ligações de hidrogênio intermoleculares foi observada na região entre 2250 – 2750  $\text{cm}^{-1}$ . O deslocamento e somação das bandas de amina e hidroxila sugerem que as ligações supracitadas ocorrem nesses grupos funcionais ou, pelo menos, próximos a eles (ROLIM, 2012).

O espectro de Raman (Figura 9) foi utilizado a fim de corroborar a afirmação supracitada. De fato, a alteração nas bandas de amina e hidroxila foi evidenciada, uma vez que, no espectro Raman, não houve aparecimento de bandas na região compreendida entre 2250 – 2750  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 9. Espectro de Raman do SHC.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

#### 5.1.12 Doseamento do SHC

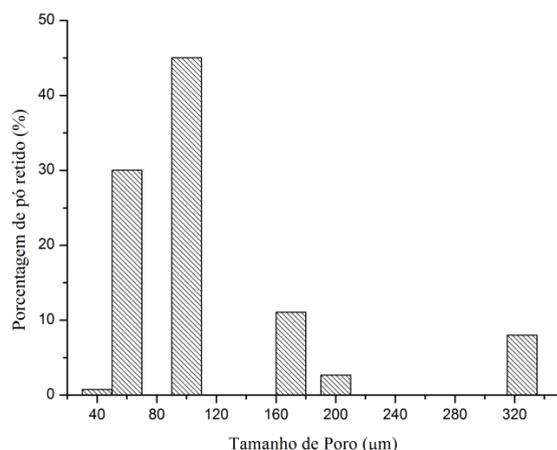
O SHC farmacologicamente ativo é uma mistura racêmica de dois isômeros ópticos que são quantificados sem separação quiral, havendo, então, a co-eluição destes. Portanto, o princípio determinante da otimização do método analítico para determinação de teor foi o fator de cauda do pico resposta referente ao SHC o método analítico foi otimizado partir da aplicação do método otimizado e validado por Ferraz em 2014 foi possível realizar a análise de teor do SHC, demonstrando resultado satisfatório (99,18%) dentro do intervalo preconizado pela monografia específica do fármaco na Farmacopeia Americana (USP 36 – NF 31, 2013).

#### 5.1.13 Descrição e tamanho de partícula do SHC

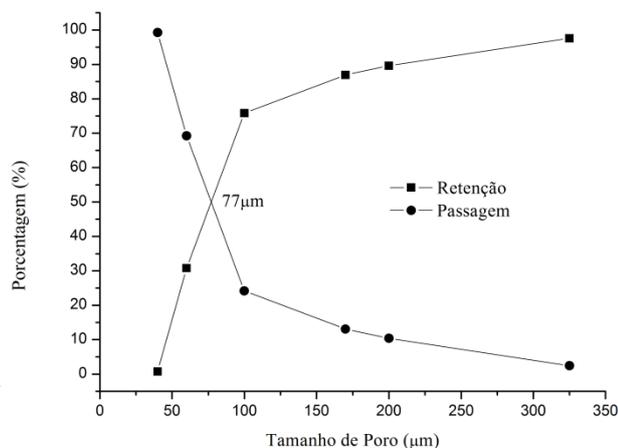
Na avaliação da descrição e análise macroscópica da matéria-prima, essa se demonstrou como pó branco cristalino e inodoro, conforme descrito pelo laudo do fornecedor. Por meio da distribuição granulométrica realizada, pôde-se observar que matéria-prima apresenta prevalência de suas partículas distribuídas no intervalo entre 60 e 100  $\mu\text{m}$  (Figura 10a). Diante desses resultados, foi realizada avaliação da retenção em relação à passagem das partículas nos intervalos mencionados.

Foi observado que o tamanho médio das partículas é de aproximadamente 77  $\mu\text{m}$  (Figura 10b). Portanto, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, pode-se classificar a matéria-prima utilizada como um pó finíssimo, visto que praticamente todas as partículas passam pelo tamis com abertura nominal de malha de 125  $\mu\text{m}$  e de acordo com o gráfico de barras da repartição granulométrica que simula uma distribuição normal da Curva de Gauss (BRASIL, 2010).

Figura 10. a) repartição granulométrica



(b) tamanho médio de partícula do SHC.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

#### 5.1.14 Propriedades de fluxo do SHC

Os resultados obtidos no estudo de reologia do SHC (Tabela 12) indicam que a matéria-prima tem bom fluxo e características de compactação, não necessitando da incorporação de adjuvantes deslizantes, como o aerosil® 0,2%, além de estarem de acordo com os valores preconizados (WELLS, 2005; SANTOS, 2015).

Tabela 12 - Propriedades reológicas do SHC do LP.

<b>Propriedades</b>	<b>LP</b>
Densidade aparente	0,77 g.mL <sup>-1</sup>
Densidade compactada	0,83 g.mL <sup>-1</sup>
Fator de Hausner	1,08
Índice de Carr	7,22
Ângulo de repouso	6,28°
Tempo de escoamento	< 1s

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

### 5.1.15 Análise de umidade do SHC

Em relação análise de umidade do SHC, o valor encontrado para este ensaio está de acordo com o preconizado, sendo inferior a 2% (USP 36 – NF 31, 2013).

## 5.2 Toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub>

A avaliação da toxicidade aguda consiste na primeira etapa do estudo toxicológico na fase pré-clínica no desenvolvimento de um medicamento, e ocorre por administração única ou em frações em um período de vinte quatro horas, em doses bastante superiores a dose terapêutica (HAYES, 1994).

### 5.2.1 Ensaio de toxicidade aguda preliminar

No estudo de toxicidade aguda da SHC na dose de 2000 mg/Kg, foi observado óbito de todos os animais do grupo em menos de 10 minutos de experimento. Entretanto, em relação aos animais do grupo da ADF, não foi observado óbito imediato. Os animais mesmo apresentando sinais de clínicos toxicidade, foram definhando e morrendo durante os 14 dias de experimento, restando apenas um animal ao fim do experimento, ou seja, de alguma forma o liófilo de *B. trimera* retardou, pelo menos de imediato, os efeitos tóxicos do fármaco.

Em relação ao liófilo de *B. trimera*, o estudo demonstrou que não houve alterações comportamentais ou sinais clínicos de toxicidade, piloereção, sialorréia, tremor, ereção da cauda, convulsão ou movimentos estereotipados, e nenhuma morte foi registrada durante os 14 dias de experimento. Este resultado, está de acordo com o estudo proposto por Dias (2008) que demonstrou que o extrato bruto de *B. trimera* não foi tóxico na dose de 5000 mg/Kg por via oral.

### 5.2.2 Determinação da DL<sub>50</sub> do SHC na ADF.

Como o fármaco demonstrou ser tóxico e não há dados de sua toxicidade em camundongos na literatura, foi proposto um esquema (tabela 13) para o cálculo da DL<sub>50</sub> absoluta da SHC em associação com o liófilo de *B. trimera*, com base no experimento de toxicidade aguda preliminar.

Com base na interpolação semilogarítmica dos valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes pelas doses administradas de produto (BLISS, 1935), foi possível determinar o valor absoluto da DL<sub>50</sub> da SHC na ADF.

Tabela 13. Número e percentual de óbitos obtidos no estudo de toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> absoluta do SHC na ADF).

<b>GRUPOS</b>	<b>Mortes</b>	<b>Mortes (%)</b>
SHC+ BT (2000mg/Kg+2000mg/Kg)	11	91,6
SHC+ BT (1000mg/Kg+50mg/Kg)	9	75
SHC+ BT (750mg/Kg+30mg/Kg)	5	41,6
SHC+ BT (500mg/Kg+25mg/Kg)	2	16,6
SHC+ BT (300mg/Kg+10mg/Kg)	-	-

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Seguindo a método da interpolação semilogarítmica dos valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes no experimento, expressos na tabela 13, o valor absoluto da DL<sub>50</sub> da SHC na associação com o liófilo de BT foi de 764,32 mg/Kg.

### **5.3 Toxicidade crônica**

Nos estudos de toxicidade sub-crônica e crônica, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais (TOFOVIC, & JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TIRLING et al., 2002). Além da redução do desenvolvimento ponderal, a toxicidade sistêmica se manifesta através da redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de piloereção (MELLO, 2001). Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZÁLEZ & SILVA, 2003).

O estudo de toxicidade crônica do líófilo de *B. trimera* demonstrou que não houve alterações comportamentais ou sinais clínicos de toxicidade como, piloereção, sialorréia, tremor, ereção da cauda, convulsão ou movimentos estereotipados, e nenhuma morte foi registrada durante o período de tratamento para o grupo da ADF na dose de 150-4,2 mg/Kg de SHC-*B. trimera*, respectivamente.

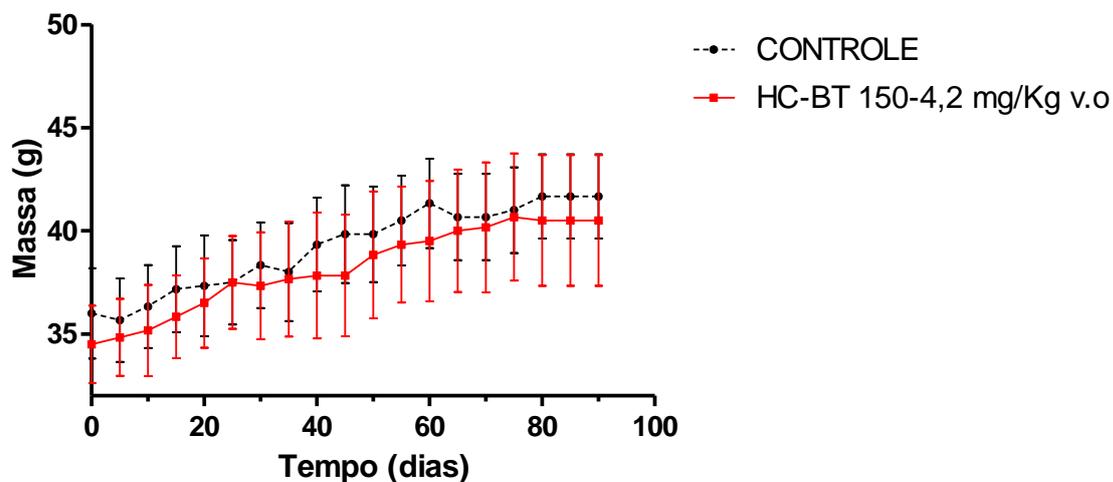
Em relação aos outros dois grupos tratados com ADF, nas doses de 300-10 mg/Kg e 500-30 mg/Kg de SHC-*B. trimera*, a partir do fim do primeiro mês os animais começaram a apresentar sinais de toxicidade como: piloereção, ptose, diminuição na atividade locomotora, diminuição do consumo de água e ração, diminuição do desempenho ponderal de massa e morte. Primeiramente, os animais da dose mais elevada e posteriormente, os animais da dose intermediária, restando apenas um macho e uma fêmea desta dose ao final dos 90 dias de experimento. Os valores de consumo de água e ração, desempenho ponderal de massa, bem como as análises bioquímicas e hematológicas, massas dos órgãos e análise macroscópica dos órgãos desses dois animais, não foram computados devido inviabilidade de análise estatística.

### ***5.3.1 Desempenho ponderal de massa corpórea***

O acompanhamento da massa corpórea do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN & GÜNZEL, 1997).

