

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIEL SILVA VIANA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
PROSTAGLANDINA E2 E LEUCOTRIENO B4 EM PLASMA HUMANO E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
LAURACEAE**

Alfenas/MG

2024

GABRIEL SILVA VIANA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
PROSTAGLANDINA E2 E LEUCOTRIENO B4 EM PLASMA HUMANO E
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA
LAURACEAE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.
Orientadora: Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula
Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Carolina Pires Bueno

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Viana, Gabriel Silva.

Desenvolvimento de método para determinação simultânea de Prostaglandina E2 e Leucotrieno B4 em plasma humano e avaliação de atividade anti-inflamatória de espécies da família Lauraceae / Gabriel Silva Viana. - Alfenas, MG, 2024.

52 f. : il. -

Orientador(a): Daniela Aparecida Chagas-Paula.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Cicloxigenase. 2. Lipoxigenase. 3. Espectrometria de massas. 4. Ocotea. 5. Nectandra. I. Chagas-Paula, Daniela Aparecida, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE PROSTAGLANDINA E2 E LEUCOTRIENO B4 EM PLASMA HUMANO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE.”

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovado em: 16 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Rosana Casoti

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Aparecida Chagas de Paula, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2024, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1187793** e o código CRC **541746D4**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, sobretudo aos meus pais, Cleidy e José Paulo. Este trabalho e minha formação seriam impossíveis sem seus suores e apoio ao longo dessa jornada. É uma conquista não só minha, como deles também.

Minha gratidão às minhas orientadoras professoras Daniela Chagas e Paula Bueno pela oportunidade e ensinamentos, tanto profissional quanto pessoal. Às professoras Marisi Soares e Danielle Dias, e todos os meus(minhas) companheiros(as) do grupo de pesquisa LFQMM.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ-02353-17, APQ-00207-18, APQ-05218-23, APQ-00544-23 e BPD-00760-22); do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (408115/2023-8, 316204/2021-8 e 406837/2021-0); e da Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UNIFAL-MG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Acredita-se que substâncias capazes de inibir simultaneamente as enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) tenham atividade anti-inflamatória superior e menos efeitos adversos. Assim, para a busca por substâncias com este mecanismo de ação, necessita-se de métodos acessíveis que avaliem a inibição dessas enzimas. Prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LTB4) são importantes mediadores da cascata inflamatória, sendo produzidos pelas enzimas COX e LOX, respectivamente. Existem métodos para quantificação de PGE2 em plasma humano, no entanto, para quantificação de LTB4 os ensaios disponíveis apresentam limitações. A família Lauraceae apresenta uma série de espécies com promissora atividade anti-inflamatória relatados na literatura, porém poucas foram investigadas quanto a mecanismo de ação de dual inibição das vias COX e LOX. Neste sentido, um ensaio capaz de avaliar simultaneamente a inibição das vias COX e LOX, por meio da quantificação de PGE2 e LTB4 em plasma humano, foi desenvolvido para viabilizar a avaliação a atividade anti-inflamatória de extratos de plantas da família Lauraceae. Neste ensaio, a inflamação foi induzida em sangue humano, tratada com as amostras a serem testadas e fármacos de referência como grupos controle. A extração dos analitos se deu mediante precipitação de proteínas e extração em fase sólida. Os analitos, PGE2 e LTB4, foram quantificados por meio de cromatografia acoplada a espectrometria de massas. Os dados adquiridos foram tratados mediante análise de variância, seguido pelo teste de Dunnett e Mann-Whitney. Posteriormente, extratos de quatro espécies da família Lauraceae – *Ocotea odorifera*, *Ocotea diopyrifolia*, *Persea major* e *Nectandra membranacea* – foram investigados quanto à sua atividade anti-inflamatória. Como resultados, pôde-se observar que a metodologia desenvolvida preencheu os critérios de confiabilidade de ensaio limite (seletividade e limite de detecção) e ineditamente constatou-se atividade de inibição dual das vias COX e LOX para todas as quatro espécies avaliadas. Portanto, neste trabalho foi desenvolvida, validada e aplicada uma nova metodologia, capaz viabilizar a descoberta de amostras anti-inflamatórias com mecanismo de ação diferencial ao dos medicamentos disponíveis atualmente.

Palavras-chave: Cicloxigenase; Lipoxigenase; Espectrometria de Massas; *Ocotea*; *Persea*; *Nectandra*.

ABSTRACT

It is believed that substances capable of simultaneously inhibiting the cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) enzymes have superior anti-inflammatory activity and fewer adverse effects. Therefore, for the search for substances with this mechanism of action, accessible methods are needed to evaluate the inhibition of these enzymes. Prostaglandin E2 (PGE2) and leukotriene B4 (LTB4) are important mediators of the inflammatory cascade, produced by the COX and LOX enzymes, respectively. There are methods for quantifying PGE2 in human plasma; however, for the quantification of LTB4, the available assays have limitations. The Lauraceae family presents a series of species with promising anti-inflammatory activity reported in the literature, but few have been investigated for the mechanism of action of dual inhibition of the COX and LOX pathways. In this sense, an assay capable of simultaneously evaluating the inhibition of the COX and LOX pathways, through the quantification of PGE2 and LTB4 in human plasma, was developed to enable the evaluation of the anti-inflammatory activity of plant extracts from the Lauraceae family. In this assay, inflammation was induced in human blood, treated with the samples to be tested, and reference drugs as control groups. The extraction of the analytes was carried out by protein precipitation and solid-phase extraction. The analytes (PGE2 and LTB4) were quantified by chromatography coupled to mass spectrometry. The acquired data were treated by analysis of variance, followed by the Dunnett and Mann-Whitney tests. Subsequently, extracts from four species of the Lauraceae family – *Ocotea odorifera*, *Ocotea diopyrifolia*, *Persea major*, and *Nectandra membranacea* – were investigated for their anti-inflammatory activity. As a result, it was observed that the developed methodology met the criteria of reliability, selectivity, and detection limit of the assay, and it was determined, unprecedentedly, the dual inhibition activity of the COX and LOX pathways for all evaluated species. Therefore, in this work, it was possible to develop and validate a new methodology capable of enabling the discovery of anti-inflammatory samples with a mechanism of action differential to those of currently available medication.

Keywords: Cyclooxygenase; Lipoxygenase; Mass spectrometry; *Ocotea*; *Persea*; *Nectandra*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	INFLAMAÇÃO	11
2.2	ANTI-INFLAMATÓRIOS	13
2.3	AVALIANDO A ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	14
2.4	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA NA FAMÍLIA LAURACEAE	15
3	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO GERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4	METODOLOGIA	18
4.1	PREPARO DO EXTRATO DAS PLANTAS PARA O ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO	18
4.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	18
4.3	ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO OTIMIZADO	18
4.3.1	Indução da inflamação	18
4.3.2	Precipitação de proteínas	19
4.3.3	Extração em fase sólida	19
4.3.4	Ressuspensão e análise	20
4.3.5	Tratamento dos dados	20
4.4	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E ESPECTROMÉTRICOS	20
4.5	FIGURAS DE MÉRITO AVALIADAS	21
4.5.1	Seletividade	21
4.5.2	Limite de detecção (LD)	22
4.5.3	Estabilidade dos analitos	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	24
5.1.1	Desenho experimental do ensaio anti-inflamatório	24
5.1.2	Considerações sobre o padrão interno	26
5.1.3	Liofilização do plasma	28

5.1.4	Otimizando o volume de matriz e solventes	29
5.1.5	Otimização do monitoramento de reações múltiplas (MRM)	30
5.1.6	Análise estatística	31
5.2	DESCRIÇÃO E ANÁLISE DO MÉTODO	32
5.2.1	Natureza do método: ensaio limite	32
5.2.2	Seletividade	33
5.2.3	Limite de detecção (LD)	33
5.2.4	Estabilidade dos analitos	34
5.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO	37
5.3.1	Representação gráfica do ensaio anti-inflamatório	37
5.3.2	Concentração dos analitos	38
5.3.3	Análise estatística	39
5.3.4	Atividade anti-inflamatória das espécies investigadas	40
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta a gatilhos nocivos como lesão tecidual e infecção. Quando esta resposta é bem sucedida, há a eliminação dos agentes infecciosos seguida de resolução e reparo do tecido (Medzhitov, 2008). Porém, quando a resposta inflamatória é excessiva ou inadequada, pode ser um fator chave na patogênese de muitas doenças como câncer, artrite reumatoide, Alzheimer, diabetes mellitus, etc. (Kaur; Singh, 2022).

Sabe-se que a iniciação do processo inflamatório depende do papel de macrófagos que, junto de células locais, induzem a produção de diversas substâncias biologicamente ativas denominadas mediadores inflamatórios. Estes alteram a funcionalidade de tecidos e órgãos provocando os efeitos da inflamação (Medzhitov, 2008). Tais mediadores são produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA), na qual é metabolizado por três sistemas enzimáticos distintos: o das cicloxigenases (COX); lipoxigenases (LOX); e citocromo (Wang *et al.*, 2021).

Existem duas isoformas da COX, a COX-1 e COX-2, que metabolizam o AA livre de modo a produzir prostanóides como por exemplo a prostaglandina E2 (PGE2), dentre outros mediadores os quais estão associados aos sinais de inflamação, tais como dor, febre, edema (Hanna; Hafez, 2018; Hansen *et al.*, 2012). Em linhas gerais, a COX-1 está associada a funções homeostáticas, enquanto a COX-2 é induzida em condições inflamatórias, embora esta também seja constitutiva de alguns tipos de células (Carvalho *et al.*, 2022).

Já para a LOX, são 4 isoformas conhecidas: 5-LOX; 8-LOX; 12-LOX; e 15-LOX. Dentre elas, a 5-LOX é responsável pela catálise da síntese dos leucotrienos (LTs), sendo eles: LTB4, LTC4, LTD4 e LTE4 (Wang *et al.*, 2021). O LTB4 especificamente desempenha um potente papel quimiotático sobre leucócitos conduzindo-os a tecidos inflamados, promovendo a defesa antimicrobiana, assim como modulando o sistema imune (Wan *et al.*, 2017).

Substâncias anti-inflamatórias mitigam os efeitos da inflamação através da inibição de enzimas envolvidas na formação dos mediadores inflamatórios que possuem o AA como precursor. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) não-seletivos, inibem tanto a enzima COX-1 quanto a COX-2. Apesar do êxito para impedir a formação do amplo espectro de prostaglandinas (PGs) e conseqüentemente eficaz para tratar processos inflamatórios, sua utilização tem limitações devido à efeitos

adversos como danos gástricos, insuficiência renal e derrame, especialmente em tratamentos prolongados (Meshram *et al.*, 2021). Diante disso, outra classe de anti-inflamatórios – os AINEs seletivos – foram desenvolvidos objetivando apenas inibir a síntese de PGs pró-inflamatórias derivadas da enzima COX-2, e deixando intactas a produção de PGs derivadas da COX-1 envolvidas na homeostase – equilíbrio hídrico, eletrolítico renal, citoproteção gástrica e agregação plaquetária (Funk, 2001; Meshram *et al.*, 2021). Estes AINES seletivos, por sua vez, apesar de apresentarem bom perfil terapêutico em relação aos AINES não-seletivos, apresentam outros efeitos adversos como os cardiovasculares (Meshram *et al.*, 2021).

Uma vez que a via para formação das PGs é impedida, o metabolismo do AA é direcionado para o sistema enzimático das LOX, conseqüentemente acentuando a formação de LTs. Isso leva à broncoconstrição, inflamação das vias aéreas e recrutamento de células inflamatórias, importantes efeitos colaterais dos anti-inflamatórios AINES não-seletivos (Jacob *et al.*, 2018; Meshram *et al.*, 2021). Como resposta a este obstáculo, a abordagem atual se concentra no desenvolvimento e busca por agentes anti-inflamatórios capazes de inibir tanto a enzimas COX quanto 5-LOX, sendo denominados inibidores duais da COX-LOX. Com isso, espera-se obter melhores efeitos terapêuticos juntamente com menores efeitos adversos (Gaddi; Cicero; Pedro, 2004; Jacob *et al.*, 2018; Mukhopadhyay *et al.*, 2023).