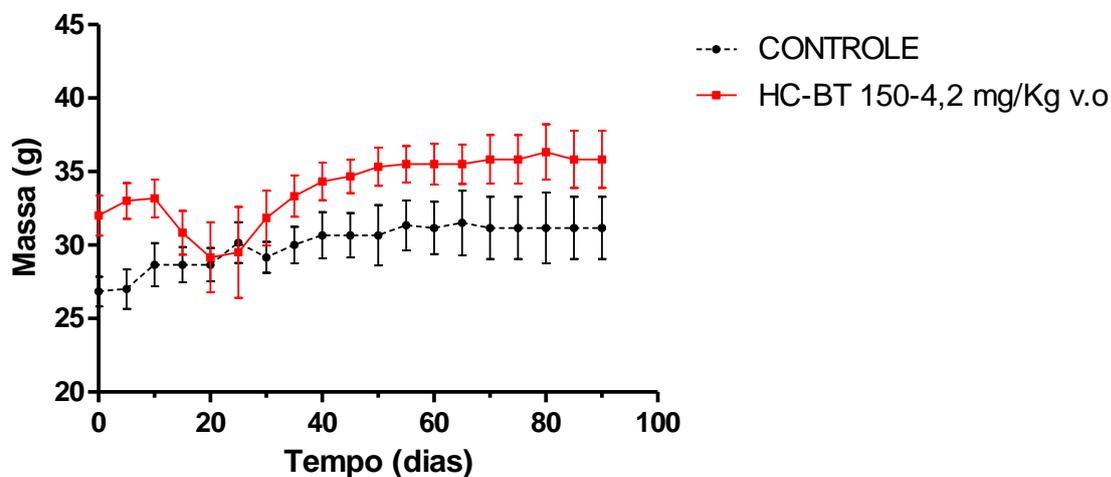
A administração da ADF na dose de 150-4,2 mg/Kg não alterou o desempenho ponderal de massa dos camundongos machos e fêmeas tratados frente ao seu respectivo controle, ou seja, não houve diferença estatística significativa entre grupo controle e tratado de machos e fêmeas, demonstrado na figura 11 e 12.

**Figura 11.** Desempenho ponderal da massa corpórea de camundongos machos tratados com água destilada e associação em dose fixa entre SHC e o liófilo de *B. trimera* na dose de 150-4,2 mg/Kg durante 90 dias.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo).

**Figura 12.** Desempenho ponderal da massa corpórea de camundongos fêmeas tratadas com água destilada e associação em dose fixa entre SHC e o liófilo de *B. trimera* na dose de 150-4,2 mg/Kg durante 90 dias.



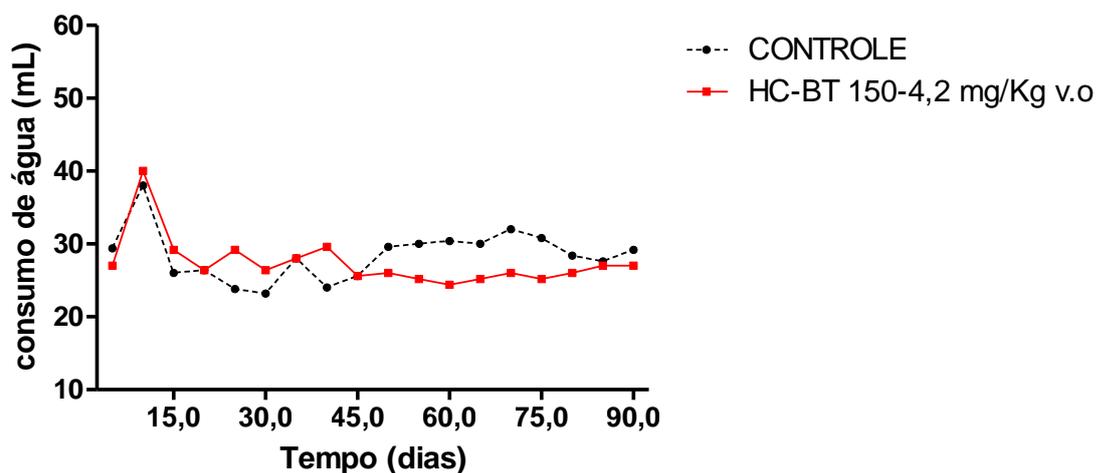
Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo).

### 5.3.2 Consumo de água

A administração da ADF na dose de 150 – 4,2 mg/Kg não alterou o consumo de água dos camundongos machos e fêmeas tratados frente ao seu respectivo controle, demonstrando

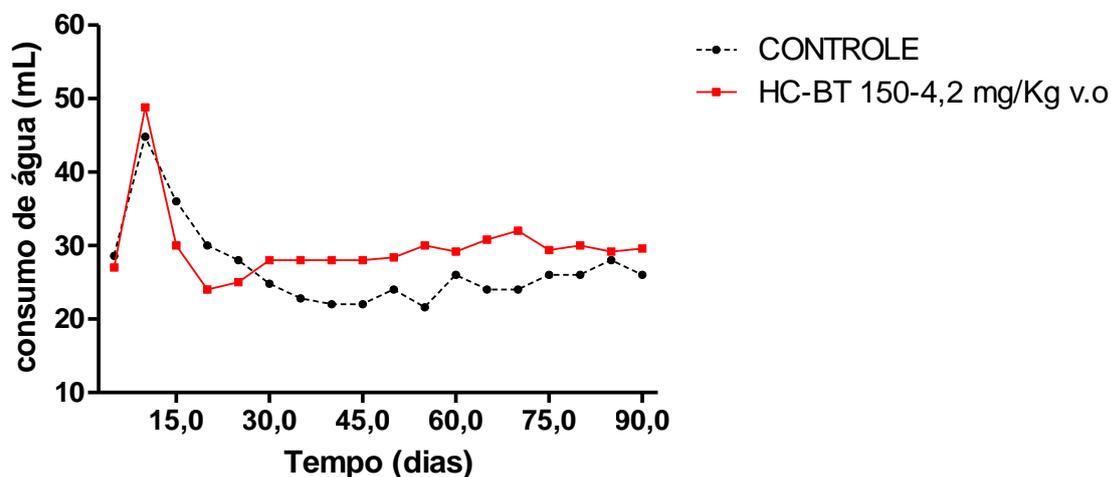
que não houve diferença estatística significativa entre grupo controle e tratado de machos e fêmeas, demonstrado na figura 13 e 14..

**Figura 13.** Perfil do consumo de água de camundongos machos tratados com água destilada e associação em dose fixa entre SHC e o liófilo de *B. trimera* na dose de 150-4,2 mg/Kg durante 90 dias.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo).

**Figura 14.** Perfil do consumo de água de camundongos fêmeas tratadas com água destilada e associação em dose fixa entre SHC e o liófilo de *B. trimera* na dose de 150-4,2 mg/Kg durante 90 dias.



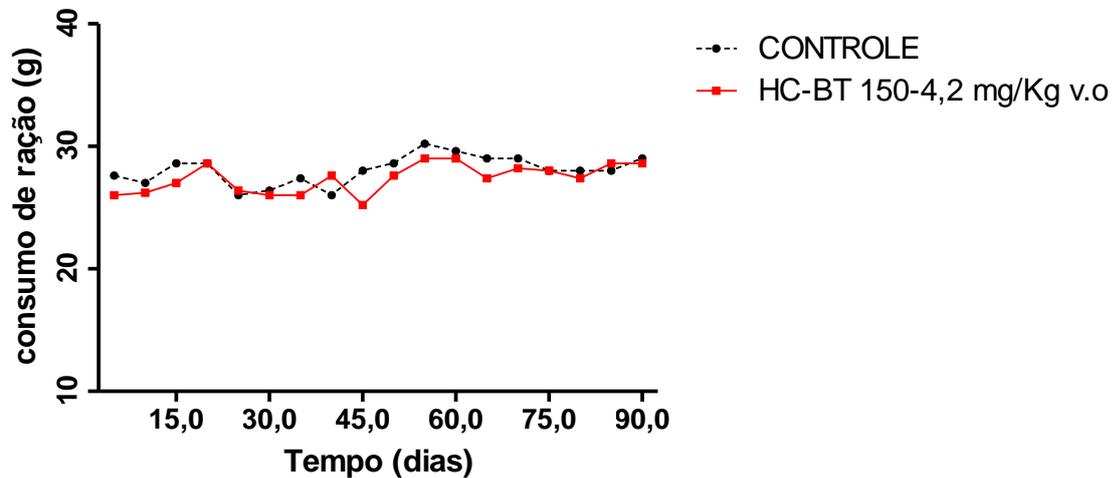
Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo).

### 5.3.3 Consumo de ração

A administração da ADF na dose de 150-4,2 mg/Kg não alterou o consumo de ração dos camundongos machos e fêmeas tratados frente ao seu respectivo controle, demonstrando que

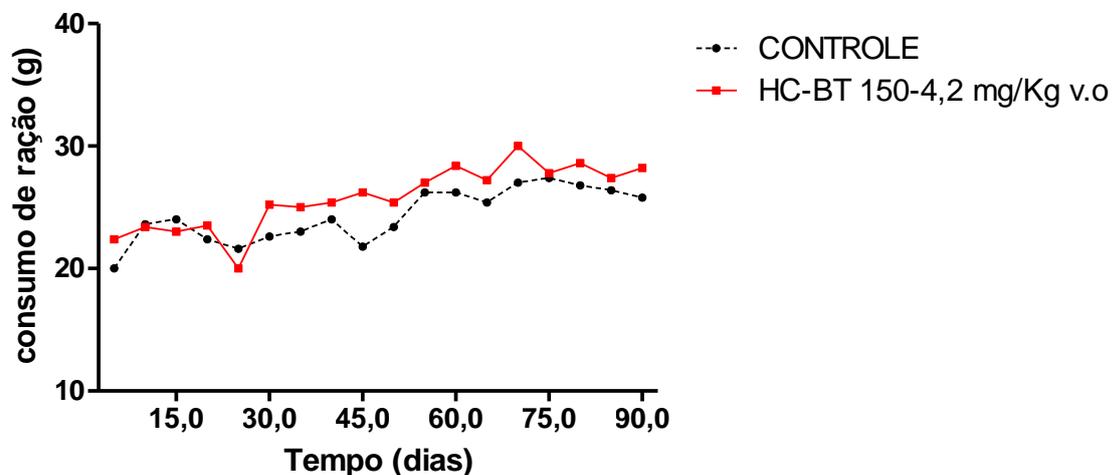
não houve diferença estatística significativa entre grupo controle e tratado de machos e fêmeas, demonstrado na figura 15 e 16.

**Figura 15.** Perfil do consumo de ração de camundongos machos tratados com água destilada e associação em dose fixa entre SHC e o liófilo de *B. trimera* na dose de 150-4,2 mg/Kg durante 90 dias.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo).

**Figura 16.** Perfil do consumo de ração de camundongos fêmeas tratadas com água destilada e associação em dose fixa entre SHC e o liófilo de *B. trimera* na dose de 150-4,2 mg/Kg durante 90 dias.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6/grupo).

### 5.3.4 Parâmetros hematológicos

Variações no perfil hematológico, como por exemplo, o hematócrito, pode nos dar informações acerca da presença ou ausência de anemia, pois através deste parâmetro se obtêm informações importantes sobre o volume globular (%), assim como, coloração do plasma. Isto

nos permite avaliar o grau de hidratação do animal, como também aspectos nutricionais, imprescindíveis para investigação do consumo de água e ração.

Em relação a análise hematológica, não foi observada alteração estatística significativa nos parâmetros hematológicos analisados de camundongos machos e fêmeas tratados com ADF na dose de 150 - 4,2 mg/Kg e seu respectivo grupo controle, segundo a tabela 14 e 15.

**Tabela 14.** Efeito da associação em dose fixa entre o fármaco SHC e o liófilo de B. trimera (150 – 4,2 mg/Kg) por via oral sobre os parâmetros hematológicos em camundongos machos tratados durante 90 dias.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	SHC-BT (150–4,2mg/Kg v.o)
<b>Eritrócito (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	8,18 ± 0,67	7,95 ± 0,40
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,00 ± 1,14	13,06 ± 0,91
<b>Hematócrito (%)</b>	38,15 ± 3,35	37,20 ± 2,77
<b>MCV (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	46,83 ± 1,72	46,66 ± 2,42
<b>MCH (pg)</b>	15,88 ± 0,68	16,40 ± 0,64
<b>MCSHC (g/dL)</b>	34,08 ± 0,51	35,10 ± 1,18
<b>Leucócito (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	8,20 ± 1,29	10,61 ± 2,09
<b>Neutrófilo (%)</b>	5,016 ± 3,06	5,7 ± 2,54
<b>Eosinófilo (%)</b>	0,20 ± 0,11	0,35 ± 0,18
<b>Linfócito (%)</b>	93,76 ± 3,69	89,56 ± 8,10
<b>Monócito (%)</b>	0,26 ± 0,05	0,21 ± 0,04
<b>Plaqueta (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	539,00 ± 51,38	544,16 ± 69,17

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6/grupo).

**Tabela 15** . Efeito da associação em dose fixa entre o fármaco SHC e o liófilo de *B. trimera* (150 – 4,2 mg/Kg) por via oral sobre os parâmetros hematológicos em camundongos fêmeas tratadas durante 90 dias.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	SHC-BT (150–4,2mg/Kg <i>v.o</i> )
Eritrócito ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,23 ± 0,78	8,25 ± 0,59
Hemoglobina (g/dL)	13,83 ± 1,83	13,45 ± 0,76
Hematócrito (%)	39,68 ± 6,7	38,08 ± 2,89
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	48,66 ± 2,94	46,16 ± 2,48
MCH (pg)	16,75 ± 0,64	16,31 ± 0,68
MCSHC (g/dL)	34,61 ± 1,25	35,36 ± 0,83
Leucócito ( $10^3/\text{mm}^3$ )	9,08 ± 2,68	11,91 ± 3,30
Neutrófilo (%)	5,26 ± 2,19	6,96 ± 1,65
Eosinófilo (%)	0,15 ± 0,12	0,28 ± 0,21
Linfócito (%)	93,76 ± 2,44	91,46 ± 2,30
Monócito (%)	0,20 ± 0,06	0,18 ± 0,07
Plaqueta ( $10^3/\text{mm}^3$ )	533,16 ± 26,05	522,33 ± 25,78

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6/grupo).

### 5.3.5 Parâmetros bioquímicos

A avaliação dos parâmetros bioquímicos descreve o perfil metabólico dos animais submetidos à toxicidade, além de indicar quais órgãos, tecidos e até mesmo qual a parte do metabolismo do animal está sendo afetado (ABDEL-BARRY, 2000).

Em relação a análise bioquímica, não foi observada alteração estatística significativa nos parâmetros bioquímicos analisados de camundongos machos e fêmeas tratados com ADF na dose de 150-4,2 mg/Kg e seu respectivo grupo controle. Os valores encontrados para machos e fêmeas, encontram-se respectivamente nas tabelas 16 e 17.

**Tabela 16** . Efeito da associação em dose fixa entre o fármaco SHC e o liófilo de *B. trimera* (150 – 4,2 mg/Kg) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em camundongos machos tratados durante 90 dias.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	SHC-BT (150–4,2mg/Kg v.o)
Glicose (mg/mL)	129,33 ± 14,96	138,58 ± 13,38
Colesterol (mg/dL)	92,83 ± 16,77	95,50 ± 13,36
Triglicerídeo (mg/dL)	122,20 ± 16,77	129,00 ± 12,77
AST (U/L)	163,33 ± 29,35	165,80 ± 25,49
ALT (U/L)	87,00 ± 9,47	82,75 ± 12,76
Albumina (mg/dL)	3,55 ± 0,17	3,40 ± 0,36
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,22	0,32 ± 0,10

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6/grupo).

**Tabela 17**. Efeito da associação em dose fixa entre o fármaco SHC e o liófilo de *B. trimera* (150 – 4,2 mg/Kg) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em camundongos fêmeas tratadas durante 90 dias.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	SHC-BT (150–4,2mg/Kg v.o)
Glicose (mg/mL)	133,66 ± 12,42	135,3333 ± 11,14
Colesterol (mg/dL)	94,40 ± 20,28	92,500 ± 13,72
Triglicerídeo (mg/dL)	133,00 ± 12,12	137,000 ± 10,37
AST (U/L)	162,46 ± 48,14	157,340 ± 46,45
ALT (U/L)	86,70 ± 8,45	88,800 ± 11,22
Albumina (mg/dL)	3,43 ± 0,81	2,666667 ± 0,35
Creatinina (mg/dL)	0,43 ± 0,05	0,3266667 ± 0,05

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6/grupo).

### 5.3.6 Análise macroscópica dos órgãos

Em relação a análise macroscópica dos órgãos, não foram observadas alterações estatísticas significativas nas massas úmidas dos materiais analisados, assim como na coloração, aspecto e tamanho dos órgãos de camundongos machos e fêmeas tratados com ADF na dose de 150-4,2 mg/Kg e seu respectivo grupo controle. Os valores encontrados para machos e fêmeas, encontram-se respectivamente, nas tabelas 18 e 19.

**Tabela 18.** Efeito da associação em dose fixa entre o fármaco SHC e o liófilo de *B. trimera* (150-4,2mg/Kg) por via oral sobre as massas dos órgãos em camundongos machos tratados durante 90 dias.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	SHC-BT (150-4,2mg/Kg v.o)
<b>Coração</b>	0,198 ± 0,04	0,173 ± 0,016
<b>Pulmão</b>	0,257 ± 0,025	0,236 ± 0,019
<b>Fígado</b>	1,704 ± 0,31	1,546 ± 0,24
<b>Baço</b>	0,103 ± 0,037	0,117 ± 0,014
<b>Pâncreas</b>	0,304 ± 0,052	0,284 ± 0,039
<b>Rim</b>	0,255 ± 0,047	0,243 ± 0,044
<b>Estômago</b>	0,327 ± 0,072	0,383 ± 0,050

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6/grupo).

**Tabela 19.** Efeito da associação em dose fixa entre o fármaco SHC e o liófilo de *B. trimera* (150 – 4,2 mg/Kg) por via oral sobre as massas dos órgãos em camundongos fêmeas tratadas durante 90 dias.

Parâmetros	Grupos	
	Controle	SHC-BT (150-4,2mg/Kg v.o)
<b>Coração</b>	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,02
<b>Pulmão</b>	0,32 ± 0,10	0,29 ± 0,09
<b>Fígado</b>	1,27 ± 0,19	1,40 ± 0,01
<b>Baço</b>	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,03
<b>Pâncreas</b>	0,21 ± 0,06	0,26 ± 0,02
<b>Rim</b>	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,02
<b>Estômago</b>	0,25 ± 0,02	0,16 ± 0,03

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média ± E.P.M. (n=6/grupo).

#### 5.4 Avaliação do desenvolvimento de indução de artrite experimental em roedores

Este estudo teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade de protocolos não clínicos de indução de artrite que fossem coerentes com os objetivos deste trabalho, bem como demonstrassem ser fidedignos no que tange a homogeneidade dos resultados.

#### 5.4.1 Avaliação do desenvolvimento de indução de artrite experimental em camundongos C57BL/6

Inicialmente, para avaliação da indução de artrite não clínica foi realizado um estudo-piloto, que visou avaliar a reprodutibilidade do protocolo experimental. Porém, não foi observada diferença estatística significativa em relação ao índice de artrite (figura 17) do grupo CIA e seu controle, ou seja, o modelo experimental descrito por Williams (2007) de indução de artrite não se mostrou reprodutível. Assim como, não foi observada gradação positiva à nível de comprometimento articular ( 0 – normal, 1– ligeiramente inchado e/ou eritema, 2 – edema pronunciado e 3 – Anquilose (rigidez articular). Segundo dados da literatura, este resultado pode está diretamente relacionado à três fatores:

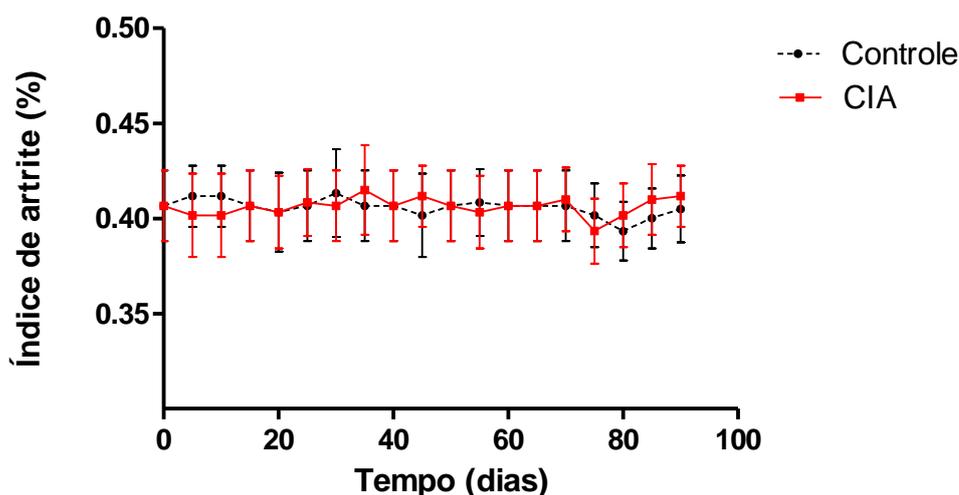
- Estabilidade da cartilagem CII — por se tratar de uma matéria-prima extremamente sensível, pode haver comprometimento do desenvolvimento da emulsão, no que tange ao superaquecimento desta matéria-prima (desnaturação), se o preparo não for feito em condições ideais de temperatura (WILLIAMS, 2007).
- Administração incorreta – O protocolo experimental preconiza que a emulsão seja administrada de forma intradérmica, ou seja, entre a epiderme e o tecido subcutâneo. A administração de forma ligeiramente mais profunda poderia vir a alterar a velocidade de absorção desta composição, mudando completamente a resposta do animal ao protocolo. (WILLIAMS, 2007).
- Concentração do antígeno da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* no adjuvante de Freund – A linhagem utilizada para este protocolo experimental, C57BL/6, também conhecida como Black, mesmo sendo uma linhagem isogênica pode vir a apresentar variações na sensibilidade a este experimento, principalmente relacionada à quantidade do antígeno desta cepa de bactérias na composição do Adjuvante de Freund. A concentração declarada pelo fabricante (Sigma-Aldrich®) deste antígeno utilizado neste estudo, foi de 1 mg/mL, ou seja, 1 mg da *Mycobacterium tuberculosis* morta por mL de veículo.