Metabólitos secundários de produtos naturais oferecem uma grande esperança para o desenvolvimento de novas substâncias anti-inflamatórias (Attiq *et al.*, 2018). Neste sentido, um ensaio capaz de avaliar tal atividade seria ferramenta valiosa para triagem de produtos naturais ainda não investigados quanto seus efeitos anti-inflamatórios. A família Lauraceae abrange de 2500 a 3000 espécies de plantas (Zhang *et al.*, 2023), dentre as quais há relatos de seu uso popular para tratamento de diversas condições, incluindo doenças inflamatórias (Damasceno *et al.*, 2019). Além disso, há estudos reportando a presença de atividade anti-inflamatória em espécies da família Lauraceae, no entanto, a maioria das integrantes da família ainda não foram investigadas quanto a esta atividade (de Alcântara *et al.*, 2023). Neste contexto, evidencia-se a importância do desenvolvimento de um ensaio capaz avaliar atividade anti-inflamatória, especialmente inibição dual COX-LOX, e estabelece-se a oportunidade de explorar espécies da família Lauraceae com potencial anti-inflamatório ainda não estudadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFLAMAÇÃO

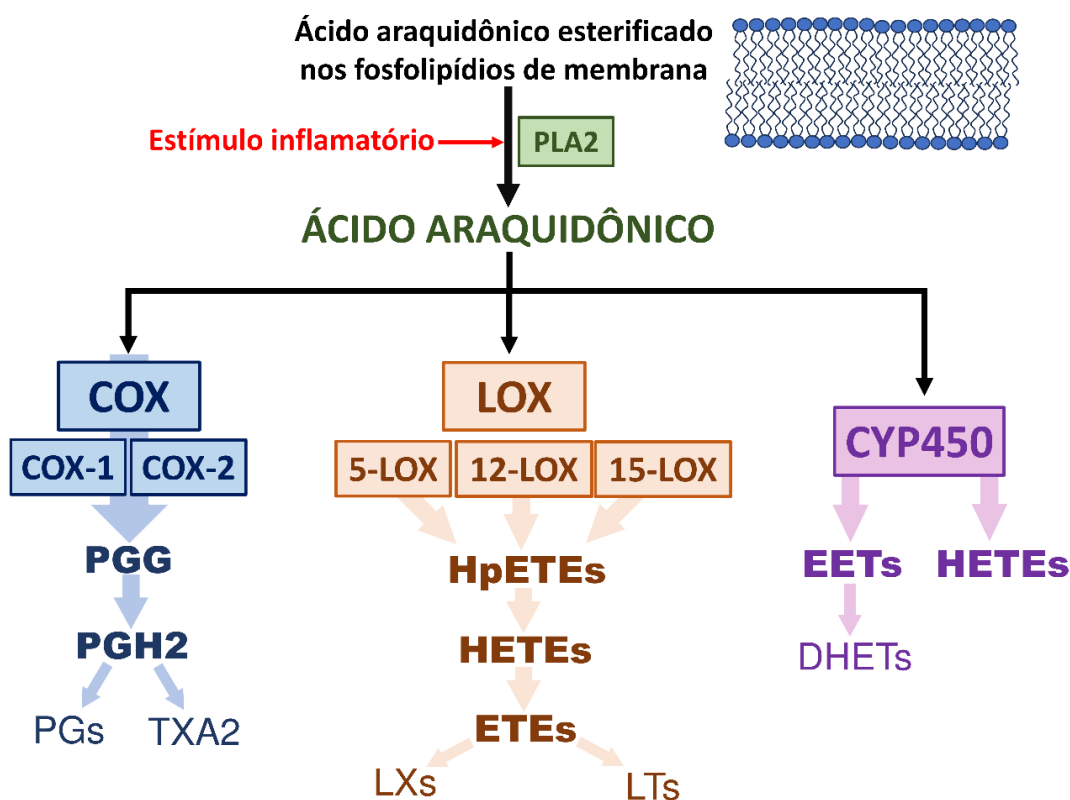
A inflamação é um processo biológico de defesa complexo e necessário, que se dá em resposta a estímulos biológicos, químicos ou físicos. Os eventos celulares e moleculares que iniciam e regulam o processo inflamatório ainda não foram completamente elucidados, portanto, permanecendo objeto de investigação (Germolec *et al.*, 2018). Sabe-se que a resposta inflamatória aguda é caracterizada pela produção de substâncias biologicamente ativas denominadas mediadores inflamatórios. Estas substâncias são responsáveis pelas manifestações clínicas da inflamação como dor, vermelhidão, inchaço e calor (Serhan; Chiang; Van Dyke, 2008). Além disso, os mediadores inflamatórios amplificam os sinais inflamatórios através do recrutamento de leucócitos, citocinas pró-inflamatórias, e células imunes, com a finalidade de auxiliar na resistência e depuração de patógenos. Num segundo momento, o processo inflamatório é resolvido mediante produção e ação de mediadores pró-resolução, equilibrando os sinais inflamatórios (Hanna; Hafez, 2018; Tallima; El Ridi, 2018).

O AA é naturalmente encontrado incorporado na estrutura fosfolipídios na membrana celular do corpo ou armazenada dentro de corpos lipídicos em células imunes. É particularmente abundante nos fosfolipídios do músculo esquelético, cérebro, fígado, baço e retina (Hanna; Hafez, 2018). Os fosfolipídios são liberados da membrana celular quando a mesma é submetida a estímulos inflamatórios. Enzimas como a Fosfolipase A2 (PLA2) promovem a hidrólise de fosfolipídeos convertendo-os em AA, os quais são posteriormente metabolizados e transformados nos mediadores inflamatórios supracitados. Atualmente, é sabido que pelo menos três vias metabólicas (a via COX, a via LOX e a via CYP450) estão envolvidas no metabolismo do AA (Figura 1), sendo a COX e a LOX as duas principais (Wang *et al.*, 2019).

A via das cicloxigenases (COX) corresponde ao metabolismo do AA mediado pelas enzimas COX, também conhecidas como prostaglandinas G/H sintases. Estas enzimas convertem o AA em PGH₂ e PHG₂, que serão posteriormente convertidas em prostaglandinas (PGs) específicas: PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF₂ e TXA₂. Há dois tipos principais de enzimas desta classe, a COX-1 e COX-2. A principal diferença entre elas é que a primeira é expressa constitutivamente por todo o organismo, enquanto a

COX-2 é induzida. Embora essa diferenciação seja mais comumente observada, há exceções importantes (Funk, 2001; Wang *et al.*, 2021). O perfil da produção de PGs é determinado pela diferença de expressão destas duas enzimas nas células dos locais de inflamação. Por exemplo, os mastócitos geram predominantemente PGD₂, enquanto os macrófagos produzem PGE₂ e TXA₂ (Wang *et al.*, 2021).

Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo do ácido araquidônico.



Fonte: De autoria própria (2024).

A via das lipoxigenases (LOX) diz respeito à metabolização do AA pelas enzimas 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX e 15-LOX, que atuam inserindo oxigênio molecular ao AA convertendo-o em quatro tipos de ácidos hidropoxyeicosatetraenóicos (HpETEs): 5-HpETE; 8-HpETE; 12-HpETE; e 15-HpETE; respectivamente. Os HPTes são reduzidos por peroxidases de modo a formar ácidos mono-hidroxi eicosatetraenóicos (HETEs). Estes, por sua vez, são convertidos em substâncias bioativas como leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), e hepoxilinas (Wang *et al.*, 2021). Na fase aguda da resposta inflamatória, as células do sistema imunológico migram para o local da lesão em uma sequência cuidadosamente orquestrada de eventos.

Dependendo do grau de lesão, esta fase aguda pode ser suficiente para resolver o dano e iniciar processos de cicatrização. Quando há uma exposição prolongada ao estímulo inflamatório, ou uma reação inadequada ocorre, a inflamação alcança a fase crônica, podendo resultar em danos nos tecidos e fibrose. A inflamação crônica tem sido associada a inúmeras doenças como artrite, asma, aterosclerose, doenças autoimunes, diabetes e câncer, e envelhecimento (Germolec *et al.*, 2018).

2.2 ANTI-INFLAMATÓRIOS

O tratamento de dor e febre – manifestações comuns da inflamação – remonta 3500 anos com a utilização da casca de salgueiro pelos egípcios e sumérios, que mais tarde seria matéria prima para descoberta da aspirina. Em 1828, tomou-se conhecimento do ingrediente responsável por tal atividade com o trabalho de Johann Buchner, que refinou a casca de salgueiro de modo a obter um cristal amarelado até então denominado de salicina. Mais tarde, em 1838, Raffaele Piria obteve uma substância muito mais potente partindo dos cristais isolados, o ácido salicílico. Esta nova substância foi modificada por Charles Gerhardt (1852) através da introdução de um grupo acetil ao ácido salicílico, e embora este produto não fosse estável, seu trabalho foi inédito na síntese do produto que mais tarde seria nomeado de aspirina (Desborough; Keeling, 2017).

Com o advento do conhecimento sobre o mecanismo do processo inflamatório descobriu-se que o ácido acetilsalicílico inibe enzimas da via COX de maneira não seletiva, ou seja, tanto a COX-1 quanto a COX-2. Anti-inflamatórios com este mesmo mecanismo de ação são denominados anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) não seletivos, ou tradicionais (Kroesen *et al.*, 2017). Nesta categoria estão incluídos os fármacos Diclofenaco, Ibuprofeno, Indometacina, Cetoprofeno, dentre outros. A inibição desta via impede a formação de tromboxanos envolvidos na adesão plaquetária, e prostaglandinas que exercem papel na vasodilatação, elevação do ponto de ajuste da temperatura no hipotálamo (febre), e antinocicepção (capacidade de perceber dor). Os AINEs apresentam efeitos adversos gástricos bem conhecidos, possivelmente devido à inibição da produção de prostaglandinas oriundas da COX-1 envolvidas na proteção da mucosa gástrica, podendo ocorrer principalmente em pacientes com histórico de úlceras pépticas (Ghlichloo; Gerriets, 2019).

Com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais consequentes da inibição da COX-1 visando assegurar a integridade da mucosa gástrica, introduziu-se uma nova classe de fármacos denominados AINEs seletivos, capazes de inibir seletivamente a COX-2 como o Celecoxibe e Rofecoxib. No entanto, observou-se um maior risco de problemas cardiovasculares para esta classe devido à redução dos níveis de prostaglandina I₂ (PGI₂) endotelial, e aumento dos níveis do agregador plaquetário tromboxano A₂ (TXA₂) (Jacob *et al.*, 2018). Prostaglandinas oriundas de ambas enzimas COX 1 e 2 têm influência na hemodinâmica renal, e não há problemas quando há função renal normal. No entanto, o uso de AINEs pode desencadear complicações em condições de disfunção renal (Ghlichloo; Gerriets, 2019).

A inibição de qualquer uma das vias pode redirecionar o metabolismo do AA para outra via, resultando em novos efeitos secundários (Jacob *et al.*, 2018). Quando a síntese de prostaglandinas é bloqueada pela inibição da COX, o AA é metabolizado pela via alternativa da LOX, na qual os leucotrienos gerados estão associados à asma e reações alérgicas (Ahmadi *et al.*, 2022). Neste sentido, acredita-se que substâncias capazes de inibir simultaneamente as enzimas COX-2 e 5-LOX estejam associadas a um bom perfil terapêutico com efeitos adversos são reduzidos (Jacob *et al.*, 2018).

Os corticosteróides representam uma quarta classe de anti-inflamatórios além de apresentarem outras atividades biológicas como imunossupressão, inibição da expressão gênica de leucócitos e células estruturais como o epitélio. Na perspectiva do metabolismo do ácido araquidônico inibem a atividade da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), impedindo que os fosfolipídios de membrana sejam hidrolisados e consequentemente impedindo a liberação do AA. Portanto, toda a cascata é bloqueada, e a formação de todos os produtos do AA inviabilizada. Possuem efeito terapêutico significativo, no entanto, os riscos também são. Os efeitos adversos envolvem osteoporose, ganho de peso e redistribuição da adiposidade, diabetes e hiperglicemia, miopatia, imunossupressão, supressão do crescimento, perturbação psiquiátrica, além de adversidades gastrointestinais, dermatológicas e cardiovasculares (Hodgens; Sharman, 2023).

2.3 AVALIANDO A ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Ensaio *ex vivo* consistem em experimentos que mimetizam o microambiente de um organismo vivo, estando mais próximo do real quando comparados a um

experimento *in vitro* – que por sua vez avalia a inibição do substrato diretamente sobre uma enzima ou linhagem celular específica, ao invés de avaliar uma amostra biológica complexa (Kapila; Kapila; Vij, 2017). Desenvolvê-los é extremamente relevante para estudos de triagem pré-clínicos, dado que não é ético realizar ensaios *in vivo* sem avaliação preliminar do potencial farmacológico da amostra em ensaios *ex vivo* ou *in vitro* anteriormente (Butterweck; Nahrstedt, 2012; Rosa *et al.*, 2021).

No âmbito da avaliação da atividade anti-inflamatória, o desenho experimental baseia-se na indução de um processo inflamatório sobre uma matriz biológica recém adquirida de um organismo (sangue total ou plasma sanguíneo, por exemplo), seguido do tratamento com a substância a ser testada (Rosa *et al.*, 2021). A avaliação do potencial anti-inflamatório de uma amostra pode ser feita através da quantificação de mediadores envolvidos na cascata inflamatória (Bergqvist *et al.*, 2020). Isto é possível pois uma vez que a inibição das enzimas COX e 5-LOX sejam bem sucedidas, a formação de seus respectivos mediadores inflamatórios é conseqüentemente impossibilitada (Fiorucci *et al.*, 2001; Jarrar *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2016). A quantificação dos mediadores indica o grau de inibição das enzimas, quando comparada com grupos controles positivos (inflamação tratada com anti-inflamatórios de referência) e negativos (inflamação não tratada). Neste caso, uma redução da concentração de PGE2 em relação ao controle negativo é indicativo de inibição da enzima COX. De modo análogo, o LTB4 permite inferir sobre a inibição da enzima 5-LOX (Mukhopadhyay *et al.*, 2023; Sarveswaran; Jayasuriya; Suresh, 2017).

Existem ensaios *ex vivo* descritos na literatura para quantificação de PGE2 e LTB4, no entanto, utilizam grande volume de matriz biológica, inviabilizando a triagem de numerosas amostras. Galvão e colaboradores (2016) desenvolveram um método capaz de avaliar 22 eicosanoides simultaneamente em sangue humano. No entanto, partindo de 300 µL de plasma, sendo necessário, portanto, no mínimo 600 µL de sangue humano por amostra a ser testada (Galvão *et al.*, 2016). Já Sorgi e colaboradores (2018) e Rosa e colaboradores (2021) desenvolveram métodos dependentes de menor volume de sangue: 300 µL e 200 µL, respectivamente (Rosa *et al.*, 2021; Sorgi *et al.*, 2018). No entanto, o primeiro não avalia PGE2 e LTB4 simultaneamente; e o segundo apresenta corrida cromatográfica muito longa (25 minutos).

2.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA NA FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é uma das mais primitivas famílias de plantas, se apresentando majoritariamente como árvores e arbustos em climas tropicais e subtropicais, sobretudo em florestas tropicais da Ásia e Américas. Poucas espécies também são encontradas na Austrália, Madagascar e África; sendo que a família compreende ao todo cerca de 2500 a 3500 espécies distribuídas em 55 gêneros (Reis-Avila; Oliveira, 2017; Zhang *et al.*, 2023). As espécies desta família têm se mostrado economicamente importantes nos mais diversos setores como perfumaria, indústrias farmacêuticas e de alimentos, além de serem exploradas pela indústria madeireira devido às suas madeiras de alta qualidade (de Alcântara *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023). Suas representantes mais conhecidas são o abacateiro (*Persea americana*), e espécies que fornecem especiarias como louro (*Laurus nobilis*) e canela (*Cinnamomum verum*) (Grecco *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2022). A família Lauraceae tem demonstrado valor etnobotânico, na qual suas espécies são usadas popularmente para o tratamento de malária, infecções gastrointestinais, infecções genitais, reumatismo, assim como condições inflamatórias (de Alcântara *et al.*, 2023).