Alguns autores, citam que a concentração mínima recomendada para um bom desenvolvimento deste protocolo experimental nesta linhagem seria de 3 mg/mL, porém ainda hoje há controvérsias (COELHO et.al 2004; WILLIAMS, 2007.)

As preparações de adjuvante completo de Freund presentes no mercado, apresentam-se apenas em uma concentração, a de 1mg/mL. Porém, nesta concentração apenas a linhagem isogênica DBA/1, apresenta percentual satisfatório de indução de artrite. Entretanto, o acesso

a esta linhagem é extremamente restrito, somente as universidades conveniadas aos centros de pesquisa produtores desta linhagem têm acesso às estas colônias.

**Figura 17.** Perfil do índice de artrite (%) no estudo-piloto realizado com camundongos machos da linhagem C57BL/6 submetidos ao protocolo experimental durante 90 dias.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5/grupo).

Diante dos resultados obtidos para o modelo não clínico de artrite induzida em camundongos machos C57BL/6, a alternativa cabível encontrada foi avaliar este protocolo experimental numa espécie diferente de roedor.

A espécie em questão, *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar<sup>®</sup>, por conter dados consistentes na literatura de sua utilização em modelo de artrite e ser de fácil aquisição, foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

#### 5.4.2 Avaliação do desenvolvimento de indução de artrite experimental em ratos Wistar<sup>®</sup> de ambos os sexos

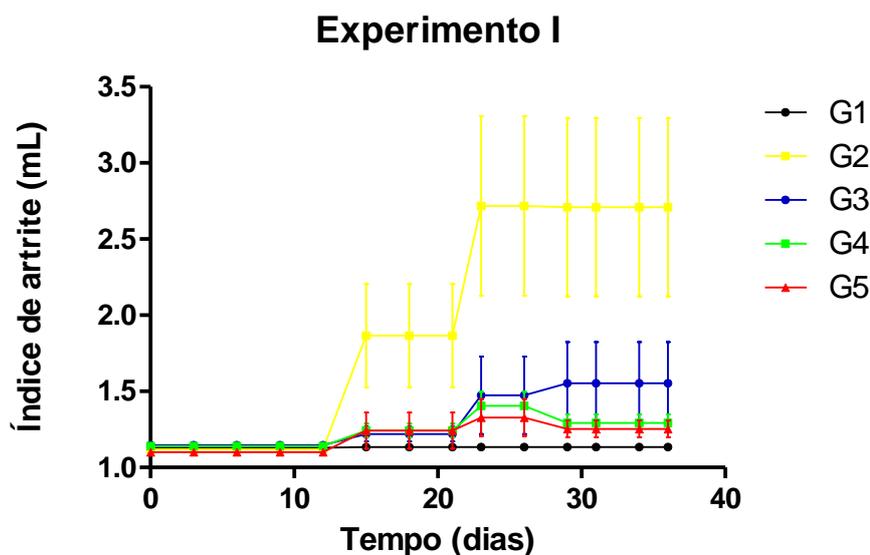
Os resultados obtidos para os experimentos desenvolvidos de indução de artrite em ratos Wistar<sup>®</sup> de ambos os sexos estão demonstrados nas figuras 18, 19 e 20.

Inicialmente, foi desenvolvido um estudo-piloto para avaliar o comportamento preliminar dos animais frente ao protocolo em questão.

Os resultados demonstraram não homogeneidade no desenvolvimento de artrite entre os grupos induzidos (G2, G3, G4 e G5) e um elevado desvio-padrão intragrupo (G2 e G3), assim como houve diferença estatística entre os grupos induzidos avaliados. Observou-se

também que dois dos grupos induzidos tiveram o perfil de indução próximo ao grupo controle (G1), sendo que os três grupos (G3, G4 e G5) não apresentaram diferença significativa entre o grupo controle (G1).

Figura 18. Índice de indução de artrite obtido para o experimento I desenvolvido em ratos Wistar®.



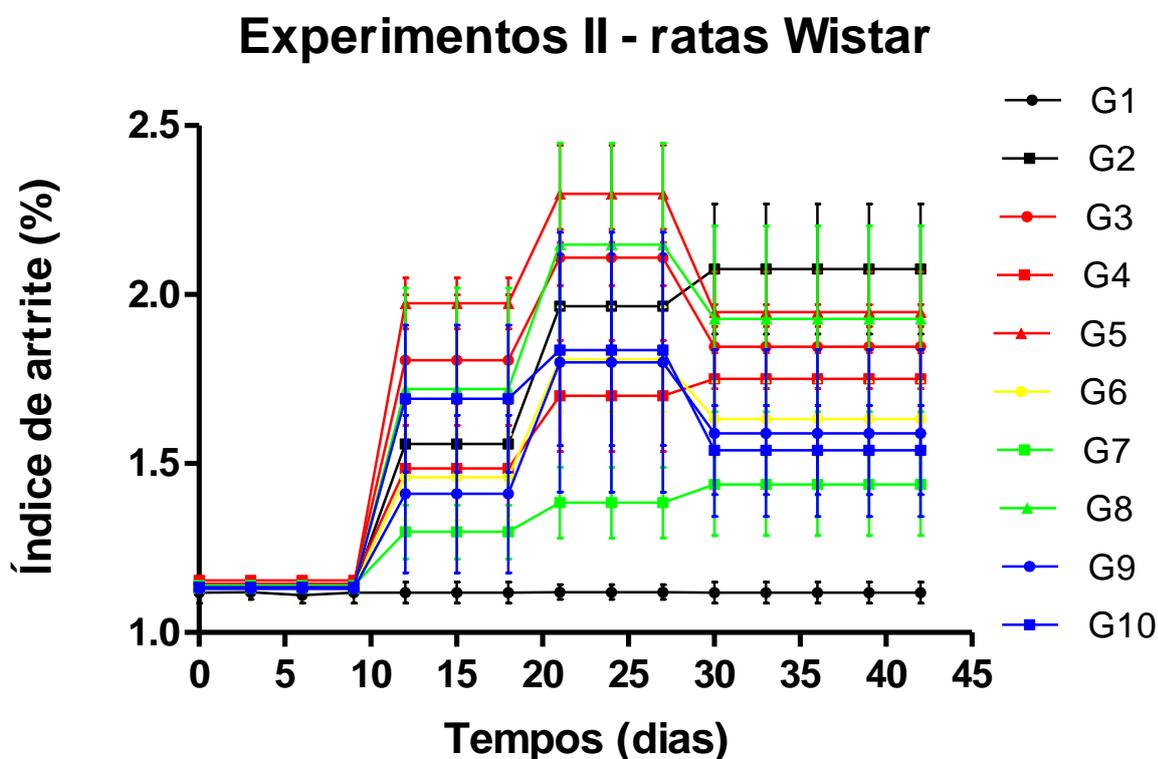
Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5/grupo)

Estes resultados podem estar relacionados com vários fatores, dentre eles: a susceptibilidade de gravidade moderada da linhagem Wistar® frente ao protocolo de indução por adjuvante completo de Freund (AIA), administração incorreta do óleo indutor ou variações genéticas intra-grupo, visto que os animais utilizados no experimento não são isogênicos.

Diante dos resultados obtidos e mediante revisão da literatura acerca da não homogeneidade do perfil de indução de artrite nesta linhagem, desenvolveu-se um novo experimento, porém com ratas (Wistar®) e com maior número de grupos. De acordo com COOK E NICKERSON (2005), as fêmeas de algumas linhagens da espécie *Rattus norvegicus*, são mais susceptíveis que os machos de suas respectivas linhagens, ocorrendo também o inverso, comparando-se machos de outras linhagens frente à suas fêmeas (Brown Norway).

Os resultados encontrados para o experimento anteriormente descrito, encontram-se demonstrados na figura 19.

Figura 18. Índice de indução de artrite obtido para o experimento II desenvolvido em ratas Wistar®.



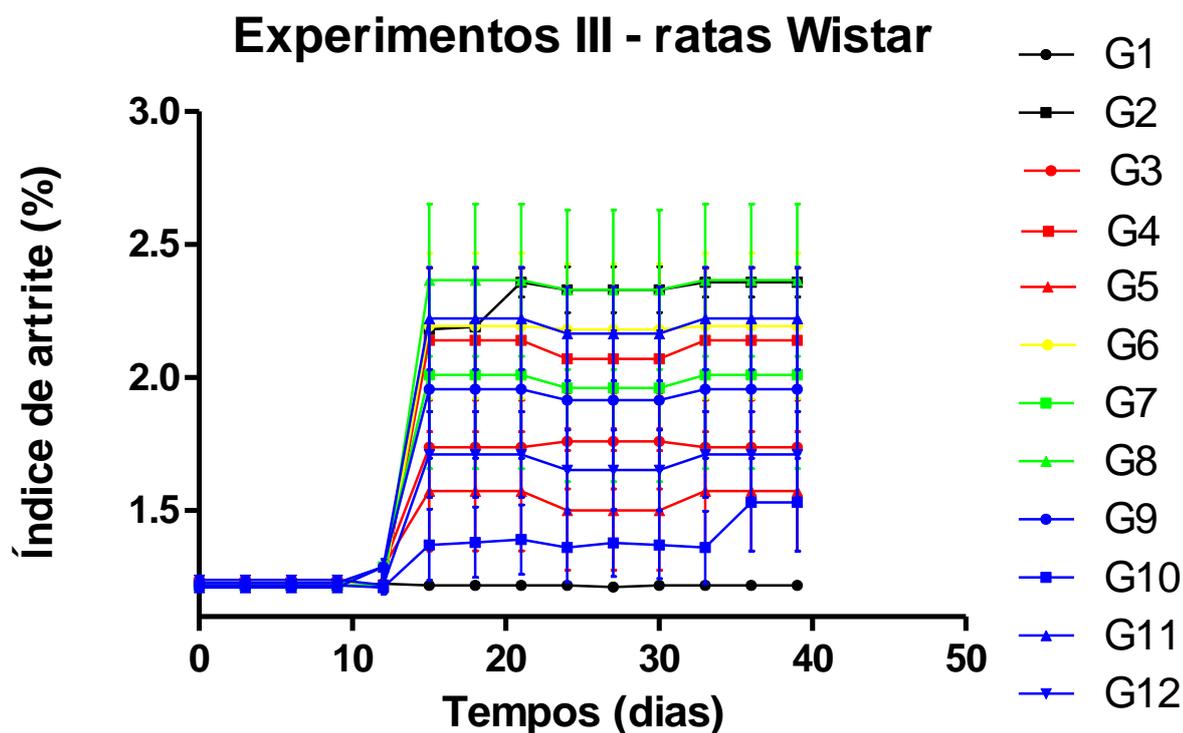
Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5/grupo).

Mesmo utilizando o gênero mais susceptível ao protocolo experimental em questão, os resultados novamente demonstraram não haver homogeneidade no perfil de desenvolvimento de artrite de alguns grupos induzidos, bem como um elevado desvio-padrão intragrupo foi observado (G2 à G10). O experimento II, demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos G4 e G7 e o grupo controle (G1), porém foi visto que os demais grupos (G3, G5, G6, G8, G9 e G10) demonstraram diferença significativa entre o grupo controle (G1), mas não entre si.

Os valores obtidos para o perfil de indução dos grupos G4 e G7 demonstram a não homogeneidade deste protocolo. Tais resultados podem vir a gerar interpretações equivocadas acerca de experimentos de avaliação de eficácia, como por exemplo um resultado falso positivo.