Um estudo investigou vinte espécies da família Lauraceae quanto à sua atividade de inibição da via COX. Todas as espécies avaliadas demonstraram atividade anti-inflamatória, na qual dez delas inibiram a liberação de PGE2 em mais de 75%; sete inibiram entre 75% e 50%, e as três restantes apresentaram inibição inferior a 50%. Os gêneros Lauraceae investigados foram: *Ocotea*, *Nectandra*, *Persea*, *Cinnamomum*, *Aiouea*, *Aniba* e *Endlicheria* (de Alcântara *et al.*, 2023). Uma revisão do gênero *Nectandra* revelou 15 espécies com atividade anti-inflamatória (Grecco *et al.*, 2016). Outra revisão sistemática sobre a atividade biológica de óleos essenciais de espécies da família Lauraceae revelou que três espécies do gênero *Beilschmiedia* foram efetivas para inibição da via LOX: *B. kunstleri*, *B. maingayi*, and *B. penangiana*. Além disso, há uma série de trabalhos avaliando atividade anti-inflamatória em espécies Lauraceae de maneira independente, como a investigação da espécie *Cinnamomum osmophloeum* (Damasceno *et al.*, 2019); *Actinodaphne microphylla* e *Actinodaphne pruinosa* (Mohd *et al.*, 2016), e *Aniba canelilla* (Souza-Junior *et al.*, 2020). Neste sentido, além do uso popular, as evidências sobre o potencial anti-inflamatório de espécies da família Lauraceae na literatura justifica a investigação de espécies ainda não estudadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ensaio *ex vivo* acessível, em sangue humano, partindo de pouco volume de matriz, capaz de triar inibidores das vias COX e LOX, e investigar a atividade anti-inflamatória de extratos das espécies da família Lauraceae: *Ocotea odorifera* (OO); *Ocotea diopyrifolia* (OD); *Persea major* (PM); e *Nectandra membranacea* (NM).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Incluir o monitoramento de LTB4 no método previamente desenvolvido por Rosa e colaboradores (2021);
- b) Escolher melhores padrões internos que sejam adequados para análise de PGE2 e LTB4 por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS);
- c) Otimizar o monitoramento de reações múltiplas (MRM) para o PGE2, LTB4 e padrões internos;
- d) Otimizar o protocolo de extração para quantificação adequada de PGE2 e LTB4;
- e) Realizar análise estatística dos dados adquiridos;
- f) Determinar parâmetros de seletividade e limite de detecção para PGE2 e LTB4;
- g) Avaliar a estabilidade dos analitos;
- h) Avaliar a atividade anti-inflamatória de espécies da família Lauraceae.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARO DO EXTRATO DAS PLANTAS PARA O ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO

As folhas das espécies investigadas foram pulverizadas com auxílio de almofariz, pistilo e nitrogênio líquido. Pesou-se 2 mg de folha pulverizada, transferindo-as para um microtubo de 2 mL na qual adicionou-se 1,7 mL de etanol/H₂O, 7:3 (v/v), depois levou para banho de ultrassom por 8 minutos. Após este período, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2 mL e submetido à extração líquido-líquido com hexano (200 µL por 3 vezes). Posteriormente, filtrou-se o extrato utilizando filtro com membrana em PTFE hidrofílico (poro de 0,45 µm), e secou-se em centrífuga concentradora a vácuo. O extrato seco foi pesado, e solubilizado em etanol/H₂O 1:1 até a concentração 1 mg mL⁻¹. Esta solução, no momento do plaqueamento (especificado na seção 4.3.1) foi diluída em solução tampão (PBS 1x) até a concentração 100 µg mL⁻¹, e 35 µL foi transferido para a placa.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

O método de extração foi otimizado tomando como referência o trabalho de Rosa e colaboradores (2021). As amostras preparadas utilizando procedimento de extração modificado tiveram seu sinal analítico comparado com o sinal analítico de amostras preparadas conforme Rosa e colaboradores (2021). O critério de decisão para aceitação das modificações no método consistiu na maior intensidade do sinal analítico em relação ao método de referência (Rosa *et al.*, 2021).

4.3 ENSAIO ANTI-INFLAMATÓRIO OTIMIZADO

4.3.1 Indução da inflamação

A primeira etapa do ensaio anti-inflamatório foi realizada em capela de fluxo laminar, utilizando materiais esterilizados em autoclave e luz UV. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se primeiramente 35 µL de amostra (tampão fosfato salino 1x para controle negativo; dexametasona e indometacina a 10 µg mL⁻¹ para controle positivo

e solução aquosa do extrato a se analisar na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente adicionou-se 280 μL , por poço, de sangue recém coletado em heparina (utilização de sangue humano aprovada pelo comitê de ética – parecer número 5.582.522; anexo A). E por fim, foi adicionado 35 μL , por poço, de solução contendo ambos os indutores da inflamação: lipolissacarídeo – LPS (*E. coli* O26:B6) a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e Ionóforo de Cálcio a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A placa foi levemente agitada em movimentos circulares para homogeneização da mistura, envolvida com papel alumínio a fim de proteger o experimento de iluminação, e incubada em estufa de CO_2 por 24 horas.

Após o período de incubação, todo o ambiente de trabalho foi mantido sob baixa iluminação. As placas foram centrifugadas a 172 g por 5 minutos a 4 °C, e para cada poço, 180 μL de sobrenadante foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, os quais foram levados ao *freezer* até congelamento completo.

4.3.2 Precipitação de proteínas

Os plasmas congelados foram levados ao liofilizador por 4 horas até sublimação completa da água contida nas amostras. Posteriormente, as amostras secas foram armazenadas no congelador até o momento da precipitação de proteínas.

Às amostras secas adicionou-se 280 μL de ACN/MeOH 1:1 (mantido sob resfriamento em banho de gelo, e contendo o padrão interno de escolha - Limaprost - a 30 ng mL^{-1} ; demais padrões internos testados – Tabela 2) para precipitação de proteínas. Esta mistura foi mantida em banho com ultrassom por 60 segundos, agitada em vórtex por 30 segundos, e então centrifugada a 15332 g por 10 minutos a 4 °C. Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi transferida a um microtubo de 2 mL já contendo 1,8 mL de água ultrapura (0,1% HAc). Esta mistura foi armazenada em banho de gelo e protegida da luz até o momento da próxima etapa.

4.3.3 Extração em fase sólida

Inicialmente, aplicou-se 2 mL de MeOH em Cartuchos Supelclean (LC-18 SPE 100mg); posteriormente condicionou-se com 2 mL de H_2O ultrapura (0,1% HAc); aplicou-se toda a amostra preparada na etapa anterior (2 mL); realizou-se a lavagem

com 1 mL de H₂O ultrapura (0,1% HAc); e por fim, eluiu-se o analito com 1 mL de MeOH (0,1% HAc) coletando-o em um microtubo de 1,5 mL.

O eluato foi armazenado em freezer até o momento de ser submetido à secagem completa em centrífuga concentradora a vácuo (cerca de 3 horas e 15 minutos), sempre protegido da luz. As amostras secas foram armazenadas sob resfriamento em freezer (-20 °C) até o momento da análise.

4.3.4 Ressuspensão e análise

As amostras foram ressuspensas em 50 µL de ACN, e analisadas em UPLC-MS/MS dentro do período máximo de 3 horas totalmente protegidas da luz e à temperatura ambiente (24 °C). O volume de injeção foi de 30 µL.

4.3.5 Tratamento dos dados

Após aquisição dos dados, o sinal dos analitos foram normalizadas pelo sinal do padrão interno (Limaprost). Os sinais normalizados foram tratados utilizando o *software* GraphPad Prism®, na qual executou-se a análise estatística de variância, do inglês *Analysis of Variance* (ANOVA). Uma vez constatado que houve diferença estatística (p -valor < 0,05) entre os grupos, executou-se a análise de comparações múltiplas de Dunnett para identificação de quais grupos foram estatisticamente distintos do controle. Para os grupos discriminados, suas médias foram comparadas em relação à média do controle negativo por meio do teste de Mann-Whitney.

4.4 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E ESPECTROMÉTRICOS

Tabela 1 – Transições monitoradas, modo de ionização e tempo de retenção.

Substância	Transições monitoradas (m/z)	ESI (+/-)	(continua)
			Tempo de retenção (minutos)
PGE2	351,1 > 271,2; 315,25; 333,35	-	3,3
LTB4	335,1 > 195,1; 59,1	-	4,5
Limaprost *	379,2 > 299,3; 343,5	-	3,7

Tabela 1 – Transições monitoradas, modo de ionização e tempo de retenção.

Substância	Transições monitoradas (m/z)	(Conclusão)	
		ESI (+/-)	Tempo de retenção (minutos)
Latanaprost *	433,3 > 337,2	+	5,3
Cetoprofeno *	252,8 > 209,2	-	6,1
DHB *	153,0 > 108,1	-	3,0

Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: *Padrões internos testados.

O método cromatográfico foi composto pela fase móvel A (água 0,1% ácido fórmico) e fase móvel B (acetonitrila - ACN) a um fluxo de 0,3 mL min⁻¹. Utilizou-se gradiente variando-se a porcentagem de fase móvel B de 40 a 100% em 5 minutos (min), mantendo-se em 100% por mais 2 min. Após isso, a %B é retornada para 40% em 1 min, mantendo-se nessa proporção por mais 3 min, totalizando 11 min de corrida para cada amostra. Utiliza-se uma coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 mm x 4,6 mm) com partículas de 2,7 µm, acoplado a uma pré-coluna de mesma fase estacionária. Este sistema é mantido com controle de temperatura a 30 °C no decorrer de toda a análise.

O tipo de ionização utilizadas foi *electrospray* (ESI), N₂ como o gás de secagem (15 L min⁻¹ a 450 °C) e nebulização (2 L min⁻¹), e o monitoramento dos analitos foi realizado pelo monitoramento seletivo de reações (SRM – do inglês *Selected Reaction Monitoring*) e monitoramento de reações múltiplas (MRM – do inglês *Multiple Reaction Monitoring*), conforme a tabela 1 acima.

4.5 FIGURAS DE MÉRITO AVALIADAS

Para um ensaio limite, basta a determinação das figuras de mérito seletividade e limite de detecção (LD) (Brasil, 2017). No entanto, figuras de mérito adicionais foram avaliadas e apresentadas no material suplementar.

4.5.1 Seletividade

A seletividade foi obtida através da separação cromatográfica, e monitoramento espectrométrico dos fragmentos correspondentes ao analito mediante MRM, conforme especificado na seção 4.4 (Berendsen; Stolker; Nielen, 2013).

4.5.2 Limite de detecção (LD)

Seguindo a discussão e recomendação de Evard, Krueve & Leito (2016), o LD foi determinado a partir de duas informações experimentais: a inclinação da reta obtida pela curva analítica (m), e o desvio padrão dos resíduos da mesma curva ($S_{x,y}$), após determinação da linearidade e homocedasticidade da curva analítica (seção A 1.1) (Evard; Krueve; Leito, 2016). Após cumprimento dos critérios, o cálculo do LD foi executado da seguinte forma:

$$\text{Limite de detecção} = (3,3 \times S_{x,y}) / m \quad (1)$$

4.5.3 Estabilidade dos analitos

4.5.3.1 No amostrador automático

Com a finalidade de investigar a estabilidade dos analitos no amostrador automático, preparou-se amostras no nível de concentração do controle de qualidade alto (CQA; $77,8 \text{ ng mL}^{-1}$), e outras amostras no nível de concentração do controle de qualidade baixo (CQB; $31,1 \text{ ng mL}^{-1}$). O objetivo foi avaliar, nestes dois níveis de concentração, a estabilidade de PGE2 e LTB4 em três momentos: (1) no instante zero, imediatamente após a ressuspensão; (2) após 3 horas de armazenamento no amostrador automático; e (3) após 18 horas no amostrador automático. Para cada momento, as amostras foram avaliadas em quatro replicatas.

Para inferir sobre a possível degradação do analito ao longo deste período, a médias dos instantes '3 horas' e '18' horas' foram comparadas com a média do instante zero, através do teste de Mann-Whitney – uma análise estatística não paramétrica para comparação de médias. Avaliou-se também, para cada conjunto de replicatas analisadas, a dispersão dos dados através do cálculo de CV.

4.5.3.2 Em congelador

Para avaliar a estabilidade da amostra em congelador (-20 °C) pós etapa de ressuspensão, foram preparadas 12 amostras na mesma concentração (CQB; 31,1 ng mL⁻¹). As 4 primeiras foram analisadas imediatamente após sua ressuspensão em ACN; outras 4 foram analisadas após 24 horas; e as 4 restantes foram analisadas após o período de 48 horas.

Do mesmo modo que a análise de estabilidade no amostrador automático, as médias dos instantes '24 horas' e '48 horas' foram comparadas com a média do instante 0 horas, através do teste de Mann-Whitney. Além disso, a dispersão do sinal analítico entre replicatas foi expresso através do cálculo de CV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

O ensaio *ex vivo* para avaliação de atividade anti-inflamatória em extratos de plantas descrito por Rosa e colaboradores (2021) foi utilizado como ponto de partida. Seu procedimento experimental consiste na indução de inflamação em sangue humano, extração e determinação de PGE2. Já o presente trabalho propôs-se a promover otimizações de modo a permitir avaliação simultânea de LTB4 e PGE2, viabilizando inferir sobre a atividade inibitória das vias COX e LOX no mesmo experimento.

Devido à similaridade estrutural e físico-química de ambos os analitos, PGE2 e LTB4, esperava-se que o preparo de amostras estabelecido por Rosa e colaboradores (2021) fosse adequado para extração satisfatória de ambas as substâncias. No entanto, ao incluir o monitoramento de LTB4 no método de UPLC-MS/MS utilizado por Rosa e colaboradores (2021), sua detecção não foi observada. Não se sabia se esta impossibilidade era decorrente de problemas de recuperação, ionização do analito, ou concentrações reduzidas na matriz. Posteriormente descobriu-se que o LTB4 apresenta sensibilidade reduzida em relação ao PGE2, possivelmente devido à eficiência de ionização (discussão na seção A 1.1).

Neste sentido, otimizações visando melhorias na recuperação e detectabilidade do analito foram propostas, avaliadas, e descritas a seguir.

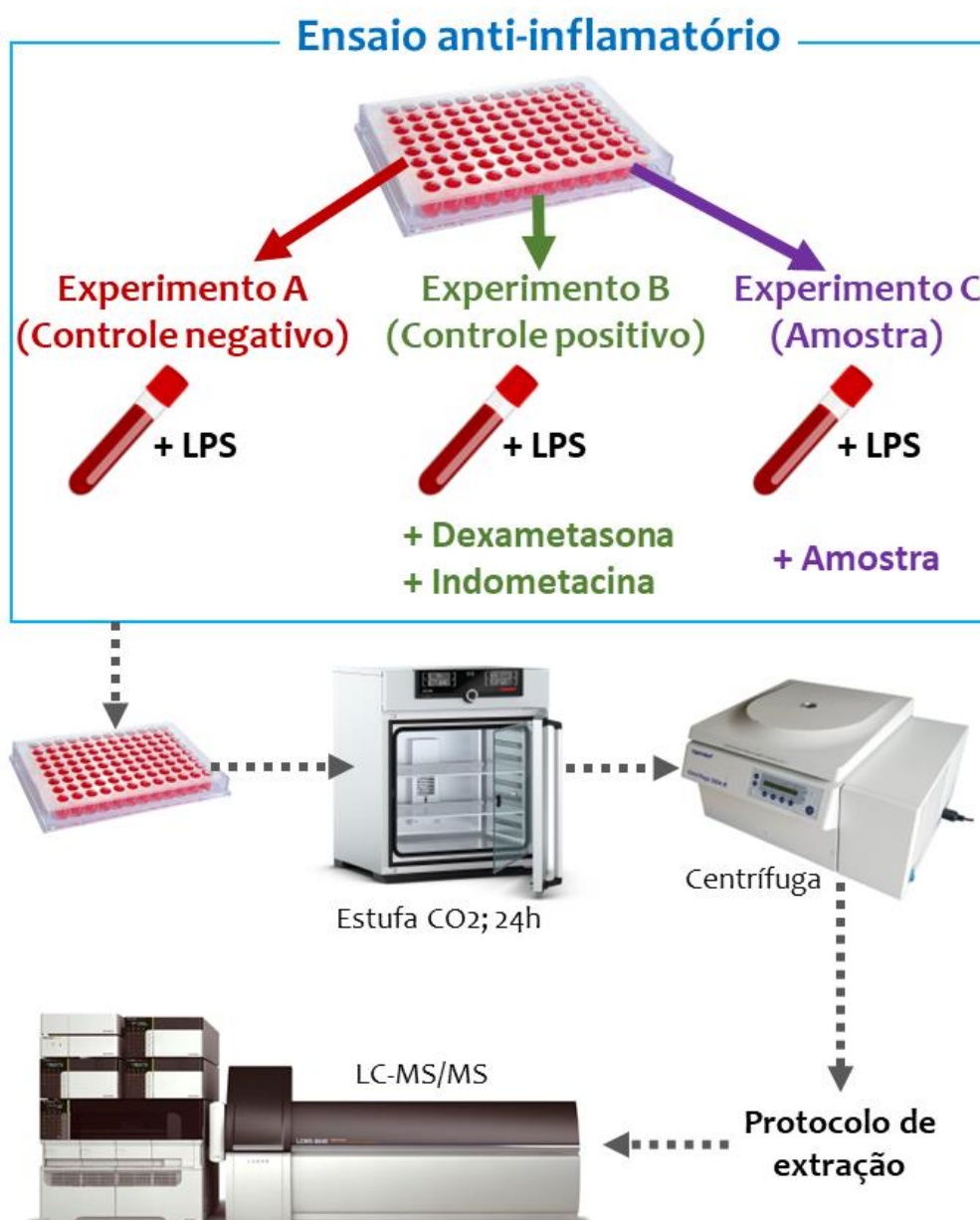
5.1.1 Desenho experimental do ensaio anti-inflamatório

Quando o processo inflamatório é ativado, os mediadores inflamatórios, tais como o PGE2 e o LTB4, passam a ser produzidos e sua concentração se eleva (Kawahara *et al.*, 2015; Yokomizo; Shimizu, 2023). Partindo dessa premissa, o ensaio anti-inflamatório consiste na indução de inflamação em sangue humano recém coletado, e subsequente quantificação da concentração de PGE2 e LTB4.

Conforme representado na Figura 2, três grupos de experimentos compõem o ensaio: (A) O grupo controle negativo representa o processo inflamatório sem tratamento. (B) Os grupos controle positivo representam um processo inflamatório sob tratamento com fármacos de referência. Neste segundo experimento o procedimento

é idêntico ao controle negativo, com a exceção de que juntamente ao sangue, adiciona-se uma solução dos fármacos anti-inflamatórios dexametasona e indometacina. (C) O experimento com as amostras a serem avaliadas segue o mesmo procedimento do controle positivo, entretanto ao invés de utilizar os fármacos de referência, adiciona-se uma solução da substância isolada, ou extrato, na qual deseja-se investigar a atividade anti-inflamatória.

Figura 2 – Representação esquemática do ensaio anti-inflamatório.



Fonte: De autoria própria (2024).

O procedimento de extração dos analitos descrito por Rosa e colaboradores (2021) ocorre em duas etapas principais: (1) precipitação de proteínas e (2) extração em fase sólida. Ambas técnicas de extração foram mantidas pois se mostraram fundamentais para eliminação de interferentes que poderiam comprometer a etapa de análise no instrumento, tanto no quesito vida útil da coluna/pré-coluna cromatográfica quanto na perda de sensibilidade ao longo das análises em função do acúmulo indesejado de interferentes na fonte de ionização e analisador. Os testes com outros tipos de preparo de amostra sem estas duas etapas demonstraram resultados piores.

5.1.2 Considerações sobre o padrão interno

O padrão interno tem o papel de compensar oscilações de sinal em análises quantitativas, sejam elas advindas de variações no preparo de amostras, ou do instrumento de análise. Idealmente em espectrometria de massas, deve-se utilizar um isótopo deuterado do analito, no entanto, estes apresentam custos demasiadamente elevados. Padrões internos não-isotópicos também têm sido utilizados, desde que possuam propriedades físico-químicas e estruturais semelhantes ao analito (Jiang *et al.*, 2020). A utilização de padrão interno não-isotópico visa tornar o método mais barato e, portanto, mais acessível para pesquisas e triagem de um maior número de amostras. Além de reduzir os custos de trabalho do próprio grupo de pesquisa.

O cloranfenicol (CAP) foi o padrão interno utilizado no trabalho de Rosa e colaboradores (2021). Como pode ser observado na Tabela 2, suas propriedades de pKa e logP são discrepantes dos analitos, assim como em estrutura química (Figura 3).

Buscou-se na literatura por substâncias que apresentassem pKa e logP próximos aos do LTB4 e PGE2, assim como similaridade estrutural. O Limaprost foi a substância escolhida para atuar como padrão interno, porém, não foi possível obtê-la em tempo hábil para realização dos primeiros experimentos. Por este motivo, optou-se por utilizar substâncias provisórias ao longo do trabalho como o Cetoprofeno e Latanaprost, que puderam ser obtidas mais rapidamente e eram mais apropriadas que o CAP, considerando similaridade estrutural e valores de pKa e logP.

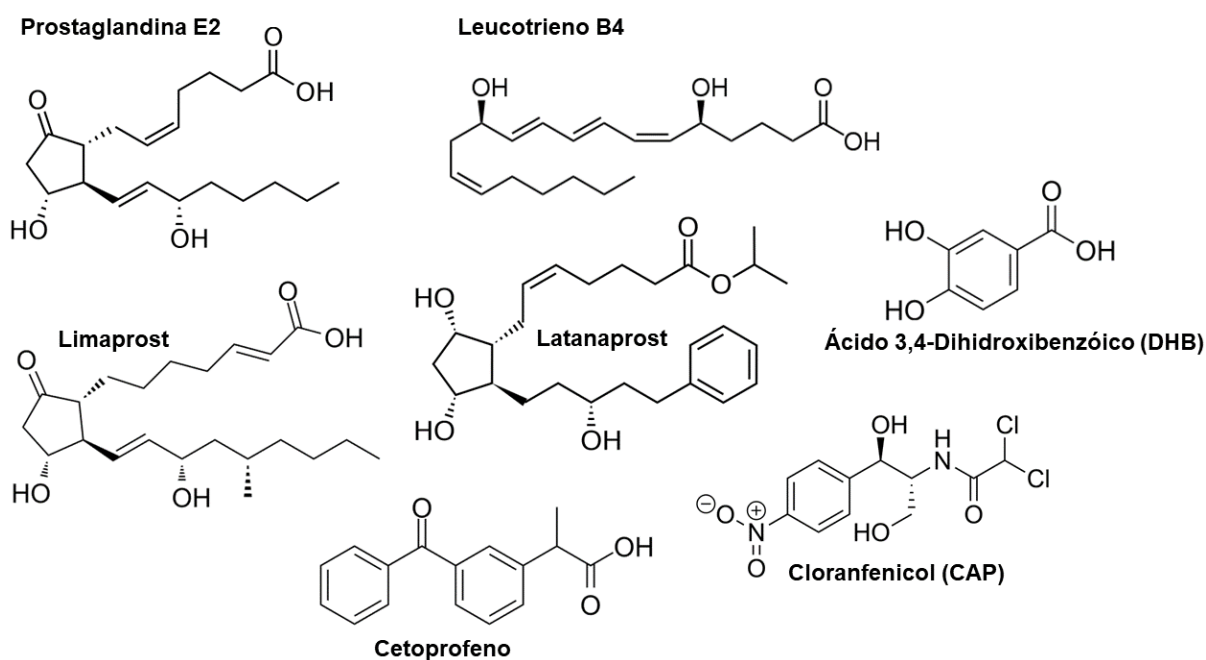
Tabela 2 – Candidatos a padrão interno e seus respectivos pKa e logP.

Substância	pKa	LogP
Prostaglandina E2 (PGE2)	4,3	3,3
Leucotrieno B4 (LTB4)	4,7	4,1
Limaprost	4,1	4,1
Cetoprofeno	3,1	3,1
Latanoprost	14,5	3,9
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico (DHB)	4,2	1,0
Cloranfenicol (CAP)	8,7	0,9

Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: as informações foram obtidas na base de dados Drugbank, na qual as propriedades teóricas foram calculadas pelo algoritmo da Chemaxon.

Figura 3 – Estruturas dos analitos e candidatos a padrão interno.



Fonte: De autoria própria (2024).

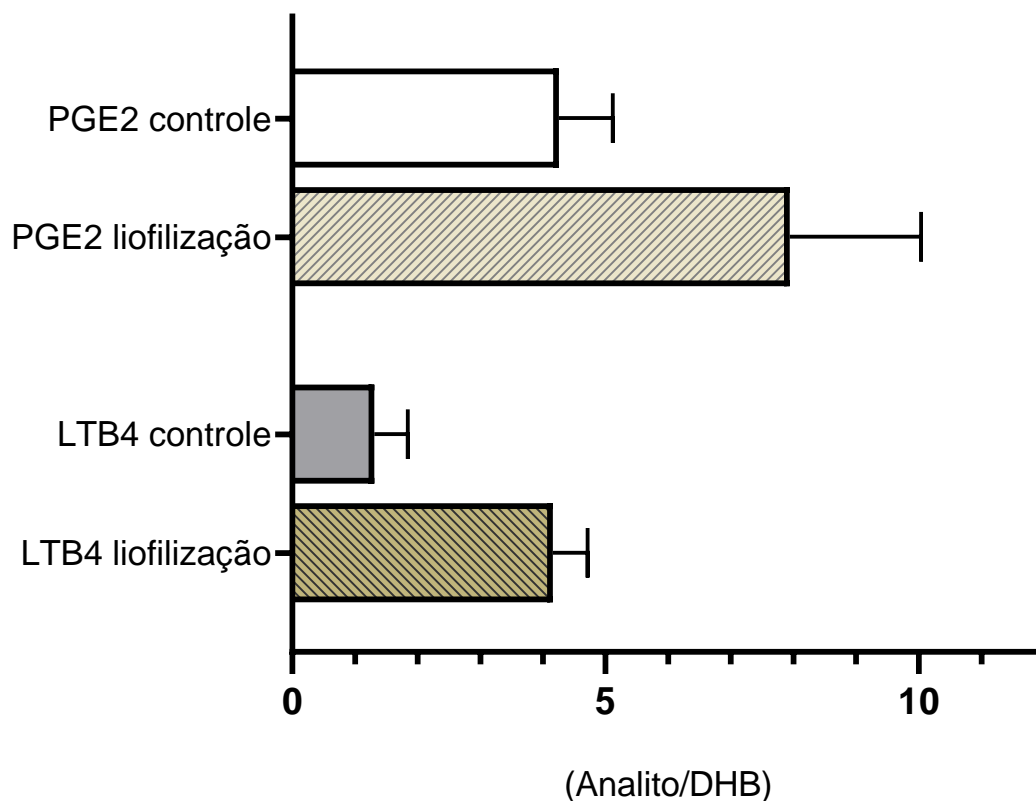
No trabalho de Rosa e colaboradores (2021), o padrão interno é adicionado na última etapa do preparo de amostras, fazendo com que apenas possíveis oscilações do instrumento de análise fossem corrigidas. A primeira modificação no método

consistiu em mover a adição do padrão interno para o início do processo de extração, juntamente ao solvente de precipitação conforme descrito na seção 4.3.2, permitindo com que possíveis erros oriundos do preparo de amostras pudessem ser corrigidos por normalização.