Com o objetivo de reforçar a hipótese levantada, desenvolveu-se um terceiro experimento, utilizando novamente ratas Wistar®, porém aumentando-se mais uma vez o número total de grupos.

Figura 20. Índice de indução de artrite obtido para o experimento III desenvolvido em ratos Wistar®.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=5/grupo).

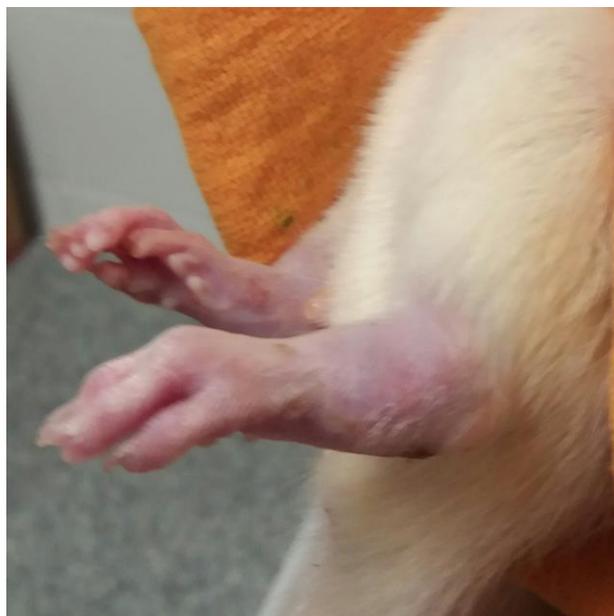
Pode-se inferir dos resultados obtidos, assim como pela observação da figura 20, a presença de um grande desvio-padrão intragrupo, como já demonstrado nos experimentos anteriores. O protocolo mais uma vez demonstrou-se não homogêneo no que tange o desenvolvimento de artrite nos animais, pois não houve diferença significativa entre os grupos G3, G5, G9, G10 e G12 e o grupo controle (G1). Para os demais grupos, houve diferença significativa frente o G1, ou seja, houve homogeneidade na indução de artrite entre estes.

Figura 21. Pata direita traseira não edemaciada – G2 (experimento III)



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Figura 22. Patas direita e esquerda traseira, extremamente edemaciadas – G2 (experimento III)



Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Como demonstrado em todos os experimentos apresentados, observou-se elevado desvio-padrão intra-grupo. Isto deve-se ao fato dos animais terem desenvolvido edema de pata de maneira não homogênea, ou seja, num mesmo grupo de animais observou-se a presença de edemas de pata muito pronunciados ou moderados e alguns sem qualquer edema, como demonstrado nas figuras 21 e 22.

Para não haver interpretações errôneas quanto a avaliação dos resultados obtidos, o teste estatístico utilizado foi o de análise de variância (Two-way) seguido do pós teste de Bonferroni. Este pós-teste, dar a possibilidade de se escolher qual grupo será tido como grupo de referência, ou seja, com qual grupo os demais serão confrontados.

Com o intuito de não haver equívoco quanto à escolha do grupo de referência, em todos os experimentos, foram desenvolvidos dois pós-testes de Bonferroni. No primeiro, tomou-se como referência, o grupo controle (G1), e no seguinte, o grupo que obteve maior índice de indução de artrite.

Os resultados demonstraram que não houve escolha equivocada do grupo escolhido como referência, pois nos dois pós-testes obteve-se o mesmo resultado.

Os resultados obtidos para o experimento II, encontram-se de acordo com o demonstrado por RAMOZ-RUIZ e colaboradores (91), pois foi visto que a linhagem Wistar frente ao protocolo experimental em questão, desenvolve artrite em cerca de 80% dos animais analisados. Este resultado encontra-se próximo ao observado no experimento desenvolvido (78%).

Em relação ao Experimento III, mesmo com uma quantidade maior de grupos (2 grupos), observou-se apenas a indução de cerca de 55% dos animais utilizados, e em relação ao experimento I, apenas a indução de 25% dos animais.

A susceptibilidade/resistência das espécies e linhagens em desenvolver artrite está relacionadas à vários fatores, como por exemplo a histocompatibilidade MSHC (H-2) de classe II que gera robusta atividade de Linf. T e B à componentes articulares (LORENTZEN; OLSSON; KLARESKOG, 95). Outros autores, atribuem esta susceptibilidade/resistência à presença ou ausência de stress nos animais no decorrer dos experimentos, assim como à atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que pode modular a gravidade da doença (WILDER et. al., 2000) (EUGENE; KAMAL, 2009).

Animais não consanguíneos e não isogênicos da linhagem Wistar<sup>®</sup>, podem apresentar-se tanto susceptíveis quanto resistentes à indução de artrite por AIA. Então, esta susceptibilidade depende tanto das características da própria linhagem quanto da

consanguinidade entre elas. (RAMOS-RUIZ et. al., 91; LANGERIJT et. al., 2001; LANGERIT et. al., 94).

### 5.5 Obtenção da forma farmacêutica

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da obtenção das cápsulas contendo a ADF, porém em escala piloto, todas as etapas foram feitas de acordo com o trabalho desenvolvido por Santos em 2015.

Os resultados obtidos no controle de qualidade da FF cápsula obtida, bem como os demonstrados por Santos em 2015, encontram-se descritos nas tabelas 12.

Tabela 12. Controle de qualidade do LP de cápsulas do liófilo de *B. trimera* e o SHC frente ao LB.

<b>Ensaio</b>	<b>Especificações</b>	<b>LP</b>	<b>LBI</b>	<b>Média/SD</b>
Peso médio	0,322 g $\pm$ 7,500	0,330	0,323	0,326 $\pm$ 0,005
Desintegração	Não mais que 45 min	8,5 min	8 min	8,250 $\pm$ 0,350
Umidade (%)	Máximo 2,0%	0,5	0,4	0,45 $\pm$ 0,070
Ângulo de repouso	$\leq 30^\circ$	12	5	8,5 $\pm$ 4,950
Tempo de escoamento	$\leq 10$ s	3	1	2 $\pm$ 1,410

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os resultados obtidos para o peso médio, desintegração, umidade, ângulo de repouso e tempo de escoamento para o lote piloto, atenderam as especificações da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) para FF cápsulas, bem como não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos para o controle de qualidade do lote-piloto desenvolvido frente ao lote de bancada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E

---

PERSPECTIVAS

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- ✓ Os resultados obtidos para as análises da droga vegetal de *B. trimera* e do seu líofilo, estão de acordo com os demonstrados por Santos em 2015. Assim como, as análises desenvolvidas para o SHC, demonstraram que o fármaco encontra-se dentro das normas preconizadas (SANTOS, 2015; FARMACOPEIA);
- ✓ O lote-piloto desenvolvido apresentou boas características reológicas e baixo teor de umidade. Os controles de qualidade desenvolvidos demonstraram estar de acordo com a normas vigentes, bem como não houve diferença estatística significativa entre os valores de controle de qualidade obtidos para o lote-piloto, frente ao lote de bancada, conferindo à associação em dose fixa confiabilidade necessária para o desenvolvimento de ensaios em animais;
- ✓ Em relação aos experimentos de toxicidade desenvolvidos, o fármaco utilizado demonstrou ser extremamente tóxico, e como não foram encontrados na literatura dados sobre sua toxicidade aguda em camundongos, foi necessário o desenvolvimento de um estudo mais aprofundado acerca dessa substância.
- ✓ Com base nos experimentos realizados com a associação em dose fixa entre SHC e o líofilo de *B. trimera* em diferentes concentrações dos dois constituintes, e mediante o estudo de toxicidade aguda preliminar foi possível determinar a  $DL_{50}$  absoluta da SHC na ADF, segundo o método proposto por (BLISS, 1935).
- ✓ A administração crônica da associação em dose fixa entre SHC e *B. trimera* na dose de 150 - 4,2 mg/Kg não alterou nenhum dos parâmetros analisados (consumo de água e ração, desempenho poderal de massa corpórea, massas dos órgãos, parâmetros hematológicos e bioquímicos), assim como não foram observados outros sinais clínicos de toxicidade como, alterações comportamentais, piloereção, sialorréia, tremor, ereção da cauda, convulsão ou movimentos estereotipados. Com isso, conclui-se que a ADF nesta dose e para esta espécie, foi considerada segura. Porém, são necessários estudos complementares que corroborem essa afirmação, como: mutagenicidade, genotoxicidade, embriofetotoxicidade, performance reprodutiva.
- ✓ Em relação administração da ADF nas doses de 300-10 mg/Kg e 500-30 mg/Kg de SHC-BT, foram observados sinais clínicos de toxicidade, como: piloereção, ptose, diminuição na atividade locomotora, diminuição do consumo de água e ração, diminuição

do desempenho ponderal de massa e conseqüentemente morte. Com isso, conclui-se que a ADF nestas doses foi considerada tóxica. Estudos mais aprofundados, acerca destes resultados, são necessários para uma investigação mais fidedigna das possíveis causas de tal toxicidade.

- ✓ Em relação ao estudo-piloto, referente ao desenvolvimento da artrite experimental, não foi observada diferença estatística significativa em relação ao índice de artrite apresentado pelo grupo CIA e seu grupo controle. Assim como, não foi observada gradação positiva à nível de comprometimento articular. Contudo, conclui-se que não houve reprodutibilidade do experimento em questão. A causa mais provável para este resultado pode estar ligado a baixa concentração do *Mycobacterium tuberculosis* (mg/mL) no adjuvante de Freund.
- ✓ Avaliação da reprodutibilidade da indução de artrite em ratos Wistar<sup>®</sup> de ambos os sexos, demonstrou-se não homogênea. Nos três experimentos desenvolvidos, observou-se um elevado desvio-padrão intragrupo, assim como houve diferença significativa entre os grupos induzidos de todos os experimentos efetuados. Tal fato, poderia vir a gerar interpretações equivocadas acerca da eficácia de insumos vegetais/fármacos testados em animais submetidos a este protocolo.
- ✓ O experimento II, demonstrou-se de acordo com os resultados obtidos por Ramoz-Ruiz e colaboradores (91) para este protocolo, porém no experimento III, mesmo com a utilização de um número maior de grupos, o percentual de indução foi de apenas 55%, valor este inferior ao obtido no experimento II (78%) e ao demonstrado por Ramoz-Ruiz e colaboradores em 91 (80%).
- ✓ Diante do exposto, conclui-se que o protocolo de desenvolvimentos de artrite induzida por AIA em ratos Wistar de ambos os sexos, mesmo tendo demonstrado indução efetiva em alguns grupos de animais, demonstrou-se não homogêneo, ou seja, houve grande variação nos resultados obtidos para os animais tratados, tanto inter-grupo como intra-grupo.
- ✓ Portanto, conclui-se que os protocolos experimentais de indução de artrite são de caráter complexo, visto que vários fatores são determinantes na responsividade dos animais frente aos modelos descritos na literatura, sendo imprescindível a avaliação prévia da viabilidade tanto dos modelos quanto das linhagens disponíveis.
- ✓ As perspectivas cabíveis mediante avaliação do estudo exposto, encontram-se descritas abaixo:
  - Determinar a DL<sub>50</sub> absoluta da (SHC) em camundongos swiss de ambos os sexos;

- Avaliar a efeito da administração crônica de *B. trimera* isoladamente nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg.
- Avaliar a influência do liófilo de *B.trimera* no perfil de absorção da (SHC) em ratos Wistar<sup>®</sup>;
- Refazer o protocolo experimental de indução de artrite em ratos Wistar (AIA) de ambos os sexos, utilizando uma quantidade mínima necessária de animais que possibilite avaliar de forma efetiva o efeito antiartrítico da ADF;
- Avaliar o efeito da administração de diferentes doses da ADF, da SHC e do liófilo de *B. trimera* isoladamente, em modelo experimental (AIA);

# REFERÊNCIAS

---

## 7 REFERÊNCIAS

ABDEL-BARRY, J.A; AL-HAKIEM, M.H.H. Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of *Trigonella foenum-graecum* in mice. **Journal of ethnopharmacology** (70), 65-68, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. v, 2. Brasília, 2013.