5.1.3 Liofilização do plasma

Com a finalidade de reduzir o volume de solvente no preparo de amostras, adotou-se a estratégia de liofilizar o plasma. Sem a presença de água na matriz (plasma), foi possível proceder com a precipitação de proteínas utilizando menor volume de solvente orgânico. Passou-se a utilizar 280 μL de ACN/MeOH 1:1, em contraste aos 500 μL utilizados no procedimento sem liofilização descrito por Rosa e colaboradores (2021).

Gráfico 1 – Comparação entre os sinais analíticos normalizados de PGE2 e LTB4 em relação ao preparo de amostras com liofilização e sem liofilização (controle).



Fonte: De autoria própria (2024).

O volume de sobrenadante coletado da precipitação de proteínas foi de 200 μL . Determinou-se este volume, pois foi o máximo possível de se pipetar sem que houvesse dificuldades de separar o sobrenadante do precipitado. Como consequência, a diluição do solvente orgânico em água (10% de ACN/MeOH em 90% de H_2O) foi conduzida pela adição de 1,8 mL de água ultrapura ao sobrenadante, totalizando 2 mL. O tempo de preparo de amostras foi significativamente reduzido em função do menor volume de amostra a ser submetido à SPE: eram 5 mL no trabalho descrito por Rosa e colaboradores (2021), e passou a ser 2 mL.

Os sinais dos analitos foram normalizados pelo sinal do padrão interno disponível no momento (DHB), e suas intensidades relativas foram comparadas (Gráfico 1). Como é possível perceber, a liofilização do plasma provocou elevação do sinal analítico. Mais especificamente o sinal aumentou em 86% para o PGE2, e 217% para o LTB4. Por esta razão, a etapa de liofilização passou a compor o protocolo de extração dos analitos.

5.1.4 Otimizando o volume de matriz e solventes

Tendo em vista que o objetivo do ensaio consiste em fazer triagem de amostras com atividade anti-inflamatória com mecanismo de ação dual de inibição das vias da COX e LOX, é importante que seja possível investigar uma grande quantidade de amostras distintas num mesmo ensaio. Este objetivo pode ser mais facilmente alcançado se o procedimento experimental for facilmente executável, demandar menor volume de sangue humano, pequeno volume de solventes para o preparo de amostras, e pequena quantidade da amostra a ser testada. Neste sentido, é de suma importância buscar trabalhar com o menor volume de matriz possível, dentro do que o instrumento de análise permite quantificar.

Estabeleceu-se que o volume máximo de sangue a ser utilizado no ensaio se limitaria ao volume de trabalho máximo da placa de 96 poços, na qual o ensaio anti-inflamatório é iniciado. Cada poço da placa comporta um volume máximo de 350 μL ; e a proporção volumétrica de sangue, indutor e amostra (ou controle) é de 80%, 10% e 10% respectivamente. Portanto, determinou-se que o volume máximo de sangue utilizado no ensaio passaria a ser de 280 μL . Consequentemente, o volume de indutor e amostra passou a ser 35 μL .

Após o período de incubação e centrifugação, determinou-se empiricamente que o volume ótimo de sobrenadante a ser coletado com pipeta monocanal da placa seria de 180 μL . Um volume maior que este torna difícil a separação entre plasma e o precipitado de hemácias.

Posteriormente, a alíquota de plasma é congelada, liofilizada, e então submetida à precipitação de proteínas. À vista disso, determinou-se empiricamente que 280 μL de é o volume ideal de solução precipitante (ACN/MeOH, 1:1, v/v), pois permite que 200 μL de sobrenadante seja coletado facilmente com pipeta, sem que haja muito volume remanescente. Esse sobrenadante é secado.

Visando elevar a quantidade de analito que chega ao detector do instrumento, reduziu se o volume de ressuspensão de 100 μL para 50 μL . Assim, a amostra se encontraria 100% mais concentrada no momento da injeção em comparação a método proposto por Rosa e colaboradores (2021). Ademais, o volume de injeção foi elevado de 20 μL para 30 μL .

5.1.5 Otimização do monitoramento de reações múltiplas (MRM)

O método descrito por Rosa e colaboradores (2021) monitora um único fragmento do PGE2 mediante *single reaction monitoring* – SRM. Para promover maior seletividade ao método, dois ou mais fragmentos passaram a ser monitorados pelo analisador. O experimento de MRM foi otimizado utilizando padrões autênticos dos analitos, e os fragmentos determinados pela otimização foram incluídos no método, conforme descrito na Tabela 1.

O trabalho de Murphy e colaboradores (2005) investigou padrões de fragmentação de metabólitos oriundos do ácido araquidônico, os quais foram submetidos à ESI e analisados por espectrometria de massas *tandem*. Dentre as substâncias avaliadas estavam incluídas o PGE2 e o LTB4. Seus resultados corroboram os íons fragmentos encontrados na otimização do experimento de MRM deste presente trabalho (Murphy *et al.*, 2005).

Ao investigar o PGE2, o experimento de *product ion scan* detectou os íons fragmentos com m/z 315,25; 271,2; e 333,35. Todos estes três fragmentos foram reportados por Murphy e colaboradores (2005), sendo eles os que apresentavam maior intensidade relativa, respectivamente. Então, o fragmento com m/z 315,25 foi escolhido como quantificador, e os demais como qualificadores.

Para o LTB4, o *product ion scan* detectou os fragmentos majoritários com m/z 59,1 e 195,2, em ordem decrescente de intensidade relativa, respectivamente. Estes dois fragmentos também foram majoritários no trabalho de Murphy e colaboradores (2005). O fragmento 59,1 m/z foi então tomado como quantificador, e o 195,2 m/z como qualificador.

O experimento de *product ion scan* para o Limaprost teve com resultado dois fragmentos: 343,45 m/z e 299,3 m/z . Um estudo de determinação de Limaprost utilizando LC-MS/MS reportou seu padrão de fragmentação, na qual ambos fragmentos estavam também presentes (Komaba *et al.*, 2007). Então, o íon 343,45 m/z foi utilizado como quantificador, enquanto o 299,3 m/z foi escolhido como qualificador.

5.1.6 Análise estatística

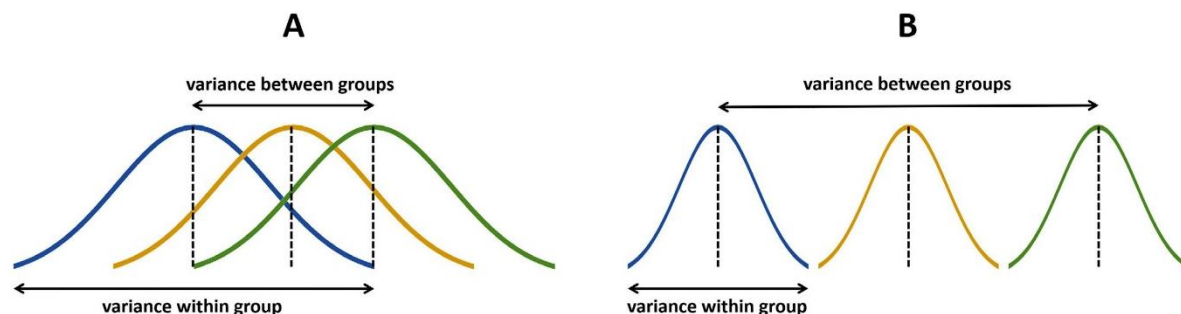
A diferenciação de entre amostras ativas e não-ativas se dá por meio da comparação entre replicatas do controle negativo (NEG; inflamação sem tratamento) e replicatas das amostras testadas. A tomada de decisão para afirmar se esta diferença é significativa ou não é baseada em análise estatística, especificamente análise de variância (ANOVA).

Em ANOVA, a variância dentro de cada grupo (sejam eles controles positivo, negativo e amostras) é comparada com a variância entre as médias dos distintos grupos; vide figura 3. A variância interna dos grupos, oriunda da dispersão entre replicatas de um mesmo tipo amostra, é a variância não explicada, e está associada aos erros aleatórios do experimento. Já a variância entre as médias dos grupos corresponde a variância explicada, onde a diferença de sinal se dá pelo tipo diferente de tratamento (controles, ou amostras) (Liguori; Moreira, 2018).

Afirma-se que há diferença entre os grupos se a variância explicada (correspondente ao tratamento) for significativamente maior que a variância não explicada (dispersão entre replicatas). Esta significância é calculada através do teste estatístico F (Sawyer, 2009).

No entanto, ANOVA apenas afirma que existe diferença significativa entre os grupos, mas não indica quais grupos são diferentes entre si. Para discriminar os grupos, análises de comparações múltiplas são utilizadas logo em seguida à ANOVA, como o teste de *Dunnett* (Lee; Lee, 2018; Liguori; Moreira, 2018).

Figura 4 – Representação gráfica da lógica da análise de variância (ANOVA). (A) Grupos não significativamente diferentes. (B) Grupos significativamente diferentes.



Fonte: Liguori; Moreira, 2018.

A ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnett são paramétricos – dependem da normalidade da distribuição dos dados (Sawyer, 2009). No entanto, não é possível aferir normalidade para 3, 4 ou 5 replicatas, como é o caso quando pretende-se investigar com um grande número de amostras num único ensaio. Mesmo assim, utiliza-se ANOVA e Dunnett pois eles apresentam maior poder estatístico. Ter maior poder significa que o teste estatístico é mais sensível para detectar uma diferença caso de fato haja uma diferença real (Lee; Lee, 2018). No entanto, o custo de maior poder estatístico é a maior probabilidade de se cometer erro do tipo I – afirmar que existe diferença significativa, quando na realidade não há (Durand, 2013).

Posteriormente, para aquelas amostras cuja diferença em relação ao controle negativo foi significativa, executa-se novamente uma comparação com o grupo controle, mas desta vez utilizando o teste de Mann-Whitney, uma análise não-paramétrica para comparação de médias. O objetivo desta segunda análise é compensar o risco assumido anteriormente de se cometer um erro do tipo I, através de uma análise mais conservadora (menor probabilidade de erro do tipo I, mas também menor poder estatístico).

5.2 DESCRIÇÃO E ANÁLISE DO MÉTODO

5.2.1 Natureza do método: ensaio limite

O presente método possui um caráter qualitativo, uma vez que é proposto determinar se o extrato de planta, ou qualquer substância isolada, apresenta atividade anti-inflamatória ou não. A determinação precisa e exata da concentração do analito não é estritamente necessária, bastando apenas afirmar se o sinal analítico da amostra investigada é diferente em relação ao sinal um controle, mediante análise estatística. Neste sentido, o método pode ser descrito como um ensaio limite, que corresponde àquele ensaio cuja proposta é verificar se a quantidade do analito está acima ou abaixo de um nível previamente estabelecido (Brasil, 2017). No presente caso, o nível de referência é o controle negativo, representando a inflamação não tratada. Já no âmbito das figuras de mérito para o ensaio limite, é necessário apenas a determinação da seletividade e LD (Brasil, 2017).

5.2.2 Seletividade

A obtenção de um sinal analítico livre da influência de interferentes presentes na matriz da amostra é a definição de seletividade (Valcárcel; Gómez-Hens; Rubio, 2001). Esta figura de mérito, utilizando UPLC-MS/MS de baixa resolução, normalmente pode ser obtida através do (1) preparo de amostras seletivo para a substância alvo a ser determinada; (2) determinação do tempo de retenção correspondente ao padrão do analito; assim como o (3) monitoramento do íon precursor e íons produtos correspondentes ao analito. Todas estas estratégias combinadas minimizam a probabilidade de se tomar o sinal de um interferente como analito (Berendsen; Stolker; Nielen, 2013).

O preparo de amostras desenvolvido é adequado para extrair pequenas moléculas orgânicas. O tempo de retenção e MRM foram determinados usando padrões autênticos dos analitos, conforme apresentado na seção de otimização (seção 4.4).

5.2.3 Limite de detecção – LD

Existem diferentes abordagens para estimar o LD de um método analítico. No entanto, a estimativa baseada no desvio padrão dos resíduos ($S_{x,y}$) de uma curva analítica é a abordagem recomendada tanto pelo trabalho de Evard, Krueve & Leito (2016) quanto pelo guia do *International Council for Harmonisation*, uma vez que a

sua estimativa é conservadora e simples de determinar (Evard; Krueve; Leito, 2016; ICH, 2019).

Uma curva de calibração foi construída para cada analito (PGE2 e LTB4), na qual constatou-se sua linearidade e homoscedasticidade (seção A1.1) – requisitos necessários para determinação do LD baseada no $S_{x,y}$ (Evard; Krueve; Leito, 2016). Os $S_{x,y}$ e LD correspondentes ao PGE2 e LTB4 foram calculados e explicitados na tabela abaixo.

Tabela 3 – Desvio padrão dos resíduos ($S_{x,y}$) das curvas analíticas correspondentes ao PGE2 e LTB4, e seus respectivos limites de detecção (LD).

Analito	$S_{x,y}$	LD
PGE2	0.02277	8 ng mL ⁻¹
LTB4	0.03225	8 ng mL ⁻¹

Fonte: De autoria própria (2024).

5.2.4 Estabilidade dos analitos

5.2.4.1 Estabilidade dos analitos no amostrador automático

Já era sabido que tanto o PGE2 deveria ser mantido sob baixas temperaturas e protegido da luz (Merk, 2023). Desta forma, todo o processo de extração e análise das amostras foram mantidos sob estas condições.