AGUIRRE-CRUZ, L.; TORRES, K.J.; JUNG-COOK, H.; FORTUNY, C.; SANCHEZ, E.; SODA-MEHRY, A. Short communication: preferential concentration of hydroxychloroquine in adenoid tissue of HIV-infected subjects. **AIDS Res Hum Retroviruses.**;26(3):339–42, 2010.

ALONSO, S.I.; NUCIARI, M.C.; GUMA, I.R.; OLPHEN, A.V. Flora de un área de la Sierra La Barrosa (Balcarce) y fenología de especies con potencial ornamental. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias.** 2009.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, p.33–44, 2000.

BAGCHI, K., PURI, S.. Free radicals and antioxidants in health and disease. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v.4, p.350–360, 1998.

BARBOSA-FILHO, J.M.; V-ASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.392-413, 2005.

BARLOW, S.M., et al. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 40, n. 2/3, p. 145-191, 2002.

BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury model **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p. 1479–1484, 1996.

BELLAMY, L. J.; NORDON, A.; LITTLEJOHN, D. Effects of particle size and cohesive properties on mixing studied by non-contact NIR. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 361, n.1-2, p.87-91, 2008.

BELTRAME, F. L.; FERRONI, D. C.; ALVES, B. R. V.; PEREIRA, A. V.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 31, n. 1, p. 37-43, 2009.

BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.; MCABEE, T.; SENNELLO, G.; CHLIPALA, E. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicol Pathol.**;27(1):134-42, 1999.

BERTOLO, M. B. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 10, n. 1, p. 6-14, 2009.

BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M.J.; TAK, P.P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? **Arthritis Rheum.** 62(8):2192-205, 2010.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. *Altern Lab Anim.* ;31(3):277-81, 2003.

BLISS, C.I. The calculator of the dosage-mortality curve. **Annals of Applied Biology**, v.22, p. 134-167, 1935.

BORELLA, J.C.; DUARTE, D.P., NOVARETTI, A. A.G., MENEZES. JR. A., FRANÇA, S.C., RUFATO, C.B. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p. 557-561, 2006.

BORELLA, J.C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n. 2, p. 63-67, 2002.

BRAGA, T. V. et al. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.28, n.3, p. 287 – 290, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, que determina a publicação do “Guia para Validação de Métodos

Analíticos e Bioanalíticos” publicada no D.O.U. – Diário Oficial da União em 02 de junho de 2003.

BROCKS, D.R.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the Chiral Antimalarial Drugs. **Clin Pharmacokinet**;42(15): 1359-82, 2003.

BROCKS, D.R.; PASSUTTO, F.M.; JAMALI, F. Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatographic separation and assay of hydroxychloroquine enantiomers. **J Chromatogr**;581:83-92, 1992.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I – estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

CAIROLI, E.; REBELLA, M.; DANESE, N.; GARRA, V.; BORBA, E. Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. **Lupus**;21(11):1178–82, 2012.

CARDOSO, C.D. **Avaliação da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar no estudo *in vitro* do metabolismo enantiosseletivo da hidroxicloroquina**. Tese de doutorado em química. Faculdade de Filosofia Ciências e letras de Ribeirão Preto-SP, 2006.

CARNEIRO, M.A.A.; FERNANDES, G.W. Herbivoria. **Ciência Hoje**, v.20, p.35-39, 1996.

CHARLES, D.C.; MICHAEL, D.N. **Nociceptive Sensitivity and Opioid Antinociception and Antihyperalgesia in Freund’s Adjuvant-Induced Arthritic Male and Female Rats**

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic Department of Pharmacology.  
v313(1): p.449-459, 2005.

CHAVES, J. S.; DA COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. P. D. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L: ). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.45, n.3, p.573-584, 2009.

CHIANG, G., SASSAROLI, M.; LOUIE, M.; CHEN, H.; STECHER, V.J.; SPERBER, K. Inhibition of HIV-1 replication by hydroxychloroquine: mechanism of action and comparison with zidovudine. **Clin Ther**;18(6):1080–92, 1996.

CHIARELLO, B.; DRIUSSO, P.; RADI, A.L.M. **Fisioterapia Reumatológica**. Barueri – SP: Editora Manole, p.89, 2005.

CHUDA, Y.; ONO, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; NAGATA, T.; TSUSHIDA, T. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44 p. 2037–2039, 1996.

COECKE, S.; BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N. et al. Toxicokinetics and metabolism. **Altern. Lab. Anim.**, suppl 1, p. 147-175, 2005.

COELHO, M.P.G.; REIS, P.A.; GAVA, V.B.; MARQUES, P.R.; GAYER, C.R.; LARANJA, G.A.T.; FELZENSWALB, I.; SABINO, K.C.C. Antiarthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. **Toxicology Letters**, v.154, p.69-80, 2004.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**. Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, v. 1. p.747, 1984.

COSTA, R. S. **Estudos de Pré-Formulação e Formulação de *Heliotropium indicum* (L.) DC (Boraginaceae)**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N.; AMOURA, Z, HUONG, D.L.; LECHAT, P.; PIETTE, J.C. Safety of hydroxychloroquine in pregnant patients with connective tissue diseases. Review of the literature. **Autoimmun Rev.**;4(2):111-5, 2005.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, N.; AMOURA, Z.; HULOT, J.S.; HAMMOUD, H.A.; AYMARD, G.; CACOUB. P. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**;54:3284–90, 2006.

CROFFORD R.L. Arthritis and autoimmunity in animals, in *Arthritis and Allied Conditions*. **Williams and Wilkins**. ed: Koopman, W.; 1997.

DIAS, L.F.T. Atividade antiúlcera e toxicidade da *Baccharis trimera* (LESS) DC. (ASTERACEAE). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2008.

DIMITRIJEVIC, M.; LABAN, O.; DJURIC, V.J.; STANOJEVIC, S.; MILETIC, T.; KOVACEVIC-JOVANOVIC, V.; TODOROVIC, C.; RADULOVIC, J. **Behavior and severity of adjuvant arthritis in four rat strains**. *Brain Behavior Immunity*. V.15: p.255-265, 2001.

DUCHARME, J.; FIEGER H.; DUCHARME, M.P.; KHALIL, S.K.; WAINER, I.W. Enantioselective disposition of hydroxychloroquine after oral of the racemate to healthy subjects. **Br J Clin Pharmacol** 40(2):27-133, 1995.

DUCHARME, J.; WAINER, I.W.; PARENTEAU, H.I.; RODMAN, J.H. Stereoselective distribution of hydroxychloroquine in the rabbit following single and multiple oral doses of the racemate and the separate enantiomers. **Chirality**;6(4):337-46, 1994.

EASTERBROOK, M. The ocular safety of hydroxychloroquine. **Semin Arthritis Rheum**;23(2 Suppl 1):62–67, 1993.

ELMAN, A., GULLBERG, R.; NILSSON, E. Chloroquine retinopathy in patients with rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**;5:161–6, 1976.

EMERIT, J.; CHAUDIERE, J. In: Miguel, J., Quintanilha, A.T., Weber, H. (Eds.), Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, vol. 1. **CRC Press**, p.162–192, 1989.

EUGENE, Y.K.; KAMAL, D. M. **The determinants of susceptibility/resistance to adjuvante arthritis in rats. Arthritis Research and Theraphy.** v11(4):. p.239, 2009.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.11, n.4, p.360-367, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2011, p. 191-194, 2010.

FERRAZ, L. R. M.. Aplicação de quality by design no estudo de pré-formulação farmacêutica do sulfato de hidroxicloroquina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

FERREIRA, P.A.; Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida à base de *Baccharis trimera* (Less.) DC. para o tratamento da artrite reumatoide. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

FESSLER, B.J.; ALARCÓN, G.S.; MCGWIN, G.J.R.; ROSEMAN, J.; BASTIAN, H.M.; FRIEDMAN, A.W.; BAETHGE, B.A.; VILÁ, L.; REVEILLE, J.D. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. **Arthritis Rheum.**;52(5):1473-80, 2005.

FIEGER, H.; IREDALE, J.; WAINER, I. W.. Determination of the stereoisomers of hydroxychloroquine and its metabolites in plasma and urine following a single oral administration of racemic hydroxychloroquine. **Seminars in Arthritis and Rheumatism** 23: 74-81, 1993

FRANCÈS, C.; COSNES, A.; DUHAUT, P.; ZHR, N.; SOUTOU, B.; INGEN-HOUSZ-ORO, S.; BESSIS, D.; CHEVRANT-BRETON, J.; CORDEL, N.; LIPSKER, D.; COSTEDOAT-CHALUMEAU, N. Low blood concentration of hydroxychloroquine in patients with refractory cutaneous lupus erythematosus: a French multicenter prospective study. **Arch Dermatol**;148(4):479–84, 2012.

GAMBERINI, M.T.; SKORUPA, L. A. ; SOUCCAR, C. ; LAPA, A. J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis trimera*, **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.86 p. 137-139, 1991.

GENE, R.M.; CARTARANA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CANIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v. 62 p. 232-235, 1996.

GOLDMAN, F.D.; GILMAN A.L.; HOLLENBACK, C.; KATO, R.M.; PREMACK, B.A Rawlings DJ. Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. **Blood**;95(11):3460–6, 2000.

GONGORA, L, GINER, R.M.; MAÑEZ, S.; RECIO, M.C.; SCHINELLA, G.; RIOS, J.L. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. **Life Science**, v. 71 p. 2995–3004, 2002.

GONZALES, E.; IGLEZIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.329-333, 2000.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto, 2003.

GOUVEIA, E.B; MORALES, M.S.A; GOUVEIA, G.B; LOURENZI, V.P.M. Toxicidade ocular por derivados da 4-aminoquinolona. **Arq. Bras. Oftalmol.** vol.70, n.6 p. 1046-1051, 2007.

GUSTAFSSON, L.L.; NORDMARK, B.; ERICSSON, O.; HERMANSSON, J. **The pharmacokinetics of (+)-and (-)-chloroquine in patients with rheumatoid arthritis.** 3<sup>a</sup> Congresso Mundial em Farmacologia Clínica e Terapêuticas. Stockholm, Sweden, 1986.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. **Lancet**, v.344, p.721–724, 1994.

HAYES, W. A. **Principles and Methods of Toxicology** 3<sup>o</sup> edição: Raven Press, p.579-600, 1994.

HEIDEN, G.S.A. **Baccharis in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

HENKIND, P.; ROTHFIELD, N.F. Ocular abnormalities in patients treated with synthetic antimalarial drugs. **N Engl J Med.**;269:433-9, 1963.