Ao fim do processo de extração, após a secagem em centrífuga concentradora a vácuo, as amostras eram mantidas em congelador até o momento da análise, onde eram ressuspendidas e armazenadas sob banho de gelo até o instante de sua injeção no instrumento de análise. Para tomar o devido cuidado, não era possível manter as amostras no amostrador automático do UPLC-MS/M, sendo necessário, portanto, acompanhar a injeção de cada amostra individualmente.

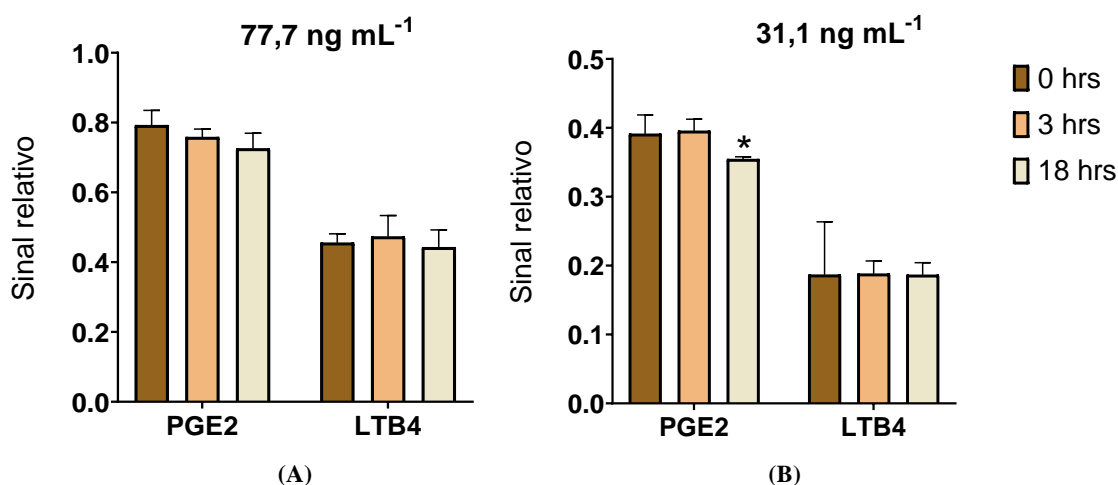
A análise estatística para comparação de médias dos instantes ‘3 horas’, e ‘18 horas’, comparadas uma a uma com a média dos instantes ‘0 horas’ forneceu evidência de que durante o período de 3 horas, em temperatura ambiente (24 °C), não há alteração significativa do sinal, demonstrando que os analitos são estáveis a 24 °C no amostrador automático dentro deste período, para ambos os analitos e níveis de concentração (Gráfico 2, e Tabela 4 – Estabilidade no amostrador automático avaliada

por meio de análise estatística de Mann-Whitney comparando as médias dos instantes monitorados, e avaliação da precisão mediante coeficiente de variação.).

Já no período de 18 horas, observou-se queda significativa do sinal apenas para o PGE2 no nível de concentração CQB, mas não para o LTB4. Desta forma, a fim de se manter a confiabilidade das análises, deve-se manter as amostras no amostrador automático por um período máximo de 3 horas.

Este resultado traz um avanço na praticidade ao ensaio, uma vez que foi demonstrado que não é necessário manter as amostras em banho de gelo, e acompanhar individualmente injeção de cada amostra.

Gráfico 2 – Estabilidade dos analitos no amostrador automático em três momentos.



Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: *Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao instante '0 horas'.

Tabela 4 – Estabilidade no amostrador automático avaliada por meio de análise estatística de Mann-Whitney comparando as médias dos instantes monitorados, e avaliação da precisão mediante coeficiente de variação.

		0 horas	3 horas	18 horas
PGE2	31,1 ng mL ⁻¹	(7,0 %)	0,886 (4,3 %)	0,029 (0,9 %) *
	77,8 ng mL ⁻¹	(5,4 %)	0,343 (2,4 %)	0,114 (6,0 %)
LTB4	31,1 ng mL ⁻¹	(41,1 %)	0,486 (9,9 %)	0,486 (9,4 %)
	77,8 ng mL ⁻¹	(5,6 %)	0,886 (5,8 %)	0,486 (11,2 %)

Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: *Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao instante '0 horas'.

Os resultados dos testes de Mann-Whitney, expressos em p -valor, estão apresentados fora dos parênteses. Já o resultado de precisão, expressos como coeficiente de variação (CV%), estão apresentados entre parênteses.

5.2.4.2 Estabilidade dos analitos no congelador

Para manutenção da estabilidade, após a etapa de secagem em centrífuga concentradora a vácuo, as amostras são mantidas secas no congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua injeção no UPLC-MS/MS. A ressuspensão em ACN é realizada somente instantes antes da análise.

Conforme descrito na seção anterior (seção 5.2.4.1), após a ressuspensão, a estabilidade é assegurada por um período máximo de 3 horas em temperatura ambiente e protegida de iluminação. No entanto, averiguou-se quanto tempo as amostras são estáveis a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em congelador após a etapa de ressuspensão em ACN. Para isso, preparou-se 12 amostras na mesma concentração ($31,1\text{ ng mL}^{-1}$), e a cada 24 horas foram avaliadas 4 replicatas a fim de verificar se há queda significativa na intensidade do sinal analítico (Tabela 5).

Como foi possível constatar, há uma redução significativa no sinal analítico de PGE2 após 24 horas do instante da ressuspensão. Portanto, sua estabilidade a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ não foi assegurada. Neste sentido, a ressuspensão da amostra foi realizada instantes antes da injeção no instrumento de análise, respeitando o período de 3 horas estabelecidos na seção 5.2.4.1. Já o LTB4 se mostrou estável no período avaliado.

Tabela 5 – Estabilidade no congelador: análise estatística de Mann-Whitney comparando as médias dos instantes, e avaliação da precisão mediante coeficiente de variação.

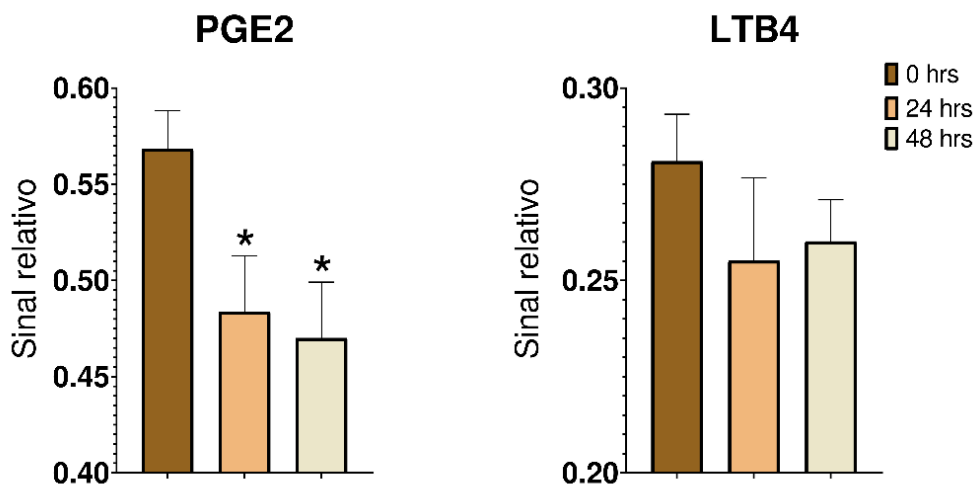
	0 horas	24 horas	48 horas
PGE2	(3,5 %)	0,016 (6,0 %) *	0,016 (6,2 %) *
LTB4	(4,3 %)	0,111 (8,4 %)	0,064 (4,1 %)

Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: *Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao instante '0 horas'.

Os resultados dos testes de Mann-Whitney, expressos em p -valor, estão apresentados fora dos parênteses. Já o resultado de precisão, expressos como coeficiente de variação – CV%, estão apresentados entre parênteses.

Gráfico 3 – Estabilidade dos analitos em congelador (-20 °C) após etapa de ressuspensão.



Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: *Diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao instante '0 horas'.

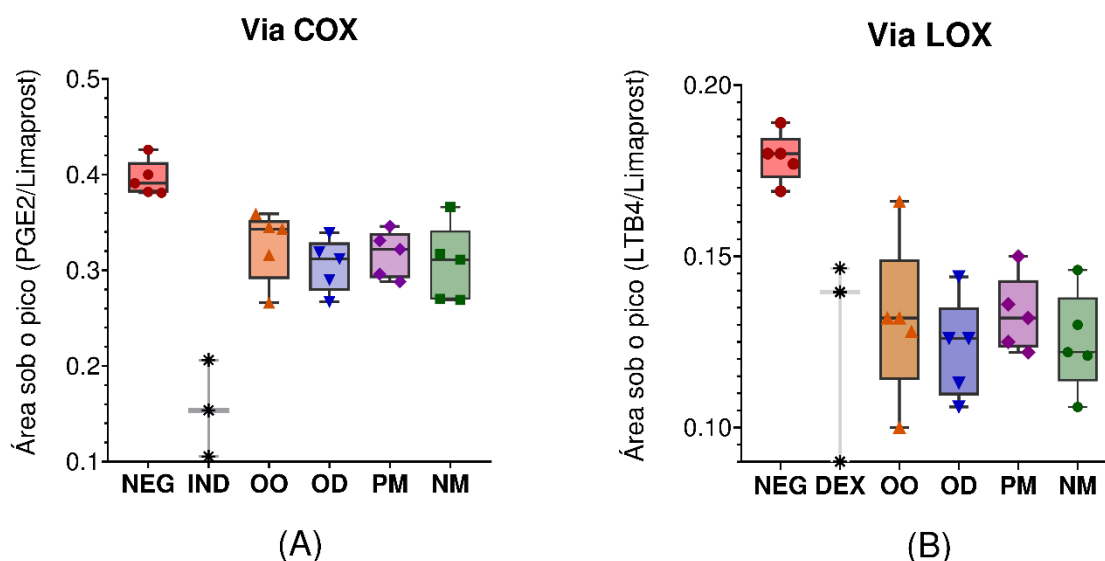
5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO

5.3.1 Representação gráfica do ensaio anti-inflamatório

O primeiro boxplot em vermelho representa o controle negativo, especificado como NEG, consistindo no processo de inflamação sem tratamento. A segunda categoria com triplicatas em asterisco representa o controle positivo (IND para COX; e DEX para LOX), representando a inflamação tratada com os respectivos fármacos de referência. Os demais boxplots são referentes as amostras de OO, OD, PM e NM.

Como pode-se notar no Gráfico 4 (B), o controle positivo apresenta resposta analítica semelhante aos extratos investigados. Neste caso em específico, devido à problemas com o padrão de dexametasona, a confiabilidade do controle positivo para via LOX foi comprometida. No entanto, esta adversidade não afetou a análise estatística pois o controle positivo não é incluído na ANOVA.

Gráfico 4 – Ensaio anti-inflamatório avaliando inibição das vias da COX (A) e LOX (B) por extratos das espécies da família Lauraceae.



Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: Extratos avaliados: *Ocotea odorifera* (OO), *Ocotea diospyrifolia* (OD), *Persea major* (PM) e *Nectandra membranacea* (NM). Grupos controle avaliados: negativo (NEG), indometacina (IND), dexametasona (DEX). Todos os extratos avaliados tiveram $P < 0,05$ quando comparados com o grupo controle negativo por meio de ANOVA seguido do teste de Dunnett e posteriormente teste de Mann-Whitney.

5.3.2 Concentração dos analitos

As médias do sinal analítico (área sob o pico) de cada grupo foram aplicadas nas equações da reta apresentadas em A 1.1, e suas concentrações correspondentes estão explicitadas na Tabela 6 abaixo. Como pode-se notar, todas as concentrações (exceto o controle negativo IND) são superiores à concentração de 8 ng mL^{-1} e, portanto, superiores ao LD descrito na seção 4.5.2.

Tabela 6 – Concentração média de PGE2 e LTB4 para os distintos tratamentos do ensaio anti-inflamatório.

Tipo de tratamento	(continua)	
	PGE2	LTB4
NEG	$19,4 \text{ ng mL}^{-1}$	$17,8 \text{ ng mL}^{-1}$
IND	$1,0 \text{ ng mL}^{-1}$	-
DEX	-	$*11,7 \text{ ng mL}^{-1}$

Tabela 6 – Concentração média de PGE2 e LTB4 para os distintos tratamentos do ensaio anti-inflamatório.

Tipo de tratamento	(Conclusão)	
	PGE2	LTB4
OO	14,0 ng mL ⁻¹	12,7 ng mL ⁻¹
OD	12,5 ng mL ⁻¹	11,8 ng mL ⁻¹
PM	13,3 ng mL ⁻¹	12,8 ng mL ⁻¹
NM	12,5 ng mL ⁻¹	12,0 ng mL ⁻¹

Fonte: De autoria própria (2024).

Legenda: *Controle positivo comprometido.

Extratos avaliados: *Ocotea odorifera* (OO), *Ocotea diospyrifolia* (OD), *Persea major* (PM) e *Nectandra membranacea* (NM). Grupos controle avaliados: negativo (NEG), indometacina (IND), dexametasona (DEX). PGE2: prostaglandina E2, LTB4: leucotrieno B4.

5.3.3 Análise estatística

Os sinais analíticos, normalizados pelo padrão interno limaprost, submetidos à ANOVA indicaram diferença significativa entre os grupos investigados (PGE2: $F = 11,67$ [$p < 0,0001$]; LTB4: $F = 6,97$ [$p = 0,0005$]). Utilizou-se o pós-teste de Dunnett para identificar quais grupos apresentaram níveis de marcadores (PGE2 e LTB4) significativamente diferentes em relação ao controle negativo (NEG). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Teste de Dunnett tendo controle negativo como referência.

Grupos comparados	COX-PGE2 (p -valor)	LOX-LTB4 (p -valor)
NEG vs. OO	0,0058	0,0003
NEG vs. OD	0,0005	<0,0001
NEG vs. PM	0,0020	0,0004
NEG vs. NM	0,0006	<0,0001

Fonte: De autoria própria (2024).

O teste de Dunnett indicou que as amostras OO, OD, PM e NM são estatisticamente diferentes comparados à inflamação não tratada (NEG), indicando atividade de inibição tanto para via COX quanto LOX. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para confirmar as observações via teste de Dunnett, e os dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparando amostras em relação ao controle negativo por teste de Mann-Whitney

Grupos comparados	COX-PGE2 (p -valor)	LOX-LTB4 (p -valor)
NEG vs. OO	0,0079	0,0079
NEG vs. OD	0,0079	0,0079
NEG vs. PM	0,0079	0,0079
NEG vs. NM	0,0079	0,0079

Fonte: De autoria própria (2024).

Ambos os testes de Mann-Whitney e ANOVA concluíram que sinal o analítico dos marcadores inflamatórios PGE2 e LTB4 para as amostras foram significativamente menores (p -valor < 0,05) que o controle negativo (NEG).

5.3.4 Atividade anti-inflamatória das espécies investigadas

No trabalho de Alcântara e colaboradores (2023), espécies Lauraceae foram investigadas quanto à sua atividade de inibição de produção de PGE2, e dentre àquelas ativas estavam incluídas as espécies avaliadas pelo presente trabalho – (OO; OD; PM; e NM) (de Alcântara *et al.*, 2023). Assim, os resultados obtidos utilizando método desenvolvido apresentam confirmação externa de um experimento independente, no tocante à via COX.

Quando à avaliação da via LOX, um estudo revelou que o extrato foliar de OD é capaz inibir os níveis de mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente principalmente em neutrófilos, e que indicam seu recrutamento para o tecido inflamado. Dado que o LTB4 é uma das principais substâncias envolvidas no recrutamento de neutrófilos, sugeriu-se que o extrato foliar de OD poderia apresentar atividade de inibição da via LOX (Silva *et al.*, 2021). O mesmo foi observado para OO, na qual Alcântara e colaboradores (2021) relatou inibição da produção de MPO (de Alcântara *et al.*, 2021; Katchborian-Neto *et al.*, 2023). Apesar das evidências, um estudo mais específico para inibição desta via seria necessário. Preenchendo esta lacuna, os resultados aqui obtidos corroboraram a sugestão de Silva e colaboradores (2021) e Alcântara e colaboradores (2021), e de modo recíproco, estas evidências da literatura validam os achados deste trabalho. Além disso, estes dois estudos reportam

evidências *in vivo* para atividade anti-inflamatória de seus extratos foliares nas vias da COX e LOX, o que corrobora os resultados *ex vivo* encontrados.

A última revisão do gênero *Nectandra*, publicada em 2016, não relatou atividade anti-inflamatória para espécie NM (Grecco *et al.*, 2016). Posteriormente, Alcântara e colaboradores (2021) relataram que extratos foliares inibem a via COX, mas nenhuma informação foi encontrada sobre inibição da via LOX. Portanto, o presente trabalho reporta pela primeira vez que o extrato de NM é capaz de inibir a produção de LTB₄.

A infusão de cascas da espécie *Persea major* é utilizada na medicina tradicional para tratar lesões cutâneas e danos gástricos. Em razão disso, tem sido estudada quanto à sua atividade gastroprotetora (Cosmo *et al.*, 2007; Somensi *et al.*, 2017). Efeitos antibacterianos e analgésicos também têm sido relatados (Volpato *et al.*, 2017), no entanto, estudos avaliando suas folhas são escassos, e apenas o trabalho de Alcântara e colaboradores (2021) investigou sua atividade anti-inflamatória apenas para a via COX. Nossos resultados fornecem evidências inéditas de que o extrato foliar de PM é capaz de inibir também a via LOX.

Em suma, o presente trabalho revela que as quatro espécies investigadas são capazes de inibir tanto a via COX quanto LOX. Porém, neste caso, não é possível inferir se a inibição ocorre nas duas vias de maneira independente, ou se a inibição se dá no início da cascata impedindo a formação de ácido araquidônico. Para obter tal informação, uma investigação utilizando um método mais seletivo seria necessária. Em todo caso, o método desenvolvido cumpriu seu papel de permitir a triagem de espécies de plantas com atividade anti-inflamatória, fornecendo evidências necessárias para prosseguir para avaliação *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Um ensaio anti-inflamatório capaz de triar inibidores das vias COX e LOX simultaneamente foi desenvolvido. O método permitiu detectar PGE2 e LTB4 satisfatoriamente, discriminando tratamentos distintos e viabilizando inferir sobre a inibição da produção destes mediadores inflamatórios. Apenas uma pequena massa do extrato ou substância isolada é necessário para investigação de sua atividade anti-inflamatória, permitindo que a avaliação seja possível mesmo com baixo rendimento de extração. Além disso, a utilização de pequeno volume de sangue viabiliza a avaliação de grande número de amostras num único ensaio.

O método desenvolvido se mostrou seletivo e com LD adequado para o ensaio limite proposto. Foi demonstrado que apesar da instabilidade térmica e luminosa dos analitos, é seguro manter as amostras no amostrador automático do UPLC-MS/MS por até 3 horas após sua ressuspensão. Foi demonstrado também que amostras devem ser mantidas secas e somente serem ressuspendidas no dia da análise.

Quatro espécies da família Lauraceae foram investigadas e todas elas apresentaram capacidade de inibir as vias COX e LOX. Este ensaio reproduziu resultados da literatura quanto à inibição da produção de PGE2, e forneceu resultados inéditos quanto à inibição da produção de LTB4. Além disso, evidências *in vivo* para atividade anti-inflamatória pelas vias da COX e LOX, de extratos foliares de duas das espécies deste estudo também corrobora os resultados *ex vivo* encontrados.

Este trabalho apresenta resultados bastante promissores, sendo possível vislumbrar benefícios para o próprio grupo de pesquisa e comunidade científica, dado que cumpriu seu papel de permitir a triagem de espécies de plantas com atividade anti-inflamatória, avaliando as principais vias envolvidas no processo inflamatório e fornecendo evidências preliminares para posterior avaliação *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, M. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs: recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. **RSC Medicinal Chemistry**, United Kingdom, v. 13, n. 5, p. 471-496, 2022.
- ATTIQ, A. *et al.* Raging the war against inflammation with natural products. **Frontiers in Pharmacology**, Pennsylvania, v. 9, p. 412989, 2018.
- BERENDSEN, B. J. A.; STOLKER, L. A. M.; NIELEN, M. W. F. The (Un)certainly of selectivity in liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, United States, v. 24, n. 1, p. 154–163, jan. 2013.
- BERGQVIST, F. *et al.* Anti-Inflammatory Properties of Chemical Probes in Human Whole Blood: Focus on Prostaglandin E2 Production. **Frontiers in Pharmacology**, Switzerland, v. 11, p. 613, 2020.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 27, de 17 de maio de 2012.** Dispõe sobre os “Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 23 abr. 2024.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017.** Dispõe sobre a “Validação de métodos analíticos e dá outras providências”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 23 abr. 2024.
- BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. **Planta Medica**, New York, v. 78, n. 8, p. 747–754, 2012.
- CARVALHO, N. S. *et al.* Neutrophil-Derived COX-2 has a Key Role during Inflammatory Hyperalgesia. **Inflammation**, United States, v. 45, n. 6, p. 2280–2293, 2022.
- COSMO, S. A. *et al.* Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from barks of *Persea major* Kopp (Lauraceae) in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 17, n. 4, p. 533–537, 2007.
- DAMASCENO, C. S. B. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils in the Family Lauraceae: A Systematic Review of the Literature. **Planta Medica**, New York, v. 85, n. 13, p. 1054–1072, 2019.
- DE ALCÂNTARA, B. G. V. *et al.* Confirmation of ethnopharmacological anti-inflammatory properties of *Ocotea odorifera* and determination of its main active compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, County Clare, v. 264, p. 113378, 2021.

DE ALCÂNTARA, B. G. V. *et al.* Anti-Inflammatory Activity of Lauraceae Plant Species and Prediction Models Based on Their Metabolomics Profiling Data. **Chemistry and Biodiversity**, Zurich, v. 20, n. 9, p. e202300650, 2023.

DESBOROUGH, M. J. R.; KEELING, D. M. The aspirin story – from willow to wonder drug. **British Journal of Haematology**, United Kingdom, v. 177, n. 5, p. 674–683, 2017.

DURAND, C. P. Does Raising Type 1 Error Rate Improve Power to Detect Interactions in Linear Regression Models? A Simulation Study. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 8, p. e71079, 2013.

EVARD, H.; KRUIVE, A.; LEITO, I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 942, p. 40-49, 2016.

FIORUCCI, S. *et al.* Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 62, n. 11, p. 1433-1438, 2001.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, Washington D.C., v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 2001.

GADDI, A.; CICERO, A. F. G.; PEDRO, E. J. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: The lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Netherlands, v. 38, n. 3, p. 201–212, 2004.

GALVÃO, A. F. *et al.* Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 408, n. 13, p. 3613–3623, 2016.

GERMOLEC, D. R. *et al.* Markers of inflammation. In: **Immunotoxicity testing: Methods and protocols**. Humana Press, New Jersey, 2018. p. 57-79.

GHILICHOLOO, I.; GERRIETS, V. **Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

GRECCO, S. S. *et al.* Update: biological and chemical aspects of Nectandra genus (Lauraceae). **Tetrahedron Asymmetry**, [s.l.], v. 27, n. 17–18, p. 793–810, 2016.

HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 11, p. 23–32, 2018.

HANSEN, F. K. *et al.* Efficient synthesis and 5-LOX/COX-inhibitory activity of some 3-hydroxybenzo[b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, United Kingdom, v. 22, n. 15, p. 5031–5034, 2012.

HODGENS, A.; SHARMAN, T. **Corticosteroids**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

ICH. Harmonised Guideline Endorsed on 26 February 2019. **Bioanalytical Method Validation M10**. European Medicines Agency: Amsterdam. Disponível em: <https://www.wrib.org/PDFs/ICH_M10_BMV_Draft_Guideline-190227.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2024.

JACOB, J. *et al.* Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Netherlands, v. 121, p. 356–381, 2018.

JARRAR, Y. B. *et al.* Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the expression of arachidonic acid-metabolizing Cyp450 genes in mouse hearts, kidneys and livers. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, Salt Lake City, v. 141, p. 14–21, 2019.

JIANG, F. *et al.* Signal Drift in Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Its Internal Standard Calibration Strategy for Quantitative Analysis. **Analytical Chemistry**, United States, v. 92, n. 11, p. 7690–7698, 2020.

KAPILA, R; KAPILA, S; VIJ, R. Efficacy of milk-derived bioactive peptides on health by cellular and animal models. In: **Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease**. Academic Press, United States, 2017. p. 303-311.

KATCHBORIAN-NETO, A. *et al.* Bioprospecting-based untargeted metabolomics identifies alkaloids as potential anti-inflammatory bioactive markers of *Ocotea* species (Lauraceae). **Phytomedicine**, Germany, v. 120, p. 155060, 2023.

KAUR, B.; SINGH, P. Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. **Bioorganic Chemistry**, United States, v. 121, p. 105663, 2022.

KAWAHARA, K. *et al.* Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Netherlands, v. 1851, n. 4, p. 414–421, 2015.

KOMABA, J. *et al.* Ultra sensitive determination of limaprost, a prostaglandin E1 analogue, in human plasma using on-line two-dimensional reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Netherlands, v. 852, n. 1–2, p. 590–597, 2007.

KROESEN, V. M. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs as host-directed therapy for tuberculosis: A systematic review. **Frontiers in Immunology**, Switzerland, v. 8, p. 772, 2017.

LEE, S.; LEE, D. K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? **Korean Journal of Anesthesiology**, South Korea, v. 71, n. 5, p. 353–360, 2018.

LIGUORI, G. R.; MOREIRA, L. F. P. Operating with data - Statistics for the cardiovascular surgeon: Part III. comparing groups. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, Brazil, v. 33, n. 6, p. 5–10, 2018.

MA, Y. *et al.* Anti-Inflammation Effects and Potential Mechanism of Saikosaponins by Regulating Nicotinate and Nicotinamide Metabolism and Arachidonic Acid Metabolism. **Inflammation**, New York, v. 39, n. 4, p. 1453–1461, 1 ago. 2016.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, United Kingdom, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MERK. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico: Prostaglandina E2**. Versão 6.4. Darmstadt, Alemanha: Merck KGaA, 2024. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/sds/sigma/p5640?userType=anonymous>>. Acesso em: 23 abr. 2024.

MESHAM, M. A. *et al.* Synthetically-tailored and nature-derived dual COX-2/5-LOX inhibitors: Structural aspects and SAR. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 225, p. 113804, 2021.

MOHD, W. *et al.* Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Essential Oils of *Actinodaphne macrophylla* and *A. pruinosa* (Lauraceae). **Natural Product Communications**, United States, v. 11, n. 6, p. 853–855, 2016.

MUKHOPADHYAY, N. *et al.* Natural product-driven dual COX-LOX inhibitors: Overview of recent studies on the development of novel anti-inflammatory agents. **Heliyon**, Netherlands, v. 9, n. 3, p. e14569, 2023.

MURPHY, R. C. *et al.* Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 346, n. 1, p. 1–42, 2005.

OH, M. *et al.* A comparative phytochemical study of nine Lauraceae species by using chemometric data analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 17, n. 9, p. e0273616, 2022.

REIS-AVILA, G.; OLIVEIRA, J. M. Lauraceae: A promising family for the advance of neotropical dendrochronology. **Dendrochronologia**, Germany, v. 44, p. 103-116, 2017.

ROSA, W. *et al.* In vivo anti-inflammatory activity of Fabaceae species extracts screened by a new ex vivo assay using human whole blood. **Phytochemical Analysis**, United Kingdom, v. 32, n. 5, p. 859–883, 2021.