HOBBS, H.E.; EADIE, S.P.; SOMERVILLE, F. Ocular lesions after treatment with chloroquine. **Br J Ophthalmol.**;45(4):284-97, 1961.

HOBBS, H.E.; SORSBY, A.; DREEDMAN, A. Retinopathy following chloroquine therapy. **Lancet**;2:478-80, 1959.

IREDALE, J.; FIEGER, H.; WAINER, I.W. Enantioselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine and the observation of a reversal in the (+)/(-)-hydroxychloroquine ratio. **Chirality**;5(2):65-70, 1993.

IREDALE, J.; WAINER, I.W. Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr.**;573(2):253-8. 1992.

IZMIRLY, P.M.; COSTEDOAT-CHALUMEAU, N.; PISONI, C.N.; KHAMASHTA, M.A.; KIM, M.Y.; SAXENA, A.; FRIEDMAN, D.; LLANOS, C.; PIETTE, J.C.; BUYON, J.P. Maternal use of hydroxychloroquine is associated with a reduced risk of recurrent anti-SSA/Ro-antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus. **Circulation**;126(1):76–82, 2012.

IZMIRLY, P.M.; KIM, M.Y.; LLANOS, C.; LE, P.U.; GUERRA, M.M.; ASKANASE, A.D.; SALMON, J.E.; BUYON, J.P. Evaluation of the risk of anti-SSA/Ro-SSB/La antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus in fetuses of mothers with systemic lupus erythematosus exposed to hydroxychloroquine. **Ann Rheum Dis.**;69(10): 1827–30, 2010.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information **Reprod Toxicol.**;11(2-3):171-8, 1997.

COSTA, J.O.; ALMEIDA, A.M.; JUNIOR, A.A.G.; CHERCHIGLIA, M. L.; E. I.G. ANDRADE.; ACURCIO, F.A. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde, Brasil: gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos, 2003 a 2006. **Cad. Saúde Pública**, 30(2):283-295, 2014.

JOHANSSON, E.; FORSBERG, K.; JOHANSSON, H. Clinical and experimental evaluation of the thromboprophylactic effect of hydroxychloroquine sulfate after total hip replacement. **Haemostasis** 1;10(2):89–96, 1981.

JOHNSON, R.; CHARNLEY, J. Hydroxychloroquine in prophylaxis of pulmonary embolism following hip arthroplasty. **Clin Orthop Relat Res.** ç144:174–7, 1979.

KAISER, R.; CLEVELAND, C.M.; CRISWELL, L.A. Risk and protective factors for thrombosis in systemic lupus erythematosus: results from a large, multiethnic cohort. **Ann Rheum Dis.** 68(2):238–41, 2009;

KAVANAUGH, A.; ADAMS-HUET, B.; JAIN, R.; DENKE, M.; MCFARLIN, J. Hydroxychloroquine effects on lipoprotein profiles (the HELP trial): a double-blind, randomized, placebo-controlled, pilot study in patients with systemic lupus erythematosus. **J Clin Rheumatol.**;3(1):3–8,1997.

KOLLIAS, G.; PAPADAKI, P.; APPARAILLY, F.; VERVOORDELDONK, M.J.; HOLMDAHL, R.; BAUMANS, V. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. **Ann Rheum Dis.**70(8):1357-6, 2011.

KUZNIK, A.; BENCINA, M.; SVAJGER, U.; JERAS, M. Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. **J Immunol**;186(8):4794–804, 2011.

LANGERIJT, V.A.G.; VAN LENT, P.L.; HERMUS, A.R.; SWEEP. C.G.; COOLS, A.R.; BERG VAN DEN, W.B. **Susceptibility to adjuvant arthritis: relative importance of adrenal activity and bacterial flora.** *Clinical Experimental Immunology*, v.97: p.33-38, 1994.

LEVY, R.A.O. Uso de Drogas Anti-Reumáticas na Gravidez. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 45, n. 3, p. 124-33, 2005.

LISETTE, BEVAART.; MARGRIET, J.; VERVOORDELDONK, L.; PAUL, P. ARTHRITIS & RHEUMATISM **American College of Rheumatology** Vol. 62, No. 8, , pp 2192–2205, 2010.

LORENTZEN, J. C.; OLSSON, T.; KLARESKOG, L. **Susceptibility to oil-induced arthritis in the DA rats is determined by MSHC and non-MSHC genes.** Transplantation Proceedings. v.27, p.1532–1534, 1995.

LOSQUI, Y.R.; ROZETE, F.S.S.; ALMEIDA, M.B.; BITTENCOURT, A.H.C.; PEREIRA, S.P.F. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.4, p.931-936, 2009.

MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 290-97, 2009.

MACEDO, E.V.; GEMAL, A.L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 290-97, 2009.

MARMOR, M.F.; KELLNER, U.; LAI, T.Y.; LYONS, J.S.; MIELER, W.F; American Academy of Ophthalmology. Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. **Ophthalmology**;118(2):415-22, 2011.

MARQUARDT, K.; TIMOTHY, E. Albertson Treatment of hydroxychloroquine overdose. **Am J Emerg Med.**;19(5):420–24, 2001.

MARTINEZ, M.J.A.; BESSA, A.L.; BENITO, P.B. Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). **Studies in Natural Products Chemistry**, Bioactive Natural Products (Part K). v. 30, p.703-759, 2007.

MATSINGOU, T.C.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLOU, A. In vitro anti-oxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Food Science**, v.65 p. 1060–1065, 2000.

MCLACHLAN, A.J.; TETT, S.E.; CUTLER, D.J. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of hydroxychloroquine and its major metabolites in biological fluids using an alpha 1-acid glycoprotein stationary phase. **J Chromatogr.** 570(1):119–12, 1993.

MCLACHLAN, A.J.; TETT, S.E.; CUTLER, D.J.; DAY, R.O. Disposition and absorption of hydroxychloroquine enantiomers following a single dose of the racemate. **Chirality**;6(4):360-64, 1994.

MCLACHLAN, A.J.; TETT, S.E.; CUTLER, D.J.; DAY, R.O. Disposition of the enantiomers of hydroxychloroquine in patients with rheumatoid arthritis following multiple doses of the racemate. **Br J Clin Pharmacol.**;36(1):78-81, 1993.

MELLO, F.B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos.** Porto Alegre. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological surveys of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p, 493-500, 2007.

MERCER, E.; REKEDAL, L.; GARG, R.; LU, B.; MASSAROTTI, E.M.; SOLOMON, D.H. Hydroxychloroquine improves insulin sensitivity in obese non-diabetic individuals. **Arthritis Res Ther.**;14(3):135, 2012.

MICHAEL F. MARMOR, MD, ULRICH KELLNER, MD, TIMOTHY Y.Y. LAI, MD, JONATHAN S. LYONS, MD, WILLIAM F. MIELER, MD, American Academy of Ophthalmology Revised Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine. **Retinopathy Ophthalmol.**;118(2): 415–422, 2011.

MIDDLETON-JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, p.673–751, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**, n. 03, 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dose\\_mensal\\_3\\_2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dose_mensal_3_2.pdf)>. Acesso em: 13/05/10.

MIRJAFARI, H.; AL-HUSAIN, A.; BRUCE, I.N. Cardiovascular risk factors in inflammatory arthritis. **Curr Opin Lipidol**;22(4):296–301, 2011.

MOORE, D.E.; HEMMENS, V.J. Photosensitization by anti-malarial drugs. **Photochem Photobiol.**; 36:71-77, 1982.

MOORE, D.E.; TAMAT, S.R. Photosensitizing by drugs: photolysis of some chlorine-containing drugs. **J, Pharm. Pharmacol.**;32:172-77, 1980.

MORRIS, S.J.; WASKO, M.C.; ANTOHE, J.L.; SARTORIUS, J.A.; KIRCHNER, H.L.; DANCEA, S. Hydroxychloroquine use associated with improvement in lipid profiles in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)*;63(4):530–4, 2011.

NICOLETTI, M.A. Administração de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e de plantas medicinais-importância da orientação correta para seu uso racional. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n.3, p. 264-271, 2009.

NOGUEIRA, N.P.A.; REIS, P.A.; LARANJA, G.A.T.; PINTO, A.C.; AIUB, C.A.F.; FELZENSZWALB, I.; BPAES, M.C.; BASTOS, F.F.; BASTOS, V.L.F.C.; SABINO, K.C.C.; COELHO, M.G.P. *In vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011.

NSERNST, E.; ROSE, M.; LEE, R. Modification of transoperative changes in blood fluidity by hydroxychloroquine: a possible explanation for the drug's antithrombotic effect. *Pharmatherapeutica* ;4(1):48–52., 1984.

O'DELL, J.R.; BLAKELY, K.W.; MALLEK, J.A.; ECKHOFF, P.J.; LEFF, R.D.; WEES, S.J. Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis: a two-year, double-blind comparison of minocycline and hydroxychloroquine. **Arthritis Rheum.**;44(10):2235–41. 2001.

OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; AMORIN, L.A.S.; BRANDÃO, M.G.L.; COELHO, M.M. Effect of the extract and fraction of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.465-469, 2005.

OLSEN, N.J.; SCHLEICH, M.A.; ARP, D.R. Multifaceted effects of hydroxychloroquine in human disease. **Semin arthritis rheum.**13:0049-0172, 2013.

PÁDUA, B.C.; SILVA, L.D.; ROSSONI-JÚNIOR, J.V.; HUMBERTO, J.L.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; COSTA, D.C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, 381–386, 2010.

PATON, N.I.; ABOULHAB, J. Hydroxychloroquine, hydroxyurea and didanosine as initial therapy for HIV-infected patients with low viral load: safety, efficacy and resistance profile after 144 weeks. **HIV Med**;6(1):13–20, 2005.

PAUL, E.L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; OLIVEIRA, C.B.; SANTOS, R.C.V.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C.M.A.; MOREIRA, K.B.; NUNES, F.B.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and lymphoproliferation *in vitro*. **Inflammation**, v.32, n.6, p. 419-425, 2009.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas Medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. 1ª ed. São Paulo: Annablume/Fapesp. p. 216, 2000.

PEDRAZZI, A.H.P.; RODRIGUES, E.R.; ZANARDO-FILHO, A.; FRANCO, J.J.; VICHNEWSKI, W. Hematological evaluation of Carqueja (*Baccharis trimera*) infusion. **Fitoterapia**, v.68, n.1, p.26-28, 1997.

PERON, A.P.; FELIPES, J.; MATTGE, G.I.; CANTAGALLI, L.B.; MARIUCCI, R.G.; VICENTINI, V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e

Solanum melongena L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, p.127-130, 2008.

PETRI, M.; LAKATTA, C.; MAGDER, L.; GOLDMAN, D. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. **Am J Med.**;96(3):254–9, 1994.

PINHO, D.S.; STURBELLE, R.T.; MARTINO-ROTH, M.G.; GARCIAS, G.L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.2, p.165-170, 2010.

PONS-ESTEL, G.J., ALARCO, N.G.S.; MCGWIN, G.; DANILA, M.I.; ZHANG, J.; BASTIAN, H.M. Protective effect of hydroxychloroquine on renal damage in patients with lupus nephritis: LXV, data from a multiethnic US cohort. **Arthritis Rheum.**;61(6):830–9, 2009.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER, B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P. et al. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Altern. Lab. Anim.**, v.34, n. 3, p. 315-41, 2006.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.; **Tecnologia Farmacêutica**, vol. 1.5ª ed.; Calouste Gulbenkian: Porto, 1995.