SARVESWARAN, R.; JAYASURIYA, W. J. A. B. N.; SURESH, T. S. In vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Bulgaria, v. 6, n. 17, p. 131–141, 2017.

SAWYER, S. F. Analysis of Variance: The Fundamental Concepts. **Journal of Manual & Manipulative Therapy**, Leeds, v. 17, n. 2, p. 27E-38E, abr. 2009.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, United Kingdom, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

- SILVA, A. F. *et al.* Chemistry of leaves, bark, and essential oils from *Ocotea diospyrifolia* and anti-inflammatory activity – Dual inhibition of edema and neutrophil recruitment. **Phytochemistry Letters**, Netherlands, v. 42, p. 52-60, 2021.
- SOMENSI, L. B. *et al.* Hydroalcoholic extract from bark of *Persea major* (Meisn.) L.E. Kopp (Lauraceae) exerts antiulcer effects in rodents by the strengthening of the gastric protective factors. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 209, p. 294–304, 2017.
- SORGI, C. A. *et al.* Data descriptor: Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific Data**, United Kingdom, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2018.
- SOUZA-JUNIOR, F. J. C. *et al.* *Aniba canelilla* (Kunth) Mez (Lauraceae): A Review of Ethnobotany, Phytochemical, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Cardiovascular, and Neurological Properties. **Frontiers in Pharmacology**, Switzerland, v. 11, p. 516720, 2020.
- TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. **Journal of Advanced Research**, Netherlands, v. 11, p. 33-41, 2018.
- VALCÁRCEL, M.; GÓMEZ-HENS, A.; RUBIO, S. feature Selectivity in analytical chemistry revisited. **Trends in Analytical Chemistry**, Netherlands, v. 20, n. 8, p. 386–393, 2001.
- VOLPATO, L. *et al.* Effectiveness of *Persea major* Kopp (Lauraceae) extract against *Enterococcus faecalis*: A preliminary in vitro study. **BMC Research Notes**, United Kingdom, v. 10, n. 1, p. 1-6. 2017.
- WAN, M. *et al.* Biosynthesis of leukotriene B₄. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, United States, 2017. p. 3-15.
- WANG, B. *et al.* Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, United Kingdom, v. 6, n. 1, p. 94, 2021.
- WANG, T. *et al.* Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 20, n. 15, p. 3683, 2019.
- YOKOMIZO, T.; SHIMIZU, T. The leukotriene B₄ receptors BLT1 and BLT2 as potential therapeutic targets. **Immunological Reviews**, United Kingdom, v. 317, n. 1, p. 30–41, 2023.
- ZHANG, Y. *et al.* Phylogeny and Systematics of *Sassafras* (Lauraceae), an Interesting Genus with Disjunct Distributions in Eastern North America and East Asia. **Plants**, Switzerland, v. 12, n. 6, p. 1419, 2023.

APÊNDICE

A1 AVALIAÇÃO DE FIGURAS DE MÉRITO

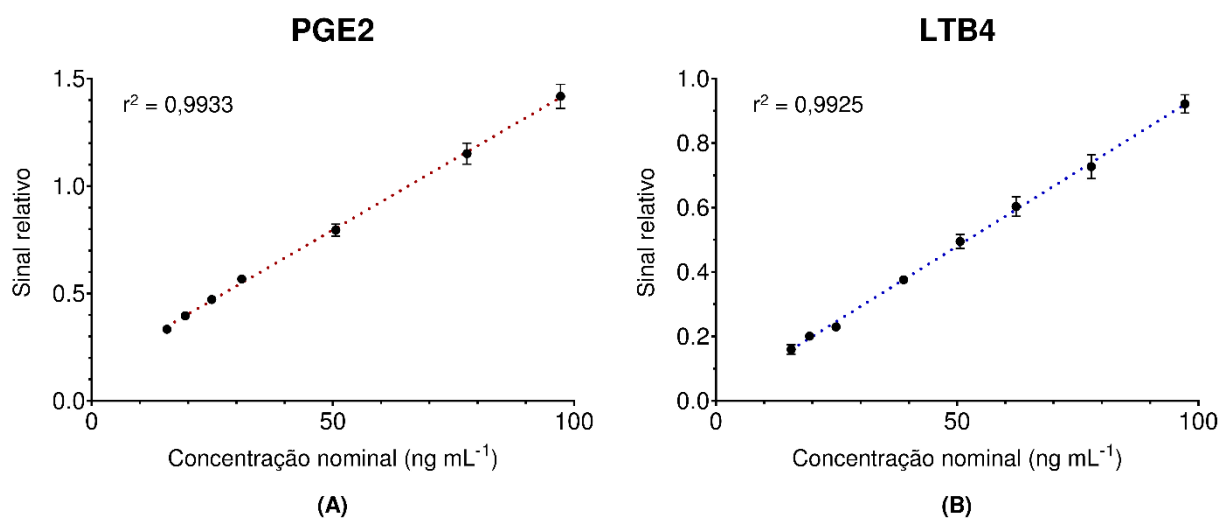
A 1.1 Curva analítica e homocedasticidade

A curva de calibração foi obtida através do enriquecimento de plasma humano com padrões dos analitos (PGE2, LTB4 e Limaprost) nas concentrações descritas na tabela S1. Cada nível de concentração foi analisado em cinco replicatas, ambas as curvas se ajustaram ao modelo de regressão linear, e suas respectivas equações da reta são apresentadas a seguir:

$$\text{Para o PGE2: } Y = 0,01307 X + 0,1424 \quad r^2 = 0,9933$$

$$\text{Para o LTB4: } Y = 0,009332 X + 0,01324 \quad r^2 = 0,9925$$

Gráfico A1 – Curva analítica para PGE2 e LTB4 tendo o Limaprost como padrão interno.



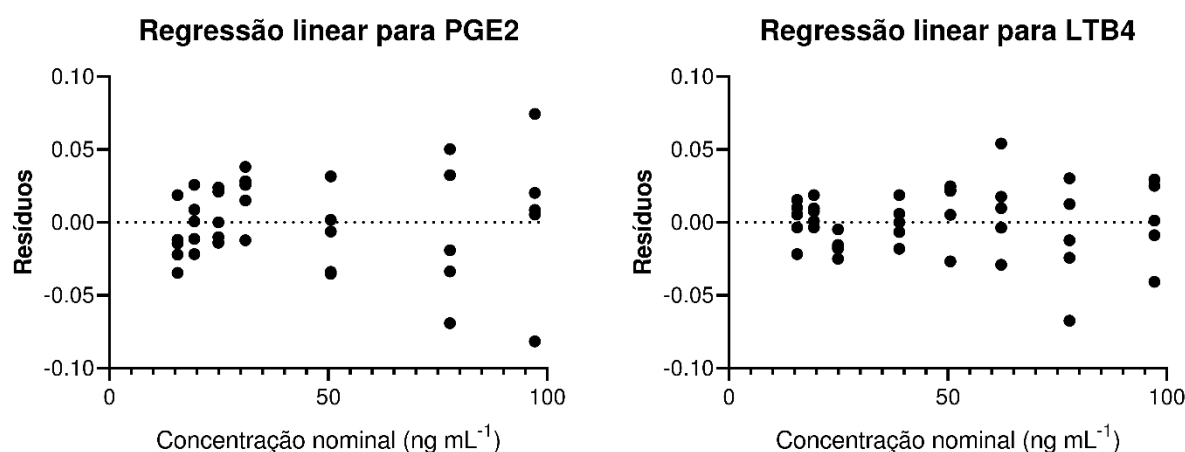
Fonte: De autoria própria (2024).

Considerando que o coeficiente angular da equação da reta obtida corresponde à sensibilidade do método, pode-se observar que o método para o PGE2 é 40% mais sensível em relação ao método para o LTB4. Este resultado reflete o fato de que o sinal do PGE2 é mais intenso que o LTB4 para uma mesma concentração, e tal

observação pode estar associada à maior facilidade de o PGE2 se ionizar na fonte ESI em relação ao LTB4.

Para avaliação da homocedasticidade fez-se o uso do teste de Levene modificado. Para executá-lo, substituiu-se os valores de cada replicata pelas suas diferenças absolutas em relação à mediana para cada nível de calibração. Este novo conjunto de dados foi submetido à ANOVA. De acordo com o teste de Levene, se o teste F correspondente não for significativo, pode-se concluir que as variâncias são homogêneas ao longo da curva de calibração (GLANTZ, 2016).

Gráfico A2 – Gráfico de resíduos correspondente às regressões lineares de PGE2 e LTB4.



Fonte: De autoria própria (2024).

Para o LTB4, o teste F resultou em $F = 0,1838$ ($p = 0,9868$). Já para o PGE2, $F = 0,1530$ ($p = 0,9869$). Desta forma, não há evidências para afirmar que há diferença entre as variâncias dos níveis de calibração ao longo da curva e, portanto, há homocedasticidade.

A 1.2. Precisão e exatidão

A precisão foi determinada através do cálculo do desvio padrão relativo (coeficiente de variação) entre as respostas individuais das replicatas. Já a exatidão em cada nível de calibração foi determinada pelo desvio (calculado através da

diferença entre a concentração média das replicatas e a concentração nominal) normalizado pela concentração nominal, ao qual é denominada erro relativo (ER). Segue a tabela S1 com o resultado destes cálculos para cada analito.

Tabela A1 – Avaliação da precisão e exatidão para as curvas de PGE2 e LTB4.

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	PGE2		LTB4	
	Precisão CV (%)	Exatidão ER (%)	Precisão CV (%)	Exatidão ER (%)
15,5	5.9%	-6.3%	9,1%	0.8%
19,4	4.6%	0.2%	4,3%	3.7%
24,9	3.7%	1.3%	3,2%	-6.9%
31,1	3.4%	4.7%	-	-
38,9	-	-	3,7%	0.0%
50,6	3,5%	-1,3%	4,4%	2.0%
62,2	-	-	5,0%	1.7%
77,8	4.2%	-0.8%	5,2%	-1.7%
97,2	4.0%	0.4%	3,1%	0.1%

Fonte: De autoria própria (2024).

A 1.3. Limite inferior de quantificação

Partindo da definição de limite de quantificação como ‘a menor concentração na qual consegue-se determinar o analito com precisão e exatidão adequada’, e por precisão e exatidão adequada entende-se como CV e ER < 15%, então o limite inferior de quantificação seria 15,5 ng mL⁻¹, para ambos analitos.

A 1.4. Recuperação

Para avaliar a recuperação do processo de extração, preparou-se dois tipos de amostras: (1) aquelas na qual enriqueceu-se a matriz (plasma) com padrões dos analitos antes do preparo de amostras; (2) e aquelas na qual a matriz foi enriquecida após o preparo de amostras.

Assumindo que o segundo tipo representa 100% de recuperação, a razão expressa o quanto de analito foi recuperado no processo de extração. Tal análise foi feita para três níveis de concentração distintos, e está exposto na Tabela S2.

Tabela A2. Recuperação de PGE2 e LTB4 em três níveis de concentração.

Concentração nominal	PGE2	LTB4
31,1 ng mL ⁻¹	57,5 %	51,2 %
49,8 ng mL ⁻¹	51,5 %	61,0 %
77,8 ng mL ⁻¹	61,5 %	56,3 %

Fonte: De autoria própria (2024).

A 1.5. Efeito de matriz

Já o efeito de matriz foi avaliado comparando os sinais dos analitos em solução em relação aos sinais de amostras na qual os padrões dos analitos foram adicionados após o preparo de amostras. A razão entre os sinais destes dois tipos de amostras – o FMN (Fator Normalizado de Matriz), reflete a interferência da matriz na intensidade do sinal dos analitos.

Outro parâmetro a ser calculado foi a reprodutibilidade dos FMNs, que consiste no cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre suas replicatas. A ANVISA preconiza que CV% < 15% (BRASIL, 2012).

Foram calculados três FMNs em triplicata para cada analito na concentração 77,8 ng mL⁻¹. Os resultados revelam que a matriz provoca supressão iônica para ambos analitos, no entanto a repetibilidade entre os FMNs foi demonstrada.

Tabela A3. Fatores de matriz e sua repetibilidade.

	FMN (%)	CV (%) dos FMNs
PGE2	40%	2,0%
LTB4	68%	5,8%

Fonte: De autoria própria (2024).

O acrônimo FMN corresponde ao Fator Normalizado de Matriz – uma razão entre os sinais analíticos das substâncias em solução comparadas com os sinais das mesmas substâncias sob o efeito da matriz. Esta razão representa a magnitude do efeito de matriz; e o cálculo do coeficiente de variação (CV %) corresponde à repetibilidade do FMN, que deve ser CV (%) < 15%.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: METABOLÔMICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA EX VIVO DE PRODUTOS NATURAIS, SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E SINTÉTICAS.

Pesquisador: Daniela Aparecida Chagas de Paula

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60344622.1.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.582.522

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de extratos de diferentes espécies de famílias com reconhecido potencial para atividade anti-inflamatória, por meio de estratégias metabolômicas, fitoquímicas, de síntese e o uso de ensaios ex vivo em sangue humano para triagem da atividade anti-inflamatória para descoberta de extratos e substâncias com propriedades anti-inflamatórias com mecanismo de ação inovador.

Serão realizadas coletas de amostra de sangue de voluntários que serão utilizadas para os testes ex vivo.

O Pesquisador não indica o tipo de projeto de (IC, mestrado ou doutorado).

Não apresenta indícios de conflito de interesse.

Financiamento Próprio.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar os extratos de diferentes espécies de famílias com reconhecido potencial para atividade anti-inflamatória, por meio de estratégias metabolômicas, fitoquímicas, de síntese e o uso de ensaios ex vivo em sangue humano para triagem da atividade anti-inflamatória para descoberta

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Sala O 314 E

Bairro: centro

CEP: 37.130-001

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3701-9153

Fax: (35)3701-9153

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br