PROWSE, C.; PEPPER, D.; DAWES, J. Prevention of the platelet alpha-granule release reaction by membrane-active drugs. **Thromb Res.**;25(3):219–27, 1982.

PURCHASE, I.F.H.; PHILIP, A. BOTHAM, L.H.; BRUNER, O.P.; FLINT, J.M. FRAZIER, W.S. Workshop Overview: Scientific and Regulatory Challenges for the Reduction, Refinement, and Replacement of Animals in Toxicity Testing **Toxicol. Sci.**43(2):86-101, 1998.

QUATRARO, A.; CONSOLI, G.; MAGNO, M.; CARETTA, F.; NARDOZZA, A.. CERIELLO, A., GIUGLIANO, D. Hydroxychloroquine in decompensated, treatment-refractory noninsulin-dependent diabetes mellitus. A new job for an old drug?. *Ann Intern Med.*;112(9):678-81, 1990.

RAHMAN. P.; GLADMAN, D.D.; UROWITZ, M.B.; YUEN, K.; HALLETT, D.; Bruce, I.N. The cholesterol lowering effect of antimalarial drugs is enhanced in patients with lupus taking corticosteroid drugs. **J Rheumatol**;26(2):325–30, 1999.

RAINES, M.F.; BHARGAVA, S.K.; ROSEN, E.S. The blood-retinal barrier in chloroquine retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**;30:1726-31, 1989.

RAMOS-RUIZ, R.; LOPEZ-BOTE, J.P.; PELAYO, F.; LARRAGA,V.; ZEE VAN DER, R.; BERNABEU, C. **Cellular and humoral reactivity pattern to the mycobacterial heat shock protein HSP65 in adjuvant arthritis susceptible and resistant Wistar rats.** *Autoimmunity.*, v.9: p.1-5, 1991.

RAMOS-RUIZO, R.; LOPEZ-BOTE, J.P.; PELAYO, F.; LARRAGAO, V.; VAN DER ZEE, R.; BERNABEU, C. **Cellular and humoral reactivity pattern to the mycobacterial heat shock protein hsp65 in adjuvant arthritis susceptible and resistant wistar rats.** *Autoimmunity*, v.9, p. 1-5, 1991.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, A.O.; EL-HADIYAH, T.M.; AL-MAJED, A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Sci Pharm** 70: 135-145, 2002.

REAGAN-SHAW, S. NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited **The FASEB Journal**, p. 659-661, 2007.

REBELATTO, J. R.; MORELLI, J.G.S. **Fisioterapia Geriátrica**. Barueri – São Paulo: Editora Manole, v. p.268, 2005.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A. P.; SCHMIDT, S.R.G. O uso de opióides no tratamento da dor crônica não oncológica: o papel da metadona. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v.52, n.5, p.644-651, 2002.

RODRIGUES, C.R.F.; DIAS, J.H.; MELLO, R.N. RICHTER, M.F. PICADA, J.N.; FERRAZ, A.B.F. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, n.1, p.97-101, 2009.

ROLAIN, J.M.; COLSON, P.,;RAOULT, D. Recycling of chloroquine and its hydroxyl analogue to face bacterial, fungal and viral infections in the 21st century. **Int J Antimicrob Agents**;30(4):297–308, 2007.

ROLIM, L.A. Obtenção tecnológica de forma farmacêutica associação em dose fixa para o tratamento da filariose linfática e estudo de estabilidade forçada dos fármacos. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v, 16, n. 1, p. 311 - 318, 2011.

ROSSATO, C. **Caracterização da fase inicial da artrite induzida pelo pristane em camundongos Seleccionados para alta ou baixa produção de anticorpos: envolvimento celular e molecular.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – SP, 2011.

RUIZ, A.L.T.G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V.H.S.; CARVALHO, J.E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.295-300, 2008.

RUIZ-IRASTORZA, G.; RAMOS-CASALS, M.; BRITO-ZERON, P.; KHAMASHTA, M.A. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* ;69(1):20–8. 2010.

SACHET, J.C.; BORBA, E.F.; BONFA, E.; VINAGRE, C.G.; SILVA, V.M.; MARANHÃO, R.C. Chloroquine increases low-density lipoprotein removal from plasma in systemic lupus patients. **Lupus**;16(4):273–8, 2007.

SANTOS, F.L.A.: Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida associação em dose fixa à base do extrato liofilizado de *Baccharis trimera* (less.) Dc. e do sulfato de Hidroxicloroquina como alternativa terapêutica para o tratamento da artrite reumatoide. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SAVARINO, A.; GENNERO, L.; SPERBER, K.; BOELAERT, J.R. The anti-HIV-1 activity of chloroquine. **J Clin Virol.**;20(3):131–5, 2001.

SEMENIUK, A.; NIEDOSPIAL, A.; KALINOWSKA-TLUSCIK, J.; NITEK, W.; OLEKSYN, B.J. Molecular geometry of antimalarial amodiaquine in different crystalline environments. **J Mol Struct.** 875(1–3): 32–41, 2008.

SHAPIRO, T.A.; GOLDBERG, D.D. Quimioterapia das infecções por protozoários. In: Goodman LS; Gilman A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill;. p. 927-9, 2006.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. 1. ed. Santa Fé de Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000.

SHOLZ, E.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. **Plantas Medica**, v. 60 p. 360–364, 1994.

SILVA, F.G.; OLIVEIRA, C.B.A.; PINTO, J.EBP.; NASCIMENTO, V.E.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H.. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.5, p. 990-997, 2007.

SIMÕES, C. M. O.et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora de UFSC, 1102 p., 2007.

SIMÕES-PIRES, C.A.; QUEIROZ, E.F.; HENRIQUES, A.T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v.16, n.5, p.307-314, 2005.

SOICKE, H. LENG-PESCHLOW, A. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Med.** 53: 37–39, 1987.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica** V. I. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

SOUSA, L.A. Produtividade e nutrição em três acessos de *Baccharis trimera* em função da adubação organo-mineral, em casa de vegetação. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Botucatu, SP, 2005.

SPERBER, K.; CHIANG, G.; CHEN, H.; ROSS, W.; CHUSID, E.; GONCHAR, M. Comparison of hydroxychloroquine with zidovudine in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus type 1. **Clin Ther.**;19(5):913–23, 1997.

SPERBER, K.; LOUIE, M.; KRAUS, T.; PRONER, J.; SAPIRA, E.; LIN., S. Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type **Clin Ther.**;17(4):622–36, 1995.

TANENBAUM, L.; DENNY, M.; TUFFANELLI, M.D., Antimalarial agents. **Arch. Dermatol.**; 116:587-591, 1980.

TASCETTO, A. P. D. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* frente ao microorganismo *Helicobacter pylori*. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento). Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2010.

TETT, S.E.; CUTLER, D.J.; DAY, R.O.; BROWN, K.F. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.*;27(6):771-79, 1989  
THE UNITED States Pharmacopoeia National 36. National Formulary 31: Rockville:. p. 2592-3, 2013.

TIMMERMANN, B.N.; HOFFMANN, J.J.; JOLAD, S.D.; SCHRAM, K.H.; KLENCK, R.E.; BATES, R.B.;. Constituents of *Chrysothamnus paniculatus* 3,4,5-O-[E]-tricafeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-O-[E]-dicafeoylquinic, 3,5-O-[E]-dicafeoylquinic and 4,5-dicafeoylquinic acids. **Journal of Natural Products** **46**: 365–368, 1983.

TIRLING, T.S.; THOMAS, S.D.; HOBEBMAN S.; KIORPES, A.; KHETANI, A.V. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. **Toxicology** 179: 183-196, 2002.

TOFOVIC, S.; JACKSON, E.K.. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **J Cardiovasc Pharmacol** 33: 360-366, 1999.

TØNNESEN, H. H. GRISLINGAAS, A. L.; WOO, S. O.; KARLSEN, J. **Photochemical** stability of antimalarials. *Int J Phar.*, v. 43, p. 215-219, 1988.

TORRES, L.M.B.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LANDMAN, M.T.L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v.55, p. 617-619, 2000.

TRENTHAM, D.E.; TOWNES, A.S.; KANG, A.H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 146, n. 3, p. 857-868, 1977.

UNRO, R.; MORRISON, E.; MCDONALD, A.G.; HUNTER, J.A.; MADHOK, R.; CAPELL, H.A. Effect of disease modifying agents on the lipid profiles of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**;56(6):374–7,1997.

USP, The United States Pharmacopoeia 36 - National Formulary NF 31 – Inc.. Rockville, MD, p. 2592-3, 2013.

VERDI, L.G.; BRIGHENT, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, 85–94, 2005.

WALLACE, D.J. Does hydroxychloroquine sulfate prevent clot formation in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum.*;30(12):1435–6., 1987.

WEINBERG, D.V.; D'AMICO, D.J. Retinal toxicity of systemic drugs. In: Albert DM, Jakobiec FA, editors. *Principles and practice of ophthalmology: clinical practice*. Philadelphia: **W.B. Saunders**;. p.3284-5, 1994.

WEISS, S. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v.320, p.365–379, 1989.

WELLS, B.G.; DIPIRO, J.T.; SCHWINGHAMMER, T.L.; HAMITON, C.W. **Manual de Farmacoterapia**. 6ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, p.29, 2006.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 143-145, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Handbook – Non Clinical Safety Testing. Geneva: TDR/WHO, 2004. 117p. Disponível em:  
<<http://www.who.int/tdr/publications/publications/safety-handbook.htm>>.

WILDER R.L.; GRIFFITHS, M.M.; CANNON, G.W.; CASPI, R.; REMMERS, E.F.:  
**Susceptibility to autoimmune disease and drug addiction in inbred rats. Are there mechanistic factors in common related to abnormalities in hypothalamic–pituitary–adrenal axis and stress response function.** Annals of the New York Academic Science. 917: 784-796, 2000.

WILDER,R.L.; REMMER, F.; KAWAHITO, Y.; GULKO, P.S.; CANNON, G.W.;  
GRIFFITHS, M.M. Genetic factors regulating experimental arthritis in mice and rats. **Curr Dir Autoimmun.**;1:121-65, 1999

WILLIAMS, R.O. **Collagen-Induced Arthritis in Mice** pp 265-284 in Target Discovery and Validation Reviews and Protocols Methods in Molecular Biology, Volume 361, Sioud, Mouldy (Ed.), 2007.

WOLFE, F.; MARMOR, M.F. Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care Res.**;62(6):775–84, 2010.

# ANEXOS

---



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
**COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo da associação em dose fixa do fármaco Hidroxicloroquina + *Baccharis trimera* (carqueja) em modelo experimental de artrite**”, protocolo nº **0005/070813**, que utiliza 228 animais da espécie *Mus Musculus* e 60 animais da espécie *Rattus Novergicus*, sob a responsabilidade de **Pablo de Ataíde Ferreira**, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled " **Study of fixed-dose combination of the pharmaco hidroxicloroquina + *Baccharis trimera* (carqueja) in experimental models of arthritis** ", protocol number **0005/070813**, utilizing 228 animal species *Mus Musculus* and 60 animal species *Rattus Novergicus*, under the responsibility **Pablo de Ataíde Ferreira**, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 09 de agosto de 2013.

Prof. Márcia Bento Moreira

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF

Prof. Alexandre H. Reis

Coordenador do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF