



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA  
DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**Jaqueline Scapinello**

**EXTRATOS DE *Philodendron bipinnatifidum*:  
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO* E *IN*  
*VITRO* E ENCAPSULAÇÃO PELA TÉCNICA SEDS**

Florianópolis - SC  
2018



**Jaqueline Scapinello**

**EXTRATOS DE *Philodendron bipinnatifidum*:  
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO* E *IN VITRO* E ENCAPSULAÇÃO PELA TÉCNICA SEDS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Química.

Orientador:

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira  
Orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira  
Prof. Dr. Jacir Dal Magro

Florianópolis - SC  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scapinello, Jaqueline

Extratos de *Philodendron bipinnatifidum*: Avaliação de Atividades Biológicas *In Vivo* e *In Vitro* e Encapsulação pela Técnica SEDS / Jaqueline Scapinello ; Orientador, José Vladimir de Oliveira ; coorientador, Débora de Oliveira, coorientador Jacir Dal Magro.

146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. *P. bipinnatifidum*. 3. Antioxidante. 4. Antimicrobiano. 5. Anti-inflamatória. I. De Oliveira, José Vladimir. II. Oliveira, Débora. III. Dal Magro, Jacir. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. V. Título.

Jaqueline Scapinello

**Extratos de *Philodendron bipinnatifidum*:  
avaliação de atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* e encapsulação  
pela técnica SEDS**

Esta tese foi considerada adequada para o grau de Doutor em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 11 de outubro de 2018.

---

Prof. Cíntia Soares, Dra.  
Coordenadora

Banca Examinadora:

---

Prof. José Vladimir de Oliveira, Dr.

---

Prof. Débora de Oliveira, Dr<sup>a</sup>.

---

Prof. Acácio Antonio Ferreira Zielinski, Dr.

---

Prof. Marcelo Lanza, Dr.

---

Prof. Rivaldo Niero, Dr.  
Universidade Do Vale do Itajaí - Univali



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir cumprir mais esta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. **José Vladimir de Oliveira**, pelos ensinamentos e pelo exemplo de trabalho e responsabilidade. Agradeço por ter aberto as portas para essa caminhada e pela confiança na minha capacidade.

Aos professores orientadores Dr. **Jacir Dal Magro** e Dra. **Débora de Oliveira**, pelas palavras de incentivo, por compartilharem seus conhecimentos e pela disposição em ajudar a orientar e realizar o trabalho.

À minha aluna e amiga **Aline Bohn** pela disponibilidade e entusiasmo durante a realização dos ensaios laboratoriais, sempre realizados com muita dedicação e compromisso.

Às minhas colegas Msc. **Laura Cassol Mohr** e Msc. **Ana Paula Capelezzo** pela amizade, disponibilidade e auxílio na realização dos ensaios laboratoriais, sempre realizados com muita alegria e dedicação.

Aos meus colegas de laboratório, Dr. **Gean Pablo Aguiar**, Msc. **Camila Dal Magro** e **Monica Zanatta Schindler** pela participação e disponibilidade na realização dos ensaios laboratoriais.

À Profa. Dra. **Liz Girardi Müller** pela boa vontade em me auxiliar e disposição durante os ensaios biológicos.

Às técnicas do Centro de Bioterismo da Unochapecó **Kelly Tonhon** e **Natascha Trevisani** pelo auxílio durante os ensaios *in vivo*.

Ao **Sidinei** (Sid) pela ajuda e disponibilidade de materiais para as coletas.

Ao **André Schoeninger**, pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada por compreender os momentos de ausência, pelo seu sorriso e seu abraço nos momentos em que mais precisei.

Ao meu filho, **Fernando Scapinello Schoeninger**, pelo amor e carinho.

E, em especial, agradeço aos meus pais **Jeronimo Scapinello** e **Ursula Zart Scapinello**, que sempre me apoiaram, compreenderam e incentivaram, sendo os principais responsáveis por esse passo em minha vida e carreira profissional. Amo incondicionalmente.





## RESUMO

Muitas das espécies utilizadas na medicina popular ainda não possuem suas atividades biológicas comprovadas por estudos científicos. Entre estas espécies, a *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae), que é nativa da América do Sul, merece atenção especial, pois é usada na medicina popular para tratamento de casos de infecções, como erisipela, e inflamações, como orquites e úlceras e também para o tratamento de reumatismo. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi a obtenção de extratos de *P. bipinnatifidum* e avaliação de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, bem como realizar o encapsulamento do extrato de acetato de etila através da técnica SEDS. As atividades antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos dos talos de *P. bipinnatifidum*, obtidos através de maceração com solventes orgânicos, foram avaliadas. Alta atividade antimicrobiana foi observada para o microrganismo *Streptococcus pyogenes* com o extrato obtido a partir do solvente acetato de etila, com MIC 3,20 mg·mL<sup>-1</sup> e baixa atividade para o extrato etanólico (10,0 mg·mL<sup>-1</sup>). Baixa atividade antimicrobiana foi observada para os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* para o extrato de acetato de etila, com MIC de 10,0 mg·mL<sup>-1</sup>, e não houve atividade para o extrato etanólico. Ambos os extratos resultaram em elevada atividade antioxidante, mas o extrato de acetato de etila apresentou resultados significativamente maiores, com IC<sub>50</sub> de 27,11 µg·mL<sup>-1</sup>, quando registrado 59,43 µg·mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico. A atividade biológica mais significativa da fração extraída com acetato de etila está relacionada à composição química deste, em comparação com a fração de etanol, que apresentou a maior concentração de compostos bioativos, como flavonoides quercetina, luteolina, apigenina e rutina. O extrato acetato de etila também apresentou maior concentração dos compostos da classe dos fitoesteróis, como o β-sitosterol, estigmasterol e campesterol. A partir disso, o extrato de acetato de etila foi avaliado quanto a suas ações antinociceptiva e anti-inflamatória em testes *in vivo*, utilizando camundongos Swiss machos. A atividade antinociceptiva foi avaliada através do teste de indução de contorções abdominais por ácido acético, nas doses de 250, 375 e 500 mg·kg<sup>-1</sup> e do teste da formalina, na dose de 500 mg·kg<sup>-1</sup>. O teste de campo aberto foi realizado para avaliar possíveis alterações na locomoção espontânea dos animais. Também foi avaliada a possível participação do sistema opioide no efeito antinocicpetivo do extrato no teste da formalina, utilizando naloxona. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi

realizada pelo teste do edema de pata induzido por carragenina na dose de 500 mg·kg<sup>-1</sup>. Parâmetros de estresse oxidativo, como níveis de TBARS e tióis, bem como atividades de SOD e CAT foram avaliados no sangue e tecido da pata dos animais submetidos ao teste da carragenina. A toxicidade aguda do extrato foi investigada usando a diretriz OECD 423. O tratamento oral com o extrato de acetato de etila inibiu em 46,8 e 53,5% as contorções abdominais dos camundongos nas doses de 375 e 500 mg·kg<sup>-1</sup>, respectivamente, e reduziu o efeito da formalina na fase de dor neurogênica e também na fase de dor inflamatória a 500 mg·kg<sup>-1</sup>. O extrato não causou alterações na locomoção espontânea dos animais (teste de campo aberto), mas o número de bolos fecais foi significativamente menor para o grupo da dose mg·kg<sup>-1</sup> quando comparado ao grupo veículo. O pré-tratamento com naloxona causou inibição significativa da atividade antinociceptiva induzida pelo extrato no teste da formalina, revelando o possível envolvimento dos receptores opioides. O extrato administrado na dose de 500 mg·kg<sup>-1</sup> evitou o edema da pata induzido por carragenina até 6 horas após a administração de carragenina. A avaliação dos níveis de TBARS e tióis, atividades das enzimas SOD e CAT no sangue e no tecido da pata dos animais submetidos ao ensaio de carragenina sugerem que o efeito anti-inflamatório do extrato pode estar ligado à inibição do estresse oxidativo. A administração aguda do extrato na dose de 2000 mg·kg<sup>-1</sup> não causou mortalidade, demonstrando baixa toxicidade. A partir desses resultados, o extrato de acetato de etila foi submetido à encapsulação pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS) com o biopolímero PHBV. Os parâmetros concentração de extrato e temperatura foram avaliados a partir de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com ponto central, com pressão constante de 80 bar. Maior eficiência de encapsulamento (89,56%) foi verificada utilizando 20 µg·mL<sup>-1</sup> de concentração de extrato (relação 1:1 extrato e PHBV) e temperatura de 35 °C. Nessas condições também foi verificado o menor tamanho médio de partículas, resultando em 0,622 ± 0,232 µm, com coeficiente de variação de 37,34%. Análises cromatográficas demonstraram que o processo provocou pequena alteração na composição química do extrato, mantendo seus principais constituintes, como os fitoesteróis, campesterol, estigmasterol e β-sitosterol. Para o composto β-sitosterol, houve aumento em torno de 35% em sua concentração no extrato após o processo de encapsulamento.

**Palavras-chave:** *P. bipinnatifidum*. Antioxidante. Antimicrobiano. Antinociceptiva. Anti-inflamatória. SEDS.

## ABSTRACT

Many of the species used in folk medicine do not have their biological activities proven by scientific studies so far. Among these species, *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae), which is native from South America, deserves special attention as it is used in popular medicine to treat infections cases such as erysipelas, and inflammations such as orchitis and ulcers, and finally for the treatment of rheumatism. In this context, the objective of this work was to obtain extracts of *P. bipinnatifidum* and evaluate the biological activities *in vitro* and *in vivo*, as well as perform the encapsulation of the ethyl acetate extract through the SEDS technique. We evaluated the antioxidant, antimicrobial, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *P. bipinnatifidum* stems extracts obtained by maceration with organic solvents. We observed high antimicrobial activity for the microorganism *Streptococcus pyogenes* with the extract obtained from the solvent ethyl acetate, with MIC 3.20 mg·mL<sup>-1</sup> and low activity for the ethanolic extract (MIC 10.0 mg·mL<sup>-1</sup>). Low antimicrobial activity was observed in the *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes* microorganisms for the extract of ethyl acetate, with MIC of 10.0 mg·mL<sup>-1</sup>, and no activity for the ethanol extract. Both extracts resulted in high antioxidant activity, but the ethyl acetate extract presented significantly higher results, with IC<sub>50</sub> of 27.11 µg·mL<sup>-1</sup>, when 59.43 µg·mL<sup>-1</sup> was recorded for the ethanolic extract. The most significant biological activity of the fraction extracted with ethyl acetate is related to its chemical composition, in comparison to the ethanol fraction, which presented the highest concentration of bioactive compounds, such as flavonoids quercetin, luteolin, apigenin and rutin. The ethyl acetate extract also showed a higher concentration of compounds of the phytosterols class, such as β-sitosterol, stigmasterol and campesterol. From this, the ethyl acetate extract was evaluated for its antinociceptive and anti-inflammatory actions *in vivo* tests using male Swiss mice. We evaluated the antinociceptive activity through the test of induction of abdominal writhing by acetic acid, at doses of 250, 375 and 500 mg·kg<sup>-1</sup> and the formalin test at the dose of 500 mg·kg<sup>-1</sup>. The open field test was performed to evaluate possible changes in the animals' spontaneous locomotion. We also evaluated the possible participation of the opioid system in the antinociceptive effect of the extract in the formalin test, using naloxone. The evaluation of the anti-inflammatory activity was performed by the paw edema test induced by carrageenan at a dose of 500 mg·kg<sup>-1</sup>. Oxidative stress parameters, such as levels of

TBARS and NPSH, as well as SOD and CAT activities were evaluated in the blood and paw tissue of animals submitted to the carrageenan test. Acute toxicity of the extract was investigated using OECD directive 423. Oral treatment with ethyl acetate extract inhibited 46.8 and 53.5% of abdominal writhing at doses of 375 and 500 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively, and reduced the effect of formalin in the stage of neurogenic pain and also in the stage of inflammatory pain at 500 mg·kg<sup>-1</sup>. The extract did not cause changes in the animals' spontaneous locomotion (open field test), but the number of fecal cakes was significantly lower for the 500 mg·kg<sup>-1</sup> dose group when compared to the vehicle group. Pretreatment with naloxone caused significant inhibition of the antinociceptive activity induced by the extract in the formalin test, revealing the possible involvement of the opioid receptors. The extract administered at a dose of 500 mg·kg<sup>-1</sup> prevented carrageenan-induced paw edema up to 6 hours after administration of carrageenan. Assessment of TBARS and NPSH levels, SOD and CAT enzyme activities in blood and paw tissue of animals submitted to the carrageenan assay suggest that the anti-inflammatory effect of the extract may be linked to the inhibition of oxidative stress. Acute administration of the extract at the dose of 2000 mg·kg<sup>-1</sup> did not cause mortality, demonstrating low toxicity. From these results, we subjected the ethyl acetate extract to encapsulation by the technique of Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) with the PHBV biopolymer. The parameters concentration of extract and temperature were evaluated from a 2<sup>2</sup> factorial planning with central point, with constant pressure of 80 bar. We verified higher encapsulation efficiency (89.56%) using mg·mL<sup>-1</sup> extract concentration (ratio 1:1 extract and PHBV) and a temperature of 35 ° C. Under these conditions, the lowest mean particle size was also observed, resulting in 0.622 ± 0.232 µm, with a variation coefficient of 37.34%. Chromatographic analysis showed that the process caused a small change in the chemical composition of the extract, maintaining its main constituents, such as phyosterols, campesterol, stigmasterol and β-sitosterol. For β-sitosterol compound, there was an increase of about 35% in its concentration in the extract after the encapsulation process.

**Keywords:** *P. bipinnatifidum*. Antioxidant. Antimicrobial. Antinociceptive. Anti-inflammatory. SEDS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Tipos de micropartículas (a) microcápsulas e (b) microesferas.....	34
Figura 1.2 - Diagrama de fases para uma substância pura.....	37
Figura 1.3 - Diagrama esquemático da técnica SEDS.....	39
Figura 2.1 – Foto ilustrativa do exemplar de <i>Philodendron bipinnatifidum</i> utilizado para coleta.....	51
Figura 2.2 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para os ensaios de encapsulação.....	63
Figure 3.1 - Percent inhibition of DPPH radical oxidation as a function of the concentrations of <i>P. bipinnatifidum</i> stems extracts and acid ascorbic.).....	80
Figure 3.2 - Antioxidant activity measured by FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ equivalent per ml) as a function of the concentrations of <i>P. bipinnatifidum</i> stems extracts and acid ascorbic.....	81
Figure 3.3 - Representative high performance liquid chromatography profile of <i>Philodendron bipinnatifidum</i> extracts with ethanol (A) and ethyl acetate (B).....	83
Figure 3.4 Effect of the <i>P. bipinnatifidum</i> extract (ethyl acetate) on the activity of sucrase (a), maltase (b) and lactase (c) intestinal disaccharidases.....	86
Figure 4.1. Effect of <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate fraction (EPB) in mice acetic-acid induced abdominal-writhing test .....	101
Figure 4.2. Effect of <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate extract (EPB) on mice locomotor activity (open field test).....	102
Figure 4.3. Effect of <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate extract (EPB) in mice nociceptive behavior assessed in the formalin-induced nociception test.....	103
Figure 4.4 Effect of <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate extract (EPB) (500 mg/kg, p.o.) on mice paw oedema induced by carrageenan.....	104
Figure 4.5. Effects of <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate extract (EPB) (500 mg/kg, p.o.) on antioxidant levels in mice blood and paw tissue.....	106
Figure 4.6. Effect of mice pretreatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive effect of <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate extract (EPB) (500 mg/kg, p.o.) in the formalin test.....	107
Figure 4.7. Effect of the <i>P. bipinnatifidum</i> ethyl acetate extract (EPB) acute treatment (2000 mg/kg, p.o.) on mice food intake (A) (g food intake/g mice/day) and relative body weight (%) (B).....	108

Figure 5.1. SEM images of the <i>P. bipinnatifidum</i> extract encapsulated in PHBV by SEDS technique.....	133
Figure 5.2. Response surface of temperature <i>versus</i> extract concentration to mean particle size.....	135
Figure 5.3. Response surface of temperature <i>versus</i> extract concentration to encapsulation efficiency.....	136
Figure 5.4. <i>In vitro</i> release profiles in 0.25 mol.L <sup>-1</sup> HCl (●) and PBS pH 6.8 (■) of particles obtained in the co-precipitation run 2.....	137
Figure 5.5. Chromatograms by GC/MS. A: Ethyl acetate extract and B: Particles of run 2 (35 °C and 20 mg·mL <sup>-1</sup> ).....	138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com triplicata no ponto central para estimativa do efeito da temperatura e concentração de extrato de <i>P. bipinnatifidum</i> na encapsulação através da técnica SEDS.....	66
Table 3.1 - Antimicrobial activity of <i>P. bipinnatifidum</i> extracts.....	82
Table 3.2 - Components of <i>Philodendron bipinnatifidum</i> extracts.....	84
Table 4.1 - Compounds determined by HPLC and GC/MS in ethyl acetate fraction of <i>P. bipinnatifidum</i> .....	100
Table 5.1 Operational conditions employed in the encapsulation process. Following parameters were fixed at all experimental conditions: PHBV concentration of 20 mg·mL <sup>-1</sup> , solution flow rate of 1 mL·min <sup>-1</sup> , anti-solvent flow rate of 20 mL·min <sup>-1</sup> (at 20 MPa and 5 °C) and pressure of 8.0 MPa. T: temperature and EC: extract concentration in the organic solution.....	125
Table 5.2. Chemical composition of <i>P. bipinnatifidum</i> extracts obtained from different organic solvents by the GC/MS.....	129
Table 5.3. Percentage of encapsulation (PE) and encapsulation efficiency (EE) of SEDS process, particle size values and coefficient of variation (CV).....	132
Table 5.4. β-sitosterol quantification in <i>P. bipinnatifidum</i> extract obtained with ethyl acetate (EA extract) and capsules of run 1 (35 °C; 5.0 mg·mL <sup>-1</sup> ), Run 2 (35 °C; 20.0 mg·mL <sup>-1</sup> ) and Run 6 (37.5 °C; 12.5 mg·mL <sup>-1</sup> ).....	139





## LISTA DE ABREVIACOES

AINES – Anti-inflamatórios no esteroidais  
ASES – Aerosol Solvent Extraction System  
CAT – Catalase  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
GC/MS - Gas Chromatography/Mass Spectrometry  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo  
EROS - Espcies Reativas de Oxignio  
FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power  
GAS – Gas antisolvent  
IC<sub>50</sub> - The half maximal inhibitory concentration  
MEV – Microscópio eletrnico de varredura  
NPSH - Non-protein sulfhydryl  
PCA – Particles by Compressed Antisolvent  
PHBV - Poly (hydroxybutyrate-CO-hydroxyvalerate)  
PGSS - Particles from Gas Saturated Solutions  
RESS – Rapid expansion of supercritical solutions  
SAS – Supercritical Antisolvent  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SEDS - Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid  
SOD - Superxido dismutase  
TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances



## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DO DOCUMENTO.....	23
CAPÍTULO 1.....	25
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.2.1 Objetivo Geral.....	27
1.2.2 Objetivos Específicos.....	28
1.3.1 Metabólitos secundários.....	29
1.3.2 <i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott ex Endl.....	30
1.3.3 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória <i>in vivo</i> .....	32
1.3.4 Técnicas de encapsulação.....	34
1.3.4.1 Formação de micro e nanopartículas empregando fluido supercrítico.....	36
1.3.4.2 SEDS - <i>Solution Enhanced Dispersion with                 Supercritical Fluid</i> .....	37
1.3.5 Considerações a respeito do estado da arte.....	40
1.4 Referências.....	41
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos.....	51
2.1.2 Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
2.1.3 Análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (GC/MS).....	53
2.1.4 Análises de atividade antioxidante.....	54
2.1.4.1 Ensaio FRAP.....	54
2.1.4.2 Ensaio DPPH.....	54
2.1.5 Análise de açúcares totais.....	55
2.1.6 Atividade antimicrobiana de extratos dos talos de <i>P. bipinnatifidum</i> .....	55
2.1.7 Análises de dissacaridases intestinais.....	57
2.1.8 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato de <i>P. bipinnatifidum</i> .....	57

2.1.8.1	Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	58
2.1.8.2	Teste da formalina .....	59
2.1.8.3	Envolvimento do receptor opióide na atividade antinociceptiva .....	59
2.1.8.4	Teste da carragenina .....	60
2.1.8.5	Avaliação da atividade locomotora/exploratória - teste do campo aberto .....	60
2.1.8.6	Teste de toxicidade aguda .....	61
2.1.8.7	Análises estatísticas .....	61
2.1.9	Análises bioquímicas .....	61
2.1.10	Ensaios de encapsulação do extrato de <i>P. bipinnatifidum</i> utilizando a técnica SEDS .....	62
2.1.10.1	Aparato experimental .....	62
2.1.10.2	Metodologia experimental para encapsulação do extrato de <i>P. bipinnatifidum</i> em PHBV e obtenção de partículas submicrométricas .....	65
2.1.11	Eficiência do encapsulamento do extrato de <i>P. bipinnatifidum</i> pela técnica SEDS .....	66
2.1.12	Morfologia e determinação do tamanho da partícula .....	67
2.1.13	Experimentos de liberação <i>in vitro</i> .....	68
2.1.14	Referências .....	68
CAPÍTULO 3	.....	73
3.2.1	Plant material and solvent extraction .....	74
3.2.2	Chemical composition of the extracts by HPLC Analysis .....	75
3.2.3	Analysis of antioxidant activity .....	76
3.2.3.1	<i>FRAP assay for antioxidant capacity</i> .....	76
3.2.3.2	<i>Antioxidant activity by DPPH scavenging assay</i> .....	76
3.2.4	Antimicrobial activity .....	77
3.2.4.1	<i>Agar plug diffusion method</i> .....	77

3.2.4.2 <i>Minimum inhibitory concentration (MIC)</i> .....	77
3.2.5 Total sugars analysis .....	78
3.2.6 Intestinal disaccharidases activity .....	78
3.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	79
3.4 CONCLUSION.....	87
CAPÍTULO 4.....	91
Abstract .....	91
Abbreviations .....	92
4.1 Introduction.....	92
4.2 Materials and methods .....	94
4.2.1 <i>Plant material and extraction</i> .....	94
4.2.2 <i>HPLC Analysis</i> .....	94
4.2.3 <i>GC/MS analysis</i> .....	95
4.2.4 <i>Animals</i> .....	95
4.2.5 <i>Acetic acid-induced writhing response</i> .....	96
4.2.6 <i>Open-field test</i> .....	96
4.2.7 <i>Formalin test</i> .....	97
4.2.8 <i>Carrageenan-induced paw oedema</i> .....	97
4.2.9 <i>Biochemical analysis</i> .....	97
4.2.11 <i>Acute toxicity</i> .....	98
4.2.13 <i>Statistical analysis</i> .....	99
4.3 Results.....	99
4.3.1 <i>Phytochemical analysis</i> .....	99
4.3.2 <i>Acetic acid-induced abdominal writhing test</i> .....	100
4.3.4 <i>Formalin test</i> .....	102
4.3.5 <i>Carrageenan-induced paw oedema</i> .....	103
4.3.6 <i>Antioxidant levels in blood and paw tissue</i> .....	104
4.3.7 <i>Opioid receptor involvement in the EPB         antinociceptive activity</i> .....	106
4.3.8 <i>Acute toxicity</i> .....	107

4.5 Conclusions.....	113
Acknowledgements.....	114
4.6 References.....	114
CAPÍTULO 5 .....	121
Abstract.....	121
5.1 Introduction.....	122
5.2 Materials and Methods.....	123
5.2.1 <i>Materials</i> .....	123
5.2.2 <i>Extraction of bioactive compounds from P. bipinnatifidum</i> .....	123
5.2.3 <i>Experimental apparatus and procedure for encapsulation using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS)</i> .....	124
5.2.4 <i>Determination of the percentage of encapsulation and encapsulation efficiency</i> .....	125
5.2.5 <i>In vitro release experiments</i> .....	126
5.2.6 <i>Morphology and determination of particle size</i> ..	126
Particles characterization was performed regarding to morphology, by scanning electron microscopy (SEM - JEOL JSM-6390LV, United States). .....	126
5.2.7 <i>Chemical profile of the extracts</i> .....	126
5.3 Results and discussion .....	127
5.3.1 <i>Results of extractions and chemical profile of extracts</i> .....	127
5.3.2 <i>Encapsulation of P. bipinnatifidum ethyl acetate extract in PHBV by SEDS technique</i> .....	131
5.4 Conclusions.....	139
Acknowledgements.....	140
5.5 References.....	140
CAPÍTULO 6 .....	145
CONCLUSÕES .....	145

## APRESENTAÇÃO DO DOCUMENTO

O presente documento foi organizado em 6 capítulos. O Capítulo 1 traz a introdução e fundamentação teórica, onde estão descritos os principais conceitos teóricos necessários para desenvolvimento da tese, a partir de dados publicados na literatura. Este capítulo também descreve o objetivo da tese, bem como os objetivos específicos.

O Capítulo 2 refere-se à descrição detalhada dos métodos experimentais da pesquisa realizada.

Os Capítulos 3, 4 e 5 descrevem os resultados da tese, e estão apresentados em formato de artigos científicos. O Capítulo 3 refere-se à parte inicial da pesquisa realizada, apresentando a composição química de diferentes extratos de *P. bipinnatifidum* e algumas atividades biológicas *in vitro*, intitulado “Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potential of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl”. O Capítulo 4 refere-se a atividades biológicas *in vivo* do extrato que apresentou melhores resultados no Capítulo 3, e está intitulado como “Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae)”. O Capítulo 5 traz novas análises do perfil químico de diferentes extratos da planta estudada e também está relacionado ao processo de encapsulação do mesmo extrato utilizado no Capítulo 4, através da técnica SEDS, apresentado no artigo “Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique”.

No Capítulo 6 estão descritas as conclusões da pesquisa realizada.





## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem um grande grupo de compostos denominados de metabólitos secundários, e o interesse no estudo destes é devido aos diferentes efeitos que desempenham na alimentação humana, no controle de animais considerados pragas e o potencial para prevenir ou remediar doenças. Propriedades terapêuticas, antitumoral, antiviral, bactericida, fungicida, inseticida, antioxidante, entre outras, são atribuídas aos metabólitos secundários. Esses compostos desempenham importante papel na descoberta e desenvolvimento de fármacos, visando à produção e formulação de novos princípios ativos para o tratamento de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O interesse por extratos vegetais se dá inicialmente através de relatos do conhecimento popular, que podem muitas vezes ser comprovados cientificamente através de testes *in vitro* e *in vivo*. A atividade antioxidante é um dos principais testes realizados, devido a essa atividade estar relacionada à presença de compostos que combatem os radicais livres, que estão associados a processos fitopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação (LOBO et al., 2010).

Extratos vegetais podem apresentar atividade contra uma ampla variedade de microrganismos, como fungos, vírus e bactérias, os quais são responsáveis por diversar doenças infecciosas. Estas patologias estão se tornando mais difíceis de tratar devido ao crescente aumento da resistência dos microrganismos aos antibióticos, e, em alguns casos, ainda não há opção de tratamento (UD-DAULA et al., 2016). Dessa forma pode-se ressaltar a importância de procurar e desenvolver agentes antimicrobianos e antioxidantes novos e naturais.

Também há um grande interesse da comunidade acadêmica e indústria farmacêutica em desenvolver medicamentos mais seguros e eficazes para tratar a dor e a inflamação. A dor é uma das condições mais prevalentes que limita a produtividade e reduz a qualidade de vida de pacientes. Embora exista um arsenal de analgésicos eficazes e amplamente utilizados, alguma preocupação com sua segurança e efeitos colaterais deve ser considerada (CAZACU, MOGOSAN e LOGHIN 2015). Como muitas pessoas estão escolhendo a medicina alternativa para tratamento, é interessante investigar os efeitos biológicos de plantas consideradas medicinais e verificar seus possíveis efeitos adversos, para

comprovar seu uso popular e fornecer um perfil de segurança melhorado para os pacientes (SILVA et al., 2012).

Inicialmente, os testes *in vivo* para avaliar as atividades analgésicas e anti-inflamatórias geralmente empregam modelos que utilizam diferentes estímulos em camundongos ou ratos. Para a verificação da atividade analgésica de uma substância ou extrato, os animais são submetidos a testes que exibem respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor, o que é denominado de nocicepção (LAPA, 2007). A atividade anti-inflamatória geralmente é avaliada através de testes onde há indução de lesão tecidual e conseqüentemente processo de inflamação, sendo o teste do edema de pata induzido por carragenina um dos mais utilizados (FEHRENBACHER, VASKO e DUARTE, 2012).

Entre as plantas cultivadas no Brasil, *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl é uma espécie arbustiva pertencente à família Araceae, endêmica da América do Sul. É conhecida popularmente como guaimbé, banana-de-macaco, banana-de-bugre, banana-có ou imbé. Na medicina popular é utilizada como anestésica, anti-inflamatória, e há também relatos de atividade antitumoral. Apesar de ser muito utilizada na medicina popular brasileira, há poucos estudos científicos sobre esta espécie, com relatos do potencial antioxidante das raízes (MENEZES, SCHWARTZ, e SANTOS, 2004), atividade antiprotozoária dos ramos e folhas (MUELAS-SERRANO et al., 2000) e efeito antiproliferativo em células de câncer de fígado (EL-DEEB et al., 2012).

A fim de propor novas formas de utilização de extratos, as técnicas de micro e nanoencapsulação podem surgir como ferramentas úteis e de grande interesse em estudos científicos. Estas técnicas têm como objetivo proteger e/ou purificar compostos, reduzindo assim as interações com fatores ambientais, tais como calor e luz; modular a liberação de compostos, uma vez que influencia diretamente na solubilidade; e modificar as propriedades de superfície das partículas usadas (EZHILARASI et al., 2013).

Entre as técnicas utilizadas para o encapsulamento de compostos, as que empregam fluidos supercríticos apresentam algumas vantagens frente aos métodos convencionais, com a formação de micro e/ou nanopartículas com estreita distribuição de tamanho, boa eficiência de encapsulamento, controle de polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar compostos termossensíveis e produção de partículas com elevado grau de pureza (SHETH et al., 2012).

Dentre os fluidos utilizados, o dióxido de carbono geralmente é o mais empregado nos processos de encapsulamento e precipitação de compostos. O ponto crítico desta substância é 31 °C e 73,8 bar, sendo

atóxico nas condições de uso, não inflamável e custo relativamente baixo (COCERO et al., 2009). Outra vantagem é seu estado gasoso a temperatura e pressão ambiente, o que fornece analitos livre de solventes. É um fluido interessante para se trabalhar com alimentos e produtos naturais, pois possibilita o processamento a baixas temperaturas, utilizando um meio não-oxidante, o que permite sua utilização com compostos termolábeis ou que são facilmente oxidados (MENDIOLA et al., 2007).

O processo de encapsulação a partir de dióxido de carbono supercrítico pode ser aplicado a extratos vegetais, com diferentes propósitos, como modificar propriedades de superfície das partículas, aumentar a solubilidade em água e proteger seus constituintes, como por exemplo, compostos que apresentam propriedades antioxidantes, que podem sofrer degradação na presença de luz e oxigênio (BOSCHETTO et al., 2013; MEZZOMO et al., 2016).

Devido a sua utilização na medicina popular e aos poucos relatos científicos encontrados, o estudo de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *P. bipinnatifidum* desperta interesse, principalmente em relação a sua utilização para tratamento de dores e processos inflamatórios, os quais não existem relatos na literatura. A aplicação de metodologias de encapsulação para o extrato de *P. bipinnatifidum* também não estão descritas na literatura, nem através de métodos convencionais, nem através de processos com fluidos supercríticos, considerando que o processo de encapsulação do extrato pode trazer benefícios à sua utilização, como proteção e concentração de compostos bioativos. A partir disso, esse trabalho propõe a avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos de *P. bipinnatifidum*, bem como estudar o processo de encapsulação do extrato através da técnica SEDS.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos de *P. bipinnatifidum* e encapsular empregando a técnica SEDS.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos por maceração dos talos e folhas de *P. bipinnatifidum* por meio dos solventes álcool etílico, acetato de etila e éter de petróleo;
- Identificar e quantificar compostos nos extratos obtidos por meio de análises cromatográficas (CLAE e GC/MS);
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólico e acetato de etila em ensaios *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e acetato de etila;
- Avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato de acetato de etila em ensaios *in vivo*;
- Verificar o possível efeito protetor do extrato de acetato de etila frente a parâmetros de estresse oxidativo em modelo animal de indução de inflamação;
- Obter partículas do extrato de acetato de etila encapsuladas pelo processo SEDS empregando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico e PHBV como agente encapsulante;
- Realizar testes de caracterização das partículas obtidas nos ensaios de encapsulamento, como distribuição de tamanho de partícula e MEV;
- Realizar testes de eficiência de encapsulamento das partículas obtidas.
- Identificar e quantificar compostos nas partículas obtidas através de análises cromatográficas (GC/MS).

### 1.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo serão abordados os principais conceitos disponíveis na literatura sobre o tema do presente trabalho, com destaque para o estudo de metabólitos secundários e as suas funções farmacológicas, considerações sobre a planta estudada, *P. bipinnatifidum*, descrição dos principais testes de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*, e as técnicas de encapsulamento para extratos de plantas, dando ênfase as técnicas que empregam fluido supercrítico.

### 1.3.1 Metabólitos secundários

A distinção entre os diversos compostos presentes nos seres vivos está estabelecida quanto à função destes nos organismos; enquanto alguns são substâncias essenciais à vida da célula, outros não lhe são. Em relação às plantas, têm-se os compostos denominados metabólitos primários, os quais formam o grupo das substâncias essenciais, como por exemplo, a clorofila, pigmento essencial à fotossíntese. Os demais compostos são identificados como metabólitos secundários, e estes muitas vezes estão presentes nos organismos em grandes quantidades (HERBERT, 2012).

De acordo com Wink (2010), em um primeiro momento, havia questionamentos sobre o porquê da presença dos metabólitos secundários nos organismos vegetais, e até defendia-se a hipótese de que estes eram reservas de carbono (energia). Porém, devido à extraordinária diversidade e complexidade estruturais dessas substâncias, esta hipótese foi descartada, uma vez que, para reserva de energia, os seres vivos poderiam acumular gorduras, que são substâncias quimicamente mais simples. Outro fator relevante é que determinadas substâncias ocorrem geralmente em um número limitado de organismos, mais um indicativo de que elas não são essenciais para o metabolismo primário.

Mais tarde percebeu-se que, embora alguns metabólitos secundários não pareçam essenciais à vida do organismo que o produz, estes, muitas vezes desempenham mecanismos importantes relacionados à sua sobrevivência, agindo na defesa em relação aos predadores (herbívoros, microrganismos e plantas concorrentes), na reprodução da espécie, na simbiose e também como mediadores em interações ecológicas, como a sobrevivência e a adaptação em determinado ambiente (WINK, 2016).

Os metabólitos secundários são classificados de acordo com a sua origem biossintética em três grupos principais: terpenos, alcaloides e compostos fenólicos. Os terpenos são hidrocarbonetos cíclicos insaturados, com diferentes funções oxigenadas, com subgrupos ligados a um esqueleto carbônico. Os alcaloides são bases orgânicas que possuem um átomo de nitrogênio ligado a uma estrutura cíclica de 5 ou 6 carbonos. Os compostos fenólicos são compostos aromáticos com uma ou mais hidroxilas; a maioria são polifenóis, com grupo hidroxil substituído por um grupo metil ou glicosil (HERBERT, 2012).

Outros grupos de metabólitos secundários envolvem os flavonoides e os fitoesteróis. A estrutura química dos flavonoides apresenta um esqueleto formado por 15 átomos de carbono constituído

por dois anéis aromáticos, ligados por meio de uma cadeia de três carbonos entre eles. Os flavonoides são responsáveis por inúmeras funções nas plantas, dentre elas, podem-se citar a proteção contra raios ultravioleta, contra fungos e bactérias. Além dessas características, muitos desses compostos possuem também importantes atividades farmacológicas já comprovadas, como atividade antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, dentre outras (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016). Os fitoesteróios são esteróis compostos por 27 a 29 átomos de carbono e estruturalmente semelhantes ao colesterol, diferenciando-se deste pelas configurações no núcleo ou na cadeia lateral, ou ainda, pela posição de grupos polares. Estes compostos são indicados para o tratamento de doenças cardiovasculares, como potenciais redutores dos níveis de colesterol total e LDL. Diversos estudos têm demonstrado que os fitoesteróios podem ser usados para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como o câncer (ROCHA et al., 2011).

A síntese e a acumulação desses compostos nas plantas dependem de vários fatores, sendo os genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais (temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, radiação e nutrientes) os mais importantes (VERMA; SHUKLA, 2015).

De acordo com o papel que desempenham nas plantas, os metabólitos secundários são agentes bioativos que podem agir em alvos moleculares em outras plantas, microrganismos e animais; o que possibilita a aplicação desses compostos como fármacos, para prevenir e/ou remediar doenças. Propriedades terapêuticas, antitumoral, antiviral, bactericida, fungicida, inseticida, antioxidante, entre outras, são atribuídas aos metabólitos secundários. Como por exemplo, pode-se citar a morfina, um alcaloide obtido da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), utilizado na medicina devido ao seu potente efeito anestésico (VAN WYK et al., 2015).

Atualmente, os metabólitos secundários, ou ainda, produtos naturais, desempenham importante papel na descoberta de mecanismos para o desenvolvimento de drogas, como por exemplo, a manipulação de vias biossintéticas, visando à produção de substâncias sintéticas com atividades farmacológicas tão eficazes quanto as encontradas naturalmente, buscando a formulação de novos agentes ativos para o tratamento de doenças (WINK, 2016).

### **1.3.2 *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl**

A *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl é uma espécie arbustiva pertencente à família Araceae, família que agrupa também as

plantas ornamentais conhecidas por antúrio, copo-de-leite e lírio-da-paz. Nativa da Bolívia, Paraguai, sul do Brasil e nordeste da Argentina, é uma planta de ocorrência abundante e muito característica da mata Atlântica (JANKOWSKI et al., 2000).

*P. bipinnatifidum* é conhecida por um ou mais nomes comuns em lugares diferentes. No idioma português é popularmente conhecida com os nomes imbê, bananeira-imbê, guaimbé, banana-de-bugre, banana-de-macaco, entre outros. No idioma inglês geralmente é denominada por *lacy tree philodendron* e *selloum* (WAGSTAFF, 2008).

Tem característica epífita (plantas que vivem sobre outras plantas sem que ocorra parasitismo), se instalando geralmente em forquilhas do tronco e ramos de árvores mais altas, emitindo longas raízes que chegam até o solo. As flores se apresentam em espádice axilar com 15 a 20 cm de comprimento por 4 a 5 cm de diâmetro. Os frutos, comestíveis, são bagas subcilíndricas, amarelas e de estigma persistente. As folhas atingem até 1 m de altura, e possuem os bordos muito recortados (MARCHIORF e GOMES, 2008). Devido às características de suas folhas, que são grandes, verdes e vistosas, esta espécie é bastante utilizada como planta ornamental em jardins e quintais.

Na medicina popular, folhas e talos são utilizados no tratamento de casos de infecções, como erisipela, e inflamações como orquites e úlceras. Também é utilizada para o tratamento de reumatismo, e há relatos de atividade antitumoral. Apesar de esta planta ser muito utilizada na medicina popular brasileira, há poucos estudos científicos sobre seus efeitos farmacológicos.

Menezes et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante das raízes de *P. bipinnatifidum* contra radicais livres de DPPH, resultando em uma concentração de 39,91  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato necessária para reduzir 50% o radical DPPH. Muelas-Serrano et al. (2000) avaliaram a atividade antiprotozoária dos ramos e folhas de *P. bipinnatifidum*. O extrato aquoso, a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , apresentou inibição do crescimento de *Trypanosoma cruzi* em 46,9%.

O extrato das folhas de *P. bipinnatifidum* obtido através do solvente metanol demonstrou efeito antiproliferativo em células humanas de câncer de fígado (HepG2), resultando em uma concentração de 15,9  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para inibir 50% de crescimento celular. O estudo relata ainda o fracionamento cromatográfico do extrato, com isolamento de novos compostos fenólicos, denominados p-hidroxifeniletil  $\beta$ -D-glucopiranosilo,  $\beta$ -D-glucopiranosilo, 4-O-transcafocoil-O-a-L-ramnopiranosídeo, 2-feniletil 4-O-transcafocoil-O-a-L-ramnopiranosídeo e

2,3-dimetil-feniletil-4-O-transcafocoil-p-D-glucopiranosilo. A atividade antiproliferativa nas células HepG2 também foi avaliada para estes compostos, com resultados inferiores ao extrato bruto, o que demonstra que a atividade do extrato não se deve a esses compostos (EL-DEEB et al., 2012).

### 1.3.3 Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*

São vários os modelos *in vivo* que são utilizados na pesquisa de compostos com atividade analgésica, os quais geralmente não são específicos, ou seja, independem do composto a ser avaliado. Como os animais não apresentam a capacidade de comunicar verbalmente a ocorrência da dor, quando são submetidos a um estímulo nocivo, eles exibem respostas comportamentais, que chamamos de comportamento nociceptivo. A nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos receptores da dor (nociceptores) que codificam sinais para fornecer informações ao sistema nervoso central (SNC) da existência do agente causal da dor (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2009).

Entre os modelos animais mais utilizados pode-se citar o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste da formalina. As contorções induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo amplamente utilizado de dor visceral, é altamente sensível e útil para rastrear novos fármacos analgésicos (KOSTER, 1959). Segundo Ferdous et al. (2008), o ácido acético induz síndromes de contorções aumentando a produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios como prostaglandina, prostaciclina e outras citocinas no fluido tecidual periférico, que por sua vez excitam as terminações nervosas dos nociceptores periféricos, que são sensíveis a analgésicos narcóticos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).

O teste de formalina para nocicepção envolve dor moderada e contínua gerada por uma lesão tecidual. Desta forma, difere da maioria dos testes tradicionais de nocicepção, que se baseiam em estímulos de intensidade limiar. Nesse teste são analisadas duas fases, que se diferem e são úteis para avaliar tanto as substâncias analgésicas, como para elucidar o mecanismo de ação da analgesia. A primeira fase está relacionada à dor neurogênica (não-inflamatória), que resulta da estimulação direta de nociceptores. A segunda fase está relacionada à dor inflamatória e, portanto, é caracterizada por inflamação local com liberação de mediadores inflamatórios (TJØLSEN et al., 1992; SANTOS e CALIXTO, 1997). Em relação ao mecanismo de ação, é importante salientar que a primeira fase é mais sensível a drogas que interagem com



o sistema opioide, como a morfina, e a segunda fase é inibida por drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES). As drogas de ação central (opioides) são capazes de inibir ambas as fases (ROSLAND et al., 1990).

Um processo inflamatório envolve mediadores inflamatórios e/ou provoca uma lesão que ativa ou sensibiliza os nociceptores locais. Em camundongos, o teste do edema induzido por carragenina é o mais amplamente utilizado para triagem de agentes anti-inflamatórios, principalmente de produtos naturais (FEHRENBACHER et al., 2012). A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica, com a formação de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios. A fase inicial (60-90 minutos) é atribuída a uma liberação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a fase tardia (4-6 horas) é devido a super produção de prostaglandina. A resposta inflamatória é normalmente quantificada pelo aumento no tamanho da pata (edema) (OGONOWSKI et al., 1997).

As diferentes células envolvidas no processo de inflamação, em resposta a estímulos pró-inflamatórios, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção EROs é parte integrante do metabolismo animal e é observada em diversas condições fisiológicas. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, ocasionando dano celular. Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem grande importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, o que estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos (LOWE, 2014).

Os marcadores de dano oxidativo têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Entre os ensaios para determinação de parâmetros de estresse oxidativo podemos citar alguns principais, como a determinação das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (FRIJHOFF et al., 2015). Para prevenir o dano oxidativo, o organismo dispõe dessas defesas enzimáticas (SOD e CAT), dessa forma, maiores níveis dessas enzimas significam que o organismo está agindo para reduzir o dano causado pela inflamação (MATAIX et al., 1998).

O TBARS é um método classicamente utilizado na literatura para identificação de peroxidação lipídica através da dosagem de malondialdeído, que é um dos produtos finais do processo de oxidação e

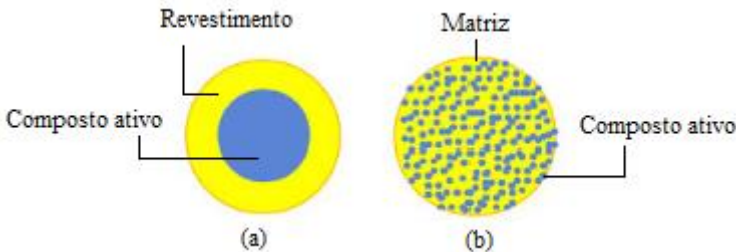
decomposição de ácidos graxos poli-insaturados. Sua detecção no tecido ou plasma é um forte indicativo da ocorrência de peroxidação lipídica e, portanto, do estresse oxidativo (AYALA, MUÑOZ e ARGÜELLES, 2014).

### 1.3.4 Técnicas de encapsulação

A encapsulação é um processo em que compostos ativos são revestidos e/ou incorporados em uma matriz polimérica. De forma geral, para se realizar um processo de encapsulação, o composto a ser encapsulado é suspenso em uma solução polimérica e, em seguida, o polímero dissolvido é precipitado recobrando o material em suspensão. Dessa forma, ocorre a formação de uma fina camada de polímero envolvendo o composto, com a formação de macro, micro e/ou nanocápsulas. Ou então, o composto a ser encapsulado e o polímero são dissolvidos em um único solvente, e simultaneamente precipitado (coprecipitação). Nessa situação, várias partículas do composto encontram-se dentro da camada polimérica, com a formação de micro e/ou nanoesferas (JYOTHI et al., 2010).

Os tipos de partículas formados durante os processos de encapsulação e coprecipitação apresentam, em geral, característica de microcápsula ou microesfera. Na microcápsula o sistema é do tipo reservatório, que consiste em uma camada de polímero que protege o composto ativo (Figura 1.1-a). Já nas microesferas o ingrediente ativo está contido num número de pequenas gotículas ou partículas que estão dispersas no material da matriz (Figura 1.1-b) (VASISHT, 2014).

Figura 1.1 - Tipos de micropartículas (a) microcápsulas e (b) microesferas.



Fonte: Adaptado de Vasisht, 2014.

As microcápsulas são formadas basicamente por um material de núcleo, que contém um ingrediente ativo podendo este estar na forma

sólida, líquida ou gasosa e outro de revestimento, que cobre ou protege o material do núcleo (DAS et al., 2011).

Diferentes tipos de materiais como produtos farmacêuticos ativos, proteínas, peptídeos, óleos voláteis, materiais alimentares, pigmentos, sabores, fragrâncias, vitaminas, corantes, catalisadores, pesticidas e outros podem ser encapsulados. Polímeros orgânicos, ceras, carboximetilcelulose de sódio, alginato de sódio, gelatina, poliésteres, quitosanas, entre outros podem ser usados como materiais de revestimento (VENKATESAN, MANAVALAN e VALLIAPPAN, 2009; SINGH et al., 2010, DAS et al., 2011).

A escolha do agente encapsulante deve-se basear em alguns critérios como características físicas e químicas do composto ativo a ser encapsulado (solubilidade e porosidade), aplicação pretendida (aditivo alimentar, fármaco, fragrância, pesticida) e método de encapsulação escolhido. O agente encapsulante deve apresentar algumas características como facilidade de manuseio durante o processo, baixa viscosidade em concentrações elevadas, proteger o composto ativo de fatores externos como umidade, luz, pH e não ser reativo (SUAVE et al., 2006).

As microcápsulas têm um tamanho entre 1 e 5000  $\mu\text{m}$ . As cápsulas superiores a 5000  $\mu\text{m}$  podem ser chamadas de macrocápsulas, entre 0,1 e 1  $\mu\text{m}$  são consideradas submicro e aquelas menores do que 0,1  $\mu\text{m}$  são denominadas como nanocápsulas (DAS et al., 2011). As nanocápsulas podem aumentar a solubilidade e estabilidade de compostos bioativos, melhorar a sua absorção, protegê-los contra a degradação prematura no organismo e prolongar o seu tempo de circulação (DUNCAN, 2011).

De acordo com Jyothi et al. (2010), a microencapsulação pode ser feita para proteger substâncias sensíveis do ambiente externo, mascarar as propriedades organolépticas como cor, sabor, odor de substâncias, obter libertação controlada ou ainda obter libertação direcionada do composto. A eficiência do processo de encapsulação depende de vários fatores, como concentração do polímero, solubilidade do polímero no solvente, taxa de remoção do solvente, solubilidade do solvente orgânico na água, entre outros (YEO e PARK, 2004).

Vários fatores devem ser levados em consideração na escolha correta do processo de microencapsulação, como tipo do material de revestimento, tamanho de partícula, concentração do composto ativo na microcápsula, estabilidade e morfologia de partícula e custo de obtenção, sendo que esses parâmetros trarão implicações no tamanho e distribuição

do composto ativo e na eficiência do processo (CARMO et al., 2015; KARIM et al., 2017).

As etapas fundamentais de um método de microencapsulação são a incorporação dos compostos bioativos; formação das gotículas; remoção do solvente; coleta das microcápsulas e secagem (DALMORO et al., 2012). De acordo com Das et al. (2011) os métodos de microencapsulação são divididos em dois grupos básicos, nomeadamente químicos (polimerização) e físicos, sendo esse último dividido em físico-químico (coacervação) e físico-mecânico (*Spray drying* e *Spray cooling*).

As técnicas convencionais de produção de micropartículas apresentam algumas desvantagens como uso excessivo de solvente, degradação térmica e química, altas concentrações de solvente residual e, principalmente, dificuldade em controlar o tamanho das partículas e distribuição de tamanho de partícula durante o processamento (HE et al., 2004). A tecnologia supercrítica apresenta algumas vantagens quando comparada aos demais métodos como alta pureza, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termossensíveis, processo de um único estágio e tecnologia mais limpa (FAGES et al., 2004).

#### 1.3.4.1 Formação de micro e nanopartículas empregando fluido supercrítico

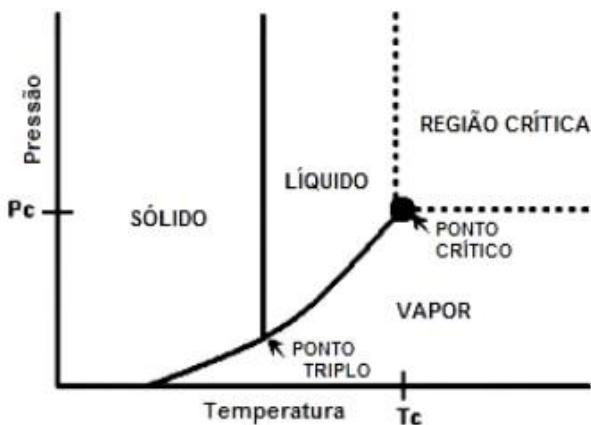
Os métodos de encapsulação supercrítica mostram-se competitivos frente aos métodos convencionais, devido a características como pressão e temperatura críticas moderadas, possibilitando a obtenção de partículas em condições mais amenas. O ponto crítico representa a temperatura e pressão mais alta que a substância pode existir em equilíbrio líquido-vapor (Figura 1.2).

O CO<sub>2</sub>, principal fluido supercrítico utilizado, possui baixa toxicidade, é quimicamente inerte, não é inflamável, é barato, apresenta possibilidade de ser reutilizado no processo e possui condições supercríticas relativamente brandas (temperatura crítica (T<sub>c</sub>) 31,1 °C e pressão crítica (P<sub>c</sub>) 73,8 bar (MORANDI et al., 2013).

Além do mais, sua separação das micropartículas dá-se por uma simples despressurização, sendo esse processo considerado limpo por não apresentar resquícios de solvente. Durante esse processo, o polímero permanece sobre determinado tempo na presença do CO<sub>2</sub>, capaz de induzir o inchaço do polímero, promovendo uma melhora na taxa de difusão, facilitando a entrada de material na partícula, e, após impregnação, o CO<sub>2</sub> é despressurizado e as partículas voltam ao seu

tamanho inicial, aprisionando o composto ativo em seu interior (GOODSHIP e OGUR, 2004).

Figura 1.2 - Diagrama de fases para uma substância pura.



Fonte: Adaptado de VON MÜHLEN e LANÇAS, 2004.

Originalmente, os processos com fluidos supercríticos foram desenvolvidos para a produção de compostos sólidos, porém, com algumas modificações pode-se obter compósitos sólido-líquidos, como microcápsulas carregadas com óleo essencial ou extratos (MARTÍN et al., 2010). A alta difusividade combinada com sua baixa viscosidade dá ao fluido supercrítico melhores características de transferência de massa se comparado com solventes líquidos convencionais. Ainda sua baixa tensão superficial evita o colapso dos poros, que pode ocorrer quando certos materiais nanoestruturados são colocados em contato com solventes líquidos (MARTÍN e COCERO 2010; BOZBAG e ERKEY, 2012).

Os processos com fluidos supercríticos podem ser divididos em três categorias, sendo que a maioria emprega  $\text{CO}_2$  como fluido pressurizado, seja como solvente (RESS), soluto (PGSS) ou antissolvente (SFEE, GAS, SAS, PCA, ASES e SEDS) (SILVA e MEIRELES, 2014).

#### 1.3.4.2 SEDS - *Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid*

Na técnica SEDS (*Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid*) – no português, Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos, a solução líquida contendo o soluto, o solvente

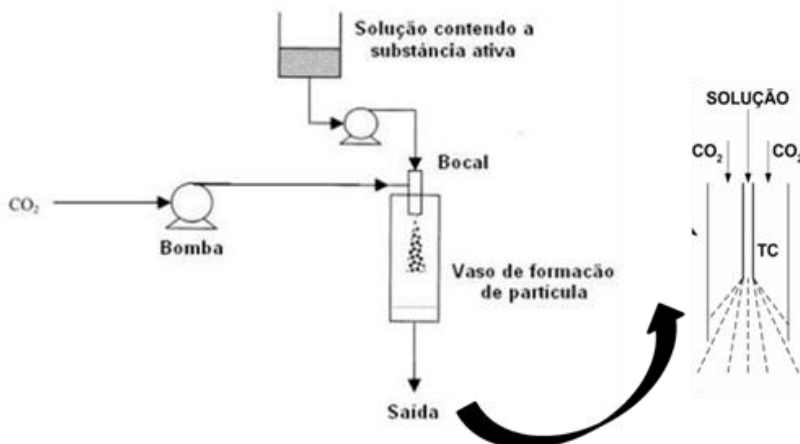
orgânico e o fluido supercrítico são pulverizados em conjunto pelo injetor coaxial, o que promove melhora na transferência de massa e liberação simultânea da mistura. O fluido supercrítico é utilizado tanto como antissolvente como meio de dispersão para a solução (SILVA e MEIRELES, 2014).

Para que tal processo ocorra faz-se necessário que o soluto de interesse seja muito solúvel no solvente orgânico e insolúvel ou pouco solúvel no antissolvente e, ainda, que o solvente orgânico possua maior afinidade pelo antissolvente do que pelo soluto. Assim, quando a solução contendo o soluto entra em contato com o antissolvente, a solubilidade do soluto no solvente orgânico é reduzida significativamente, devido ao antissolvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico, levando a precipitação do soluto sob a forma particulada. Ocorre uma transferência de massa simultânea no sistema: a rápida difusão do fluido supercrítico na solução líquida e do solvente na fase supercrítica (COCERO et al, 2009).

Esta técnica envolve a aplicação da solução orgânica em CO<sub>2</sub> supercrítico para precipitar o soluto. O CO<sub>2</sub> é liquefeito por meio do sistema de arrefecimento e em seguida bombeado para dentro do vaso de precipitação por meio do duto externo do bico coaxial. A pressão do vaso é regulada e quando a taxa de fluxo de CO<sub>2</sub> supercrítico atinge os valores desejados, a solução do composto é liberada para câmara de precipitação por meio do duto interno do bico coaxial (KANG et al., 2008; TABERNERO, DEL VALLE e GALÁN, 2012). Um desenho esquemático da técnica de SEDS pode ser observado na Figura 1.3.

É importante considerar também o agente encapsulante ou material de revestimento das partículas no processo de encapsulamento por SEDS, pois ele é responsável por proporcionar proteção e permitir uma liberação controlada do composto. Entre as principais características desses materiais para aplicação no processo, é interessante verificar se este apresenta biocompatibilidade, ausência de toxicidade, e capacidade de preservar as propriedades do composto encapsulado, ser de fácil precipitação para o tipo de processo escolhido, ser biodegradável, formar soluções de baixa viscosidade e ser de baixo custo (COCERO et al., 2009).

Figura 1.3 - Diagrama esquemático da técnica SEDS.



Fonte: Adaptado de Aguiar, 2017.

Entre os agentes encapsulantes empregados no processo SEDS podemos destacar o poli (hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) ( $177.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). É um poliéster termoplástico de origem bacteriana que possui estrutura química semelhante à de polímeros sintéticos convencionais, sendo biodegradável e biocompatível. De acordo com Baroutti, Jaffredo e Guillaume (2017), esse polímero, juntamente com outros derivados de poli (3-hidroxibutirato) (PHB) despertam interesse em aplicações medicinais, principalmente para sistemas de entrega de fármacos nanoparticulados.

A técnica SEDS já foi empregada por Boschetto et al. (2013) para encapsulamento do extrato de sementes de uva, empregando CO<sub>2</sub> supercrítico como antissolvente e PHBV como agente encapsulante. No estudo, foram avaliados os parâmetros pressão, temperatura e relação de massa de extrato e PHBV, resultando em melhor eficiência de encapsulamento e tamanho de partículas para a pressão de 8 MPa, temperatura de 35 °C e relação de massa 1:1, sendo estes valores de pressão e temperatura os menores avaliados; o que demonstra que a técnica traz bons resultados para condições de pressão e temperatura não tão elevadas, o que a torna interessante em relação a custo energético e também degradação de compostos bioativos do extrato por aplicação de elevadas temperaturas e pressões.

A técnica SEDS também pode ser utilizada para o processo de micronização, que consiste em reduzir o tamanho das partículas de uma

substância ou materiais para aproximadamente 10 µm ou a valores mais baixos (CHAU, WANG e WEN, 2007; FAHIM et. al, 2014). Esta técnica foi aplicada para micronização do trans-resveratrol por Aguiar e seus colaboradores (2016), com redução no tamanho das partículas de 36,65 para 0,22 µm nas condições de operação de 8 MPa e 35 °C. Após a micronização, os autores relatam que a solubilidade do fármaco aumentou em 2,8 vezes em água, além do aumento da atividade antioxidante *in vitro* em relação ao composto não micronizado.

### 1.3.5 Considerações a respeito do estado da arte

O interesse e a utilização de plantas medicinais pelo homem e o reconhecimento das suas propriedades químicas certamente estão relacionados com a própria sobrevivência da espécie humana. A presença (e concentração) de metabólitos secundários nas plantas é o que desperta interesse quando se trata de ações farmacológicas, visando identificar compostos bioativos (fitoquímicos) para o tratamento de doenças. Muitos dos medicamentos utilizados atualmente para uma grande variedade de doenças foram originalmente isolados de plantas ou são análogos semi-sintéticos de fitoquímicos. Estima-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos prescritos atualmente são de origem vegetal. Além disso, em torno de 75% dos novos medicamentos anticancerígenos comercializados entre 1981 e 2014 foram derivados de compostos de plantas (NEWMAN e CRAGG; 2016).

Apesar da intensa investigação da flora terrestre, estima-se que apenas 6% das aproximadamente 300 mil espécies de plantas superiores foram investigadas farmacologicamente e apenas aproximadamente 15% fitoquimicamente (CRAGG, NEWMAN E KINGSTON; 2010).

No presente trabalho, uma planta endêmica da América do Sul, *P. bipinnatifidum*, utilizada na medicina popular principalmente para o tratamento de inflamações, foi objeto de estudo, a partir da avaliação de atividades biológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória. Fato importante a se considerar é que há escassez de estudos científicos com essa planta, confirmando ou não as atividades biológicas relatadas na medicina popular, principalmente as atividades relacionadas à dor e inflamação, as quais não apresentam dados reportados na literatura, e que podem ser avaliadas em testes *in vivo*, em modelos que utilizam diferentes estímulos em camundongos.

Os principais obstáculos associados ao uso de extratos de plantas para aplicações clínicas incluem a composição complexa, os riscos de toxicidade e a instabilidade do extrato. Observa-se que o encapsulamento



pode ser usado com sucesso para diminuir a toxicidade de extratos vegetais e resolver problemas relacionados à estabilidade (ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN et al., 2016).

Diversas técnicas de encapsulamento podem ser aplicadas aos extratos, sendo algumas mais convencionais e outras mais recentes. Neste último grupo temos o processo de encapsulação através da tecnologia com fluidos supercríticos, com algumas vantagens, como a formação de microcápsulas livre de solventes orgânicos e baixa temperatura de processamento (SILVA e MEIRELES, 2014).

Como já mencionado anteriormente, a literatura científica mostra escassez de estudos sobre *P. bipinnatifidum*, e não foram encontrados relatos sobre seu encapsulamento, principalmente com técnicas envolvendo fluidos supercríticos, ressaltando a importância do presente trabalho, considerando que o encapsulamento pode ser usado para melhorar a estabilidade e a concentração de compostos bioativos presentes nos extratos vegetais.

#### 1.4 Referências

AGUIAR, G.P.S.; BOSCHETTO, D.L.; CHAVES, L.M.P.C; ARCARI, B.D.; PIATO, A.L.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 350–355, 2016.

AGUIAR, G. P. S. Micronização de N-acetilcisteína e trans-resveratrol pela técnica da dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos (SEDS) e avaliação das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2017.

ARMENDÁRIZ-BARRAGÁN, B.; ZAFAR, N.; BADRI, W.; GALINDO-RODRÍGUEZ, S.A.; KABBAJ, D.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Plant extracts: from encapsulation to application. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, p. 1165-75, 2016.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜLLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 360438, 2014.

BAROUTTI, G.; JAFFREDO, C.G.; GUILLAUME, S.M. Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 73, p. 1-31, 2017.

BOSCHETTO, D. L., DALMOLIN, I., CESARO, A. M., RIGO, A. A., FERREIRA, S. R. S., MEIRELES M. A. A., BATISTA, E. A. C., OLIVEIRA, J V. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 352–360, 2013.

BOZBAG, S.E.; ERKEY, C. Review - Supercritical fluids in fuel cell research and development. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 62, p. 1-31, 2012.

CARMO, E. L., FERNANDES, R. V. B., BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. *Journal of Chemical Engineering and Chemistry*, Vol. 01, nº 02, p. 030–044, 2015.

CAZACU, I., MOGOSAN, C., LOGHIN, F. Safety issues of current analgesics: an update. **Clujul Medical**, v. 88, p. 128-136, 2015.

CHAU, C.F.; WANG, Y.T.; WEN, Y.L. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1402–1408, 2007.

COCERO, M.J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546-555, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J; KINGSTON, D.G.I. **Terrestrial Plants as a Source of Novel Pharmaceutical Agents**. In: MANDER, L. e LIU, H. (Eds.). *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Elsevier: Oxford, 2010, v. 3 p. 5-39, 2010.

DALMORO, A., BARBA, A. A., LAMBERTI, G., D'AMORE, M. Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 471-477, 2012.

DAS, S. K., DAVID, S. R. N., RAJABALAYA, R., MUKHOPADHYAY, H.K., HALDER, T., PALANISAMY, M., KHANAM, J. Microencapsulation techniques and its practice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, p. 1-23, 2011.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 1–24, 2011.

EL-DEEB, A.; ABDEL-ALEEM, I.M.; EL-AMIN, S.M.; REFAHY, L.A.; EL-SHAZLY, M.A. Antiproliferative effect of phenolic glucosides isolated from *Philodendron* on HepG2 cells. **Phytopharmacology**, v. 3, p. 351-358, 2012.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 2013.

FAHIM, T.K.; ZAIDUL, I.S.M.; ABU BAKAR, M.R.; SALIM, U.M., AWANG, M.; SAHENA, F.; JALAL, K.C.A.; SHARIF, K.M.; SOHRAB, M.H. Particle formation and micronization using non-conventional techniques-review. **Chemical Engineering Process: Process Intensification**, v. 86, p. 47-52, 2014.

FAGES, J., LOCHARD, H., LETOURNEAU, J., SAUCEAU, M., RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, p. 219 – 226, 2004.

FEHRENBACHER, J.C., VASKO, M.R., DUARTE, D.B. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 5, 2012.

FERDOUS, M.; ROUF, R. SHILPI, J.A.; UDDIN, S.J. Antinociceptive activity of the ethanolic extract of *Ficus racemosa* Lin. (Moraceae). **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 8, p. 93–96, 2008.

FRIJHOFF, J.; WINYARD, P.G.; ZARKOVIC, N., DAVIES, S.S. et al. **Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress, Antioxidant Redox Signal**, v. 23, p. 1144-1170, 2015.

GOODSHIP, V.; OGUR, E.O. Polymer Processing with Supercritical Fluids. **Rapra Review Reports**. v. 15, n. 8, 2004. 141 p.

HE, W. Z.; SUO, Q. L.; JIANG, Z. H.; SHAN, A.; HONG, H. L. Precipitation of ephedrine by SEDS process using a specially designed prefilming atomizer. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 31, p.101-110, 2004.

HERBERT, R.B. **The Biosynthesis of Secondary Metabolites**. New York: Chapman and Hall. 2012. 177 pp.

JANKOWSKI, L.S.; BAZZANO, D.; SÁENZ, A.; TOURN, M.; ROITMAN, G. Plantas trepadoras. Nativas y exóticas. In: LAHITTE, H.B. & HURRELL, I.A. (eds.). *Biota Rioplatense*. Buenos Aires: Editorial L.O.L.A., 2000. v. 5. 264 p.

JYOTHI, N. V. N., PRASANNA, P. M., SAKARKAR, S. N., PRABHA, K. S., RAMAIAH, P. S., SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, p. 187–197, 2010.

KANG, Y.; YIN, G.; OUYANG, P.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 322, p. 87-94, 2008.

KARIM, F. T., GHAFOOR, K., FERDOSH, S., AL-JUHAIMI, F., ALI, E., YUNUS, K. B., HAMED, M. H., ISLAM, A., ASIF, M., SARKER, M. Z. I. Microencapsulation of fish oil using supercritical antisolvent process. **Journal of Food and Drug Analysis**, XXX, p. 1-13, 2017.

KOSTER, R.; ADERSON, M. deBEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**. v. 18, p. 412, 1959.

LAPA, A.J. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5.ed. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2007. 119 p.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, p. 118-126, 2010.

LOWE, F. Biomarkers of Oxidative Stress. In: LAHER, I. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer, p. 65-87, 2014.

MARCHIORF, J.N.C.; GOMES, A.V. Nota anatômica sobre o caule do guaimbé, *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl. **Balduinia**, n. 19, p. 31-34, 2009.

MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 339-350, 2008.

MARTÍN, A.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M.J. Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 31-41, 2010.

MATAIX, J.; QUILLES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MAÑAS M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 511–521, 1998.

MENDIOLA, J.A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 234 – 246, 2007.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398–400, 2004.

MEZZOMO, N.; OLIVEIRA, D.A.; COMIM, S.R.R.; FERREIRA, S.R.S. Encapsulation of extract from winery industry residue using the

supercritical anti-solvent technique. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 589-598, 2016.

MORANDI, B.; AWANG, M.; SABI, K.M.; SHOUSHARI, M.A.; MORADI, P.; AJDARI, H.; SHUKER, M.T. Liquid Carbon Dioxide Flooding in Low Temperature Oil Reservoirs. Society of Petroleum Engineers, **SPE Asia Pacific Oil and Gas Conference and Exhibition**, Jakarta, Indonesia, 2013.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J.J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.A.; ESCARIO, J.Á.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.R.; GÓMEZ-BARRIO, A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas aginalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p.101–107, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32658/> doi: 10.17226/12526

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

OGONOWSKI, A.A.; MAY, S.W.; MOORE, A.B.; BARRETT, L.T.; O'BRYANT, C.L.; POLLOCK, S.H. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 846-853, 1997.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**. v. 5: e47, 2016.

ROCHA, M.; BANULS, C.; BELLOD, L.; JOVER, A.; VICTOR, V.M.; HERNANDEZ-MIJARES, A. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 4061-75, 2011.

ROSLAND, J.H. TJØLSEN A, MAEHLE B, HOLE K. The formalin test in mice: Effect of the formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. v. 31, p. 381-389, 1997.

SHETH, P.; SANDHU, H.; SINGHAL ,D.; MALICK, W.; SHAH, N.; KISLALIOGLU, M.S. Nanoparticles in the pharmaceutical industry and the use of supercritical fluid technologies for nanoparticle production. **Current Drug Delivery**, v. 9, p. 269-284, 2012.

SILVA, C.R., FRÖHLICH, J.K., OLIVEIRA, S.M., CABREIRA, T.N., ROSSATO, M.F., TREVISAN, G., FROEDER, A.L., BOCHI, G. V., MORESCO, R.N., ATHAYDE, M.L., FERREIRA, J. The antinociceptive and anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellei* in a rat gout model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 205–213, 2012.

SILVA, E. K., MEIRELES, M. A. M. Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. **Food and Public Health**, v. 4, p. 247-258, 2014.

SINGH, M.N.; HEMANT, K.S.Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H.G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 65-77, 2010.

SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, p. 12-20, 2006.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E.M.M.; GALÁN, M.A. Precipitation of tretinoin and acetaminophen with solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). Role of phase equilibria to optimize particle diameter. **Powder Technology**. v.217, p.177-188, 2012.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

UD-DAULA, A.F.M.; DEMIRCI, F.; SALIMA, K.A.; DERMICI, B.; LIMC, L.B.L.; BASER, K.H.C.; AHMAD, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etilingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M.Sm. **Industrial Crops and Products**, v. 84 p. 189–198, 2016.

VAN WYK, B.E.; WINK, C.; WINK, M. Handbuch der Arzneipflanzen. 3rd ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; Stuttgart, Germany: 2015.

VASISHT, N. Factors and Mechanisms in Microencapsulation. In: GAONKAR, A., NIRAJ, V., KHARE, A., SOBEL, R. (Eds). **Microencapsulation in the food industry: A Practical Implementation Guide**. Elsevier, 2014, p. 15-56.

VENKATESAN, P. MANAVALAN, R., VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.1, p. 26-35, 2009.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105-113, 2015.

VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, F.M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747 – 753, 2004.

WAGSTAFF, D.J. International Poisonous Plants Checklist: An Evidence-Based Reference. New York: CRC Press, 2008, 458 p.

WINK, M. Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions os Secondary Metabolites. p. 1-9. In: WINK, M. (Ed.). **Biochemistry of plant secondary metabolism**. Annual plant reviews; v. 40. 2. ed. Wiley-Blacwell, 2010.



WINK, M. Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of. Reference Module in Life Sciences. **Encyclopedia of Evolutionary Biology**. p. 1-9, 2016.

YEO, Y., PARK, K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 1-12, 2004.



## CAPÍTULO 2

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1.1 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

As coletas do material vegetal foram realizadas durante todo o período de execução dos experimentos (fevereiro de 2016 a julho de 2017) visando à utilização imediata para elaboração dos extratos. Um único exemplar de *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl foi utilizado (Figura 2.1), o qual está localizado no município de Chapecó, Santa Catarina, Brasil (27°05'34,8''S; 52°39'57,9''O). A identificação e confirmação da espécie vegetal foram realizadas pelo professor Adriano Dias de Oliveira, doutor em Botânica, no Herbário da Universidade Comunitária da Região de Chapecó, com exsicata cadastrada pelo código de acesso UNO 3470.

Figura 2.1 – Foto ilustrativa do exemplar de *Philodendron bipinnatifidum* utilizado para coleta.



Fonte: Autor.

Os talos coletados foram imediatamente processados, com remoção das folhas, corte dos talos, e secagem em estufa a 40 °C durante 48 h. Os talos e as folhas foram triturados separadamente em um liquidificador industrial, a fim de otimizar o processo de extração, reduzindo os efeitos difusionais. O material vegetal obtido foi submetido à maceração com álcool etílico PA, na proporção de 1:20 grama de material vegetal por litro de solvente, durante dois dias e homogeneizados em intervalos de 12 horas, a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). O macerado passou por uma filtração e posterior concentração em um rotaevaporador sob pressão reduzida, e então foi congelado e liofilizado, originando o extrato etanólico bruto (talos e folhas, separadamente). O mesmo procedimento foi realizado com os solventes acetato de etila PA e éter de petróleo PA, separadamente, apenas para os talos.

### 2.1.2 Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos dos talos de *P. bipinnatifidum* obtidos com o solvente etanol e acetato de etila foram submetidos a essa análise, que foi realizada com um sistema CLAE Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT ligadas a um degaseificador DGU 20A5 com um CBM 20A Integrador, detector de matriz de diodo SPD-M20A e software de solução LC 1.22 SP1.

Os extratos foram injetados em uma coluna Phenomenex C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm), empacotada com partículas de 5 µm de diâmetro. As fases móveis A e B foram água Milli-Q, acidificada a pH 2,0 com 1% de ácido fórmico e metanol, com gradiente de solvente: 0-10 min, 5% B; 10-25 min, 15% de B; 25-40 min, 30%; 40-55 min 50% B; 50-65 min 70% B; 65-80 min, 100% B, seguindo o método descrito por Waczuk et al. (2015), com ligeiras modificações, de acordo com Boligon et al. (2015). A amostra e a fase móvel foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e depois degaseificadas por banho de ultrassom antes da utilização. Foram preparadas soluções padrões em metanol:água (1:1 v/v) numa gama de concentração de 0,030 a 0,500 mg.mL<sup>-1</sup>. As quantificações foram realizadas pela integração dos picos utilizando o método de padrão externo, a 270 nm para o ácido gálico; 325 nm para ácido cafeico e ácido clorogênico; 366 nm para quercetina, rutina, luteolina e apigenina. Os picos de cromatografia foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência. As equações das curvas de calibração para os compostos foram: ácido gálico:  $y = 11957x + 1308,1$  ( $r = 0,9997$ ); Ácido cafeico:  $y$

=  $13259x + 1164,5$  ( $r = 0,9999$ ); Apigenina:  $y = 14386x + 1247,0$  ( $r = 0,9996$ ); Ácido clorogênico:  $y = 10985x + 1274,3$  ( $r = 0,9998$ ), Quercetina:  $y = 12763x + 1405,9$  ( $r = 0,9999$ ); Rutina:  $y = 10863x + 1354,7$  ( $r = 0,9997$ ) e Luteolina:  $y = 13462x + 1184,9$  ( $r = 0,9994$ ), onde  $y$  corresponde a área do pico obtida no cromatograma e  $x$  a concentração do composto. Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata. Todas as substâncias químicas utilizadas são de grau analítico. As diferenças entre os resultados foram avaliadas através da análise de variância, com pós-teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi ajustado para  $P < 0,05$ .

### **2.1.3 Análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (GC/MS)**

A investigação fitoquímica dos extratos das folhas e dos talos (etanol, acetato de etila e éter de petróleo) foi realizada em um equipamento GC/MS Agilent (7890B) acoplado a um espectrômetro de massas quadripolar (5977A) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). As condições experimentais do sistema GC-MS foram as seguintes: Coluna capilar Agilent19091S, dimensão: 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ . O fluxo da fase móvel (gás carreador: He) foi ajustada em 1,2  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . O programa de temperatura GC foi de 85,0  $^{\circ}\text{C}$  - durante 4,0 minutos - até 290,0  $^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de 40  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (mantido durante 1,0 min) e até 300,0  $^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de 5,0  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (mantido durante 15 min). A temperatura do injetor foi de 280,0  $^{\circ}\text{C}$ . O espectrômetro de massas foi operado em modo selecionado de monitoração iônica (SIM) usando ionização por impacto de elétrons (70 eV) na faixa de 50-500  $\text{m}\cdot\text{z}^{-1}$ . A temperatura da linha de transferência de MS foi configurada para 150,0  $^{\circ}\text{C}$  e a temperatura da fonte de íons foi configurada a 230,0  $^{\circ}\text{C}$ . Os componentes químicos presentes nos extratos foram identificados por comparação com a biblioteca do equipamento (The National Institute of Standards and Technology, 2004). As quantidades relativas de cada componente individual foram calculadas usando suas respectivas áreas de pico no cromatograma.

Para análise, os extratos foram solubilizados em diclorometano, enquanto as partículas (encapsuladas pela técnica SEDS, ver item 2.1.10) foram submetidas a um passo adicional para remoção do polímero, pela adição de 0,3 ml de metanol (que provocou a precipitação do PHBV) e 0,7 ml de diclorometano à solução e posterior centrifugação a 15.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então removido e analisado. As

quantidades relativas de cada componente individual foram calculadas usando suas respectivas áreas de pico no cromatograma. Para a quantificação do  $\beta$ -sitosterol, as curvas de calibração foram preparadas por diluições seriadas na faixa de concentração de 0,35 a 1,75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As quantificações foram realizadas integrando a área do pico composto. A equação da curva de calibração foi obtida:  $y = 58.212.297,15x - 2.382.298,65$  ( $R^2 = 0,9968$ ).

## 2.1.4 Análises de atividade antioxidante

### 2.1.4.1 Ensaio FRAP

O ensaio do poder antioxidante por redutor férrico (FRAP) foi realizado conforme descrito por Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. Diferentes diluições de extratos dos talos de *P. bipinnatifidum* (etanol e acetato de etila), de 2,5 a 160  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram incubadas com a solução de trabalho TPTZ: 2,4,6-Tripiridil-s-Triazina 10 mM,  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM e tampão acetato 0,3 M, a 37 °C por 30 min. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico, conhecido pela sua elevada atividade antioxidante (BARRITA e SÁNCHEZ, 2013). O aumento da absorbância resultante da formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ foi registrado a 595 nm. Uma curva de calibração de  $\text{FeSO}_4$  a 595 nm foi construída. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{molFe}^{2+}\cdot\text{ml}$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata. As diferenças entre os resultados foram avaliadas através da análise de variância, com pós-teste de Tukey, com nível de significância  $P < 0,05$ .

### 2.1.4.2 Ensaio DPPH

O ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) foi realizado de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Para determinar a atividade antioxidante dos extratos dos talos (etanol e acetato de etila), uma solução de 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foi preparada dissolvendo-se 24 mg em 100 mL de clorofórmio. A solução obtida é então diluída a fim de obter absorbância de  $1,1 \pm 0,02$  em 517 nm. Uma alíquota de 1,9 mL dessa solução foi transferida para 50 mL de clorofórmio contendo determinada concentração da amostra que se deseja medir a atividade antioxidante. Para os extratos de *P. bipinnatifidum* as concentrações avaliadas foram 10, 20, 40, 80 e 160  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O ensaio também foi realizado com o composto ácido ascórbico, conhecido pela sua elevada atividade

antioxidante (BARRITA e SÁNCHEZ, 2013). O controle foi preparado pela adição de 1,9 mL da solução de DPPH e 50 mL de clorofórmio. Todas as amostras foram incubadas durante 120 minutos, na ausência de luz, à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm. As diferenças entre os resultados foram avaliadas através da análise de variância, com pós-teste de Tukey. O nível de significância para as análises foi ajustado para  $P < 0,05$ .

O percentual de inibição das amostras testadas sobre os radicais DPPH foi calculado, convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a seguinte equação:

$$AA = \frac{(A_C - A_{AM}) \times 100}{A_C} \quad (1)$$

Onde  $A_{AM}$  é a absorvância da amostra e  $A_C$  é a absorvância da solução controle.

O valor do  $EC_{50}$ , definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical livre DPPH, num determinado intervalo de tempo, foi determinado pela curva da concentração *versus* atividade antioxidante por análise de regressão não linear.

### 2.1.5 Análise de açúcares totais

O método fenol-sulfúrico foi utilizado para a análise de açúcares totais de acordo com Dubois et al. (1956). As soluções padrão de glicose para curva de calibração foram 1,0; 0,80; 0,60; 0,40; 0,20; 0,10 e 0,05 g·L<sup>-1</sup>. Nos tubos foram pipetados para 50 µL da solução padrão ou amostra (extrato dos talos etanólico e acetato de etila), 0,45 mL de água, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Depois de arrefecidas as soluções, a leitura da absorvância foi realizada a 490 nm. A mudança de cor é proporcional à quantidade de açúcar presente na amostra, sendo o resultado expresso em mg de glicose equivalente por 100 g de amostra.

### 2.1.6 Atividade antimicrobiana de extratos dos talos de *P. bipinnatifidum*

A atividade antimicrobiana dos extratos dos talos (etanol e acetato de etila) foi avaliada por dois métodos: difusão em placas e determinação

da concentração inibitória mínima. Os microrganismos avaliados foram *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* (bactérias Gram-positivas) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa), segundo metodologias descritas anteriormente por NCCLS (2003).

Para o preparo do inóculo foram selecionadas 2 a 4 colônias bacterianas e transferidas para uma solução salina estéril 0,9%. A turbidez da solução foi ajustada por comparação com a escala 0,5 de McFarland, obtendo-se o equivalente a concentração de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células por mL. Na técnica de difusão em placas, os microrganismos de interesse foram semeados nas placas com meio de cultura *Plate Count Ágar* (PCA) com o auxílio de um *swab*. Foram feitos três orifícios equidistantes em cada placa, com diâmetro de aproximadamente 0,8 cm, sendo depositado nestes o extrato na concentração de  $0,40 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Incubou-se a  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Posteriormente, avaliou-se a formação de um halo de inibição de crescimento microbiano, e quando verificado, as medidas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro.

Para os extratos que apresentaram a formação do halo de inibição, realizou-se a técnica de CIM, utilizando concentrações seriadas de extrato, partindo da concentração de 10,00 até  $0,05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em "U". A cada poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de caldo de infusão de coração e cérebro (BHI) e 100  $\mu\text{L}$  de extrato, juntamente com 5  $\mu\text{L}$  de solução contendo o microrganismo. Para os testes de controle, os poços de controle positivo foram preenchidos com 100  $\mu\text{L}$  de BHI e 5  $\mu\text{L}$  de microrganismos, os poços de controle negativo com 100  $\mu\text{L}$  de BHI e 100  $\mu\text{L}$  de TWEEN 0,5%, e 5  $\mu\text{L}$  de microrganismos. Também se realizou um teste em branco, que consistiu apenas em 100  $\mu\text{L}$  de BHI.

As microplacas foram incubadas a  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 h. Após este tempo, foi adicionado a cada poço 20  $\mu\text{L}$  de TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio), um agente que promove a coloração das células microbianas, possibilitando a visualização do crescimento bacteriano. As microplacas foram devolvidas à incubadora bacteriológica por mais 4 horas, depois foram levadas para leitura. Para avaliar a concentração bactericida mínima (CBM), para cada tubo de teste em que o crescimento microbiano não foi identificado, o inóculo foi então colocado em placas de Petri com Agar Mueller-Hinton como meio de cultura, para confirmar qual a menor concentração que causou a morte dos microrganismos.



### 2.1.7 Análises de dissacaridases intestinais

Para este teste, apenas o extrato obtido através do solvente acetato de etila foi utilizado, devido os melhores resultados obtidos nos testes de antioxidante. Foram utilizadas as seguintes concentrações de extrato: 250, 500 e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Um teste com o fármaco padrão acarbose a 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi usado como controle.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Unochapecó (CEUA Número 004/2017). Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 160 e 200 g (50 a 55 dias de idade) do Centro de Bioterismo da Unochapecó. Após a eutanásia, um segmento do intestino delgado foi removido, lavado em solução de NaCl a 0,9%, seco em papel de filtro, pesado e homogeneizado (300 rpm) com NaCl a 0,9% (400 mg duodeno por ml) por 1 min a 4 °C. A amostra resultante foi centrifugada a 8000 rpm por 8 min. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração da atividade da sacarase, lactase e maltase e determinação da proteína (PEREIRA et al., 2011). As atividades de maltase, lactase e sacarase foram determinadas utilizando um kit de diagnóstico de glicose baseado no reagente glicose oxidase. Para análise, incubaram-se 10  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a 37 °C durante 60 minutos em tampão de maleato (pH 6,0) contendo sacarose, lactose ou maltose e o extrato.

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por min sob as condições do ensaio. A atividade específica foi definida como atividade enzimática (U) por mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e realizados juntamente com controles apropriados.

### 2.1.8 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato de *P. bipinnatifidum*

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unochapecó e aprovado em 25/07/2017 sob o número de protocolo 007/17.

Para execução do experimento foram utilizados camundongos *Swiss* machos com idade de 6 semanas (pesando entre 35-40 g), obtidos do Centro de Bioterismo da Unochapecó. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno nas dimensões de 28 x 12,5 x 19 cm em grupos de 4 a 6 animais por gaiola, alimentados com ração

comercial Biotec (Biobase) e água à vontade, em sala climatizada (22-24 °C) com ciclo claro/escuro de 12:12 horas e umidade do ar entre 40-60%. Os animais que receberam o tratamento por via oral passaram por um período de 2 horas de jejum antes da administração do mesmo.

A manipulação animal foi realizada segundo os princípios éticos relatados pelas normas do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS, 1985), Resolução 714 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV (2002) e a Lei nº 11794 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008). Imediatamente após a finalização dos experimentos, os animais foram submetidos isoladamente à eutanásia pela inalação do anestésico isoflurano seguida da confirmação por um método físico (deslocamento cervical), ou por exsanguinação (punção cardíaca) após anestesia geral, conforme protocolo específico de cada experimento, seguindo as diretrizes do CONCEA (2013).

Os camundongos foram tratados com volumes de acordo com seu peso, sendo  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , por via oral (v.o.) por gavagem, ou intraperitoneal (i.p.), conforme protocolo específico de cada experimento. A solubilização do extrato e das substâncias foi realizada em solução salina (NaCl 0,9%) com auxílio de polissorbato 80. Para estes testes, apenas o extrato dos talos obtido através do solvente acetato de etila foi utilizado, devido aos melhores resultados de atividade antioxidante e perfil químico.

#### 2.1.8.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Neste modelo, foram induzidas contorções abdominais de acordo com procedimento descrito por Koster et al. (1959) e Santos et al. (1999), onde contrações da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, ocorrem em resposta à injeção intraperitoneal de ácido acético a 0,6% ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) diluído em solução salina. Os camundongos receberam administração por via oral do extrato uma hora antes da exposição ao ácido acético por via i.p. Imediatamente após a administração de ácido acético, as contorções abdominais foram quantificadas durante 20 minutos. Um espelho foi colocado atrás da câmara de observação (que consistiu em béqueres de vidro de 2000 mL comuns limpos e secos).

Foram utilizados de seis a oito animais por grupo experimental, sendo grupo 1: extrato  $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  v.o. e ácido acético i.p.; grupo 2: extrato  $375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  v.o. e ácido acético i.p.; grupo 3: extrato  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  v.o. e ácido acético i.p. Para controle positivo foi ministrado

indometacina  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  v.o. e ácido acético i.p., e controle negativo apenas veículo (NaCl a 0,9%) v.o. e ácido acético i.p.

### 2.1.8.2 Teste da formalina

O modelo experimental de formalina permite avaliar dois processos: a estimulação direta das fibras nociceptivas em um primeiro momento e a reação do tipo inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) em um segundo momento (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992). A metodologia utilizada foi essencialmente baseada naquela descrita por Santos e Calixto (1997).

Neste teste, a indução da inflamação é dada pela administração intraplantar (i.pl.) de  $50 \mu\text{L}$  de solução de formol a 1% na região dorsal da pata posterior direita dos camundongos. Estes receberam a administração por via oral do extrato uma hora antes da exposição à formalina. Os camundongos foram observados logo após a administração da formalina durante 30 minutos. Um espelho foi colocado atrás da câmara de observação (béqueres de 2000 mL) para facilitar a verificação das elevações da pata quando o animal está com a pata fora do campo do observador. O número de elevações da pata foi quantificado de 0 a 5 minutos, e posteriormente de 15 a 30 minutos. Considera-se como comportamento de elevação da pata todo movimento não associado à locomoção, variando desde uma elevação discreta ou contração da musculatura da coxa do animal até movimento mais vigoroso ou lambedura e mordedura da pata.

Foram utilizados de seis a oito animais por grupo experimental, sendo o grupo extrato a  $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  v.o. e formalina i.pl., e, para controle positivo indometacina  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  v.o. e formalina i.pl., e controle negativo veículo (NaCl a 0,9%,) v.o. e formalina i.pl.

### 2.1.8.3 Envolvimento do receptor opióide na atividade antinociceptiva

Para examinar o possível papel do sistema opioide no efeito antinociceptivo do extrato, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (um antagonista não seletivo do receptor opióide; a  $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i.p.) ou veículo (NaCl a 0,9%,  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p.) como descrito por Trevisan et al. (2013). Após 15 min, os animais foram tratados com extrato a  $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  p.o. ou veículo (NaCl a 0,9%, Tween 80 a 1%,  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , p.o.). A nocicepção espontânea foi avaliada imediatamente após

a injeção intraplantar de formalina e o teste foi realizado 1 hora após o tratamento oral.

#### 2.1.8.4 Teste da carragenina

Neste modelo, os camundongos receberam injeção intradérmica de carragenina (300 µg de carragenina dissolvida em 0,1 mL de solução salina) na pata posterior direita (CAMPOS e CALIXTO, 1995). As patas que receberam a injeção de carragenina foram medidas com um paquímetro 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0 e 8,0 horas após a administração. Decorridos 3 h após a injeção, os animais foram eutanasiados por exsanguinação, as patas injetadas foram removidas, o tecido plantar inflamado foi retirado e submetido a análises de estresse oxidativo. Uma hora antes da administração de carragenina, os animais foram tratados com o extrato, sendo o grupo extrato a 500 mg·kg<sup>-1</sup> v.o. e carragenina i.pl. Para controle positivo foi ministrado indometacina 20 mg·kg<sup>-1</sup> v.o. e carragenina i.pl. e controle negativo veículo (NaCl 0,9 %, v.o.) e carragenina i.pl. Foram utilizados de dez a doze animais por grupo experimental.

#### 2.1.8.5 Avaliação da atividade locomotora/exploratória - teste do campo aberto

A avaliação da atividade locomotora espontânea dos animais tratados com as substâncias testadas foi realizada no teste do campo aberto, conforme Müller et al. (2012). Esta etapa é executada a fim de verificar um possível efeito inespecífico dos extratos sobre a atividade locomotora espontânea e exploratória dos animais, que possa influenciar os resultados obtidos nos testes de avaliação das atividades antinociceptiva.

Grupos independentes de animais (n = 6) foram tratados a 357 mg·kg<sup>-1</sup> e 500 mg·kg<sup>-1</sup> de extrato, por via oral, e, decorridos 60 minutos, foram colocados no centro do aparato, que consistiu em uma caixa de acrílico com o fundo dividido em quadrantes iguais. Os parâmetros registrados foram: número de *crossings* (cruzamentos entre os quadrantes delimitados no fundo do aparato); número de *rearings* (episódios em que os animais levantam o corpo apoiando-se apenas nas patas traseiras); número de *groomings* (comportamentos de autolimpeza) e número de bolos fecais (fezes expelidas pelo animal durante o período total de observação). Os animais foram observados por um tempo total de 10 minutos.

### 2.1.8.6 Teste de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda baseou-se na diretriz da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). O Guia de teste OECD, reconhecido mundialmente, é uma ferramenta de referência padrão para testes químicos. A toxicidade oral aguda em camundongos foi adaptada do *The Guideline* 423 (2001).

Os animais receberam uma dose única de extrato de  $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  por gavagem ( $n = 6$ ). O grupo controle ( $n = 3$ ) foi tratado por via oral com uma única administração de veículo (NaCl a 0,9%, Tween 80 a 1%,  $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Depois disso, os animais observados tiveram atenção especial durante as primeiras 4 horas após o tratamento e diariamente por 14 dias. A ocorrência de morte e o comportamento macroscópico, como piloereção, ptoses palpebrais, contorções abdominais, hipotermia, tônus muscular, *shacking*, paralisação de patas posteriores, salivação, secreção brônquica e convulsões foram registrados. Além disso, o peso corporal e a ingestão alimentar foram registrados por 13 dias.

### 2.1.8.7 Análises estatísticas

Os resultados das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória são apresentados como a média  $\pm$  E.M.S. de  $n$  animais por grupo. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Os dados do teste do envolvimento do receptor opioide na atividade antinociceptiva do extrato foram analisados por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls. A análise dos dados de toxicidade utilizou medidas repetidas de duas vias (ANOVA). Valores de  $P$  menores que 0,05 foram considerados significativos.

### 2.1.9 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas com os animais submetidos ao teste de carragenina. Sangue e tecido da pata inflamada foram coletados 3 horas após a indução da inflamação. Para a coleta do tecido da pata, quatro animais do mesmo grupo foram usados para fazer uma amostra (*pool*).

O tecido da pata foi homogeneizado (1:10 m/v) numa solução de Tris-HCl a 50 mM (pH 7,4) a 4 °C. Uma parte reservada deste

homogeneizado foi usada para ensaios de tióis, e o restante foi centrifugado por 10 min a 3.000 rpm e 4 °C.

O sangue foi coletado em tubos contendo heparina e, em seguida, centrifugado por 10 min a 3.000 rpm. Adicionou-se ácido tricloroacético a 4% a uma fração do sobrenadante para determinar os níveis de tióis. Na outra fração do sobrenadante, foi adicionado ácido tricloroacético a 40% para determinar os níveis de TBARS, depois os tubos foram novamente centrifugados durante 10 min a 3.000 rpm e o sobrenadante final foi utilizado para os demais ensaios.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada utilizando-se o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como substrato, conforme descrito por Aebi (1984). A atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Fridovich e Misra (1972). Os níveis de tióis não proteicos (NPSH) foram determinados após a desproteïnização do sobrenadante com ácido tricloroacético, conforme descrito por Ellman (1959), utilizando-se uma curva padrão de cisteína. Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados conforme descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), que consiste em extrair o produto da reação (malondialdeído) com n-butanol e em seguida, medir sua absorvância em 535 nm, usando uma curva padrão de 1,1,3,3 tetraetoxipropano. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry et al. (1951).

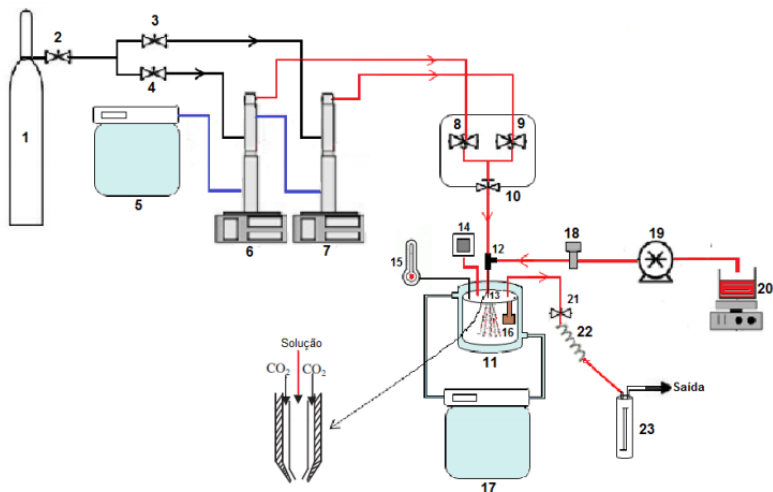
Os resultados das análises bioquímicas são apresentados como a média ± E.M.S. de quatro réplicas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls, com  $P < 0,05$  considerado significativo.

### **2.1.10 Ensaios de encapsulação do extrato de *P. bipinnatifidum* utilizando a técnica SEDS**

#### **2.1.10.1 Aparato experimental**

Os experimentos de encapsulação foram fundamentados no método de *Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids* (SEDS), o qual emprega dióxido de carbono supercrítico como antissolvente. Um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no estudo, desenvolvido por Franceschi et al. (2009), pode ser visualizado na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado para os ensaios de encapsulação.



Fonte: Franceschi et al. (2009).

Conforme a Figura 2.2, Franceschi et al. (2009) descrevem o aparato experimental:

(1) Reservatório para armazenamento do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (White Martins);

(2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (Check-Valve Marca HIP, Modelo 15-41AF1-T, Pressão de operação até 1034 bar).

(3) e (4) Válvulas de Esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente para as bombas de alta pressão (Marca Swagelok, Modelo SS-83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);

(5) Banho Ultratermostático de recirculação que mantém constante a temperatura nos cilindros das bombas de alta pressão (Marca Nova Ética, Modelo 521/2D);

(6) e (7) Bombas de alta pressão que possuem um cilindro que tem a capacidade de 506 mL (Marca ISCO, Modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de 170 ml.min<sup>-1</sup>). Foram utilizadas duas bombas para manter o fluxo de antissolvente sempre constante, e ainda através delas é pressurizado o CO<sub>2</sub> e visualizada a vazão;

(8) e (9) Válvulas de esfera que quando abertas permitem o fluxo de antissolvente pressurizado das bombas para a câmara de precipitação (Marca Swagelok, Modelo SS- 83KS4, Pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente). Sempre são utilizadas alternadamente, dependendo da bomba que está deslocando o antissolvente para a câmara;

(10) Válvula métrica tipo agulha para controlar o fluxo e vazão de antissolvente das bombas de alta pressão para câmara de precipitação (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);

(11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm). Ela é constituída de cinco entradas na tampa: uma central, e quatro periféricas, onde uma está fechada.

(12) Entrada central coaxial – conexão tipo T (Marca Swagelok) à qual estão conectadas a linha de antissolvente e a linha de solução, que são injetados simultaneamente.

(13) Tubo capilar de sílica fundida que faz com que ocorra a dispersão do jato da solução orgânica dentro da câmara de precipitação. Ele passa por dentro de um *Peek Tubing* (diâmetro interno de 0,254 mm) ao qual está conectado em uma extremidade da união T (12) por um sistema de anilas.

(14) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação (Transdutor absoluto – 0 à 250 bar, Marca SMAR, Modelo LD 301);

(15) Entrada periférica onde fica um sensor de temperatura ligado à um indicador de temperatura (Universal, Marca NOVUS, Modelo N 1500);

(16) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno, disposto na saída da câmara, para retenção das partículas precipitadas no seu interior, permitindo apenas o fluxo do antissolvente e solvente orgânico. Um filtro apresenta porosidade de 1  $\mu\text{m}$ , diâmetro de 8 mm e espessura de 1 mm que serve de base para o outro filtro membrana de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ , espessura de 150  $\mu\text{m}$  e mesmo diâmetro que o primeiro.

(17) Banho Ultratermostático de recirculação (Marca Nova Ética, Modelo 512/2D), que serve para controlar a temperatura da câmara de precipitação, através da sua ligação com a camisa da câmara;

(18) Válvula de regulação de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (*Back Pressure Regulator*, Marca GO-Regulador, Série BP-66, Modelo 1A11QE151). Ela permite



a regulação da pressão independentemente da vazão, permitindo uma pressão maior anterior a ela e menor depois dela;

(19) Bomba de HPLC Digital Série III (Marca Acuflo), que é utilizada para deslocar a solução orgânica para a câmara de precipitação. Esta bomba possui um único pistão que permite operar em fluxo constante;

(20) Recipiente para solução orgânica na qual o princípio ativo a ser precipitado é dissolvido no solvente orgânico;

(21) Válvula métrica tipo agulha (Marca HOKE, Modelo 1315G2Y) que fica na saída da câmara de precipitação. Através desta válvula é possível controlar o fluxo de saída da câmara de precipitação, juntamente com a válvula (10). A válvula (21) possui abertura um pouco maior que a válvula (10) para compensar o fluxo de entrada da solução, mantendo assim a pressão constante dentro da câmara de precipitação;

(22) Fita de aquecimento (Marca FISATON, Modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (21). Ela é utilizada devido ao efeito Joule-Tomphson ser pronunciado pela expansão do antissolvente após esta válvula. A temperatura utilizada na fita de aquecimento é 200 °C, impedindo o congelamento da válvula e permitindo o controle do fluxo;

(23) *Trap* de segurança, recheado com algodão, onde é possível observar a ocorrência de arraste dos princípios ativos quando o algodão apresentava coloração. Do *trap* de segurança o antissolvente e o solvente orgânico se deslocavam para saída.

#### 2.1.10.2 Metodologia experimental para encapsulação do extrato de *P. bipinnatifidum* em PHBV e obtenção de partículas submicrométricas

Visando investigar o efeito dos parâmetros de processo na encapsulação do extrato de *P. bipinnatifidum* obtido a partir do solvente acetato de etila, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com triplicata no ponto central, resultando em sete ensaios experimentais (Tabela 2.1). Através desse planejamento fatorial estimou-se os níveis em que as variáveis concentração de extrato e temperatura produziram maior eficiência de encapsulamento e menor tamanho de partícula.

Os parâmetros de operação seguiram os estudos de Franceschi et al. (2008, 2009) e Priamo et al. (2010), que avaliaram a precipitação e encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em PHBV. Para todos os ensaios realizados, adicionou-se o biopolímero PHVB na concentração fixa de 20 mg·mL<sup>-1</sup> à solução contendo o extrato diluído em diclorometano, vazão

de CO<sub>2</sub> de 20 mL·min<sup>-1</sup> e fluxo de solução com extrato e PHVB de 1 mL·min<sup>-1</sup>.

Tabela 2.1 - Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central para estimativa do efeito da temperatura e concentração de extrato de *P. bipinnatifidum* na encapsulação através da técnica SEDS.

Ensaio	Fatores em níveis codificados		
	T	CE	
1	-1	-1	
2	+1	-1	
3	-1	+1	
4	+1	+1	
5	0	0	
6	0	0	
7	0	0	

Fatores	Níveis reais		
	- 1	0	+ 1
T – temperatura (°C)	35,0	37,5	40,0
CE – concentração de extrato (mg·mL <sup>-1</sup> )	5,0	12,5	20,0

Os resultados avaliados foram eficiência de encapsulamento, tamanho médio de partículas e coeficiente de variação do tamanho das partículas. Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA), com nível de significância  $P < 0,05$ .

### 2.1.11 Eficiência do encapsulamento do extrato de *P. bipinnatifidum* pela técnica SEDS

A determinação do teor de extrato encapsulado foi realizada por espectrometria na região UV-visível, seguindo metodologia empregada por Franceschi et al. (2008), com algumas modificações. Inicialmente o comprimento de onda de máxima absorção foi obtido através de espectros de absorção entre 400 e 800 nm (varredura) para três concentrações de extrato: 1,0; 0,5 e 0,1 mg·mL<sup>-1</sup>, realizadas através da diluição das partículas em DMSO. A partir do comprimento de onda determinado, de 415 nm, foram obtidas três curvas de calibração do extrato na faixa de concentração de 0,02 a 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>. A curva de calibração obtida apresentou coeficiente de correlação de 0,9995, comprovando que o

método apresenta resposta linear na faixa de concentrações avaliadas. A equação obtida através da regressão linear está expressa a seguir:

$$ABSORBANCIA = 2,5149 \times CE + 0,0813 \quad (2)$$

Onde CE corresponde a concentração de extrato em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Ainda para verificar se o método é válido, calculou-se o desvio da inclinação, obtendo o valor de  $2,7 \times 10^{-2}$ , demonstrando que o coeficiente angular é reprodutível. Em relação ao coeficiente linear, verifica-se que este não é estatisticamente diferente de zero (McPOLIN, 2009). Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) do método são  $0,016 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

Para as análises em espectrofotômetro, determinada massa de partículas de cada condição experimental foi pesada ( $\pm 0,01 \text{ g}$ ) e solubilizada em 10 ml de DMSO P.A. As leituras das amostras foram realizadas no comprimento de onda determinado anteriormente. A partir das absorbâncias medidas, a concentração de extrato foi calculada através da Equação (2). A massa de extrato encapsulada é determinada multiplicando-se a concentração pelo volume de DMSO utilizado na preparação da solução.

Os resultados finais são expressos como percentual teórico de encapsulamento (PRE) e eficiência de encapsulamento (EE), de acordo com as equações abaixo:

$$PRE [\%] = \frac{\text{massa de extrato encapsulada}}{(\text{massa de extrato} + \text{massa de PHBV})} \times 100 \quad (3)$$

$$EE [\%] = \frac{PRE[\%]}{\text{percentual teórico de encapsulamento}} \times 100 \quad (4)$$

Onde o percentual teórico de encapsulamento é a razão entre a massa de extrato e a soma das massas de extrato e PHBV utilizadas nos experimentos de encapsulamento.

### 2.1.12 Morfologia e determinação do tamanho da partícula

A morfologia das partículas contendo extrato de *P. bipinnatifidum* encapsulado em PHBV foi avaliada por observação visual das micrografias do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para todas as condições experimentais avaliadas. As análises das partículas foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Utilizou-se um Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL

JSM6390LV (USA). As amostras a serem avaliadas foram manualmente dispersas sobre fitas adesivas de carbono dupla face e dispostas em suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro sob vácuo e então analisadas. A visualização foi realizada em aumentos de 1000 a 13000 vezes, com uma tensão de 10 kV.

A partir das micrografias de MEV, procedeu-se a determinação do tamanho das partículas coprecipitadas utilizando o software *Size Meter* versão 1.1 (CARLSON; BOLZAN, 2001). O método consiste na avaliação das medidas do comprimento e da espessura (maior medida característica) de 600 a 700 partículas para cada condição experimental avaliada. Além das medidas de tamanho característico, seus respectivos desvios padrão e coeficiente de variação foram calculados.

### 2.1.13 Experimentos de liberação *in vitro*

Testes de liberação *in vitro* foram realizados com base nos trabalhos de Dal Magro et al. (2017) e Loss et al. (2016). Os meios de liberação utilizados para avaliar as partículas de extrato co-precipitadas foram uma solução tampão de fosfato (PBS) pH 6,8 e uma solução de HCl 0,1 M, com ensaios realizados individualmente para cada meio. O primeiro meio foi escolhido por estar muito próximo das condições fisiológicas, enquanto o segundo refere-se ao sistema gástrico (DANHIER, FERON e PRÉAT, 2010). A amostra selecionada foi do experimento 2 (maior eficiência de encapsulamento). As amostras na concentração de  $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foram colocadas em contato com o meio de liberação, com temperatura controlada a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  e rotação de 100 rpm. Em intervalos de tempo programados, 1,0 mL foi coletado da solução e imediatamente reabastecido com meio puro para manter o volume original. A amostra coletada foi filtrada por um filtro de membrana com porosidade de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  e analisada a 415 nm para determinar sua concentração.

### 2.1.14 Referências

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121–126, 1984.

BARRITA, J.L.S.; SÁNCHEZ, S.S. Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. *In*: Morales-González (Ed.). **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology – Oxidative**

stress and chronic degenerative diseases: A role for antioxidants. InTech. 2013.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BOLIGON, A.A.; PIANA, M.; KUBIÇA, T.F.; MARIO, D.N.; DALMOLIN, T.V.; BONEZ, P.C.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L.; ALVES, S.H.; CAMPOS, M.M.A.; ATHAYDE, M.L. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, p. 7-18, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Lei n. 11794**, de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. 2008.

CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.; Involvement of B1 and B2 receptors in bradikinin-induced rat paw edema. **Brazilian Journal of Pharmacology**. v. 144, p. 1005-1013, 1995.

CARLSON, L.H.C.; BOLZAN, A. **Size Meter**, Versão 1.1. Laboratório de Controle de Processos (LCP). Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA. **Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA**, Brasília/DF, 2013.

COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES (CIOMS). **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Geneva: 1985.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers

for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 135-146, 2010.

DAL MAGRO, C., AGUIAR, G.P.S., VENERAL, J.G., DOS SANTOS, A.E., DE CHAVES, L.M.P.C., OLIVEIRA, J.V., LANZA, M., 2017. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, p. 182-190, 2017.

DUBOIS, M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350–356, 1956.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

FRANCESCHI, E., CESARO, A. M., FEITEN, M., FERREIRA, S. R. S., DARIVA, C., KUNITA, M. H., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C., CORAZZA, M. L., OLIVEIRA, J. V. Precipitation of  $\beta$ -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259–269, 2008.

FRANCESCHI, E., DE CESARO, A.M., FERREIRA, S.R.S., OLIVEIRA, J.V. Precipitation of  $\beta$ -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 656–663, 2009.

FRIDOVICH, H.P.M.; MISRA, I. The Role of superoxide anion in the epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

KOSTER, R.; ADERSON, M. deBEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**. v. 18, p. 412, 1959.

LOSS, R.A.; PEREIRA, G.N.; BOSCHETTO, D.L.; AGUIAR, G.S.P.; MACHADO, J.R.; CHAVES, L.M.P.C.; SILVA, M.J.A.;

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 3859-3864, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

McPOLIN, O. An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis. Warrenpoint: Mourne Training Service, 2009.

MÜLLER, L.G., SALLES, L.A., STEIN, A.C., BETTI, A.H., SAKAMOTO, S., CASSEL, E., VARGAS, R.F., VON POSER, G.L., RATES, S.M.K. Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 36, p. 101–109, 2012.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OECD, Guideline for testing of Chemicals, 2001. Guideline 423: acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 2001.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 95, p. 351–358, 1979.

PEREIRA, D.F.; CAZAROLLI, L.H.; LAVADO, C.; MENGATTO, V.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; GUEDES, A.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif), v. 27, p. 1161–7, 2011.

PRIAMO, W. L.; DE CEZARO, A. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation and encapsulation of  $\beta$ -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 103-109, 2010.

SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**. v. 31, p. 381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid cis-8,10-di-N-propyllobediol hydrochloride dehydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 289, p. 417-426, 1999.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TREVISAN, G., ROSSATO, M.F., WALKER, C.I.B., OLIVEIRA, S.M., ROSA, F., TONELLO, R., SILVA, C.R., MACHADO, P., BOLIGON, A.A., MARTINS, M.A.P., ZANATTA, N., BONACORSO, H.G., ATHAYDE, M.L., RUBIN, M.A., CALIXTO, J.B., FERREIRA, J. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 261–273, 2013.

WACZUK, E.P.; KAMDEM, J.P.; ABOLAJI, A.O.; MEINERZ, D.F.; BUENO, D.C.; GONZAGA, T.K.S.N.; DOROW, T.S.C.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; ROCHA, J.B.T.; ÁVILA, D.S. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. **Toxicology Research**, v. 4, p. 739-748, 2015.



## CAPÍTULO 3

Neste capítulo estão apresentados os resultados preliminares da tese, redigidos no formato de artigo científico, intitulado “Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potential of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl”, o qual foi submetido à revista *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.

### ABSTRACT

Many of the species used in popular medicine do not have not their biological activities already proven by scientific studies. Among these species, the endemic South American *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl deserves special attention since it is already in use in popular medicine at inflammation cases, such as erysipelas, orchitis and ulcers. Este estudo avaliou as atividades antioxidante, antimicrobiana e antidiabética dos extratos das hastes de *P. bipinnatifidum*. The ethyl acetate extract showed significantly antioxidant potential, with IC<sub>50</sub> of 27.11 µg/ml, when registered 59.43 µg/ml for the ethanolic extract. The ethyl acetate extract resulted in high antimicrobial activity against *Streptococcus pyogenes* (MIC 3.2 mg/ml) and these results support the ethnomedical use of this plant in the treatment of cutaneous bacterial infection, erysipela. The most significant biological activity of ethyl acetate extract relates to its chemical composition when compared with ethanolic extract, which showed the highest concentration of bioactive compounds, such as flavonoids quercetin, luteolin, apigenin and rutin. *In vitro* antidiabetic activity was only evaluated for ethyl acetate extract, resulting in inhibition of intestinal disaccharidases (maltase and sucrase) at concentration of 500 µg/ml, exhibiting a promising profile of antidiabetic potential.

**Keywords:** Guaimbê, flavonoids, *Streptococcus pyogenes*, disaccharidases.

### 3.1 INTRODUCTION

The use of plants as source of prevention, treatment and cure of infectious diseases comes from empirical knowledge, acquired over many centuries and transmitted from generation to generation through popular culture. This fact arouses interest in science, which seeks, from experimental methods, to explain the commonly used plants’

pharmacological activity, which are studied under the aspect of its chemical constituents (Akram et al., 2014).

The basic aim is to identify the bioactive compound in these plants and subsequently to isolate and characterize it, researching its effects on organisms justifying the medicinal activity shown by the species and also use them as active ingredient for the pharmaceutical industry (Azmir et al., 2013; Brusotti et al., 2014).

Due to the effects of acquired resistance by some bacterial microorganisms against conventional antibiotics, stemmed from the inappropriate use of these drugs by the population, new strategies are needed to control these organisms (Thabit et al., 2015). Recently, many scientists and researchers have highlighted the crude extracts and pure compounds biologically active, isolated from plant species. This fact points out to the development of new natural antimicrobial compounds, such as spices and herb extracts, which could be an alternative source of new therapies (Palaniappan and Holley, 2010; Xia et al., 2011; Azmir et al., 2013).

Among the plants grown in Brazil, *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl is a shrubby specie of the Araceae family, endemic to Brazil. It is popularly known as guaimbê, banana-de-macaco or imbê. In folk medicine, people use this plant as a purgative (root), hemostatic and anthelmintic. Also there are reports of antitumor, anesthetic and anti-inflammatory activities (erysipelas, orchitis and ulcers) (Lorenzi and Matos, 2002). This plant is widely used in Brazilian folk medicine, however, there are few scientific researches about the specie, with studies of roots antioxidant potential (Menezes et al., 2004), branches and leaves antiprotozoal activity (Muelas-Serrano et al., 2000) and antiproliferative effect of phenolic glucosides isolated this plant on HepG2 cells (Abdel-Nabi et al., 2012).

The objective of this study is to obtain two different extracts of Brazilian native plant *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl, to characterize them and test their antioxidant, antimicrobial and antidiabetic activities *in vitro*.

## **3.2 MATERIAL AND METHODS**

### **3.2.1 Plant material and solvent extraction**

*P. bipinnatifidum* stems and leaves samples were collected on November 2016 (spring) from the native plants of the Chapecó city, which is located approximately 659 m above sea level, in the Southern

Region of Brazil. This region has a humid subtropical mesothermal climate. After collection, stems were manually separated from the leaves, and only the stems were cut and dried (40 °C for 2 days) and then milled in an industrial blender.

The milled stems were subjected to maceration using two different solvents separately: Ethanol 99% PA and ethyl acetate PA in a ratio of 1:20 grams of plant material per liter of solvent, and homogenized for three days at intervals of 24 h. Thereafter, the extract was filtered and the solvent removed in rotary evaporator under reduced pressure. Finally, we frozen the extract and lyophilize it for 24 h.

### 3.2.2 Chemical composition of the extracts by HPLC Analysis

Reagents had analytical grade. High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

*P. bipinnatifidum* extracts were injected into reversed phase Phenomenex C<sub>18</sub> column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. Mobile phases A and B were Milli-Q water, acidified to pH 2.0 with 1% of formic acid and methanol, correspondingly, solvent gradient was used as follows: 0-10 min, 5% B; 10-25 min, 15% B; 25-40 min, 30%; 40-55 min 50% B; 50-65 min 70% B; 65-80 min, 100% B, following the method described by Waczuk et al. (2015) with slight modifications. We filtered the sample and mobile phase through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the methanol: water (1:1, v/v) at a concentration range of 0.030 - 0.500 mg/mL. Quantifications were carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 270 nm for gallic acid; 325 nm for caffeic acid and chlorogenic acid; and 366 for quercetin, rutin, luteolin and apigenin. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curve for the compounds was: gallic acid:  $Y = 11957x + 1308.1$  ( $r = 0.9997$ ); caffeic acid:  $Y = 13259x + 1164.5$  ( $r = 0.9999$ ); apigenin:  $Y = 14386x + 1247.0$  ( $r = 0.9996$ ); chlorogenic acid:  $Y = 10985x + 1274.3$  ( $r = 0.9998$ ), quercetin:  $Y = 12763x + 1405.9$  ( $r = 0.9999$ ); rutin:  $Y = 10863x + 1354.7$  ( $r = 0.9997$ ) and luteolin:  $Y = 13462x$

+ 1184.9 ( $r = 0.9994$ ). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by (Boligon et al., 2015). LOD and LOQ were calculated as  $3.3$  and  $10 \sigma/S$ , respectively, where  $\sigma$  is the standard deviation of the response and  $S$  is the slope of the calibration curve. Gallic acid: LOD  $0.024 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.079 \mu\text{g/mL}$ . Chlorogenic acid: LOD  $0.013 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.042 \mu\text{g/mL}$ . Caffeic acid: LOD  $0.017 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.056 \mu\text{g/mL}$ . Rutin: LOD  $0.008 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.026 \mu\text{g/mL}$ . Quercetin: LOD  $0.011 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.035 \mu\text{g/mL}$ . Luteolin: LOD  $0.025 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.083 \mu\text{g/mL}$ . Apigenin: LOD  $0.009 \mu\text{g/mL}$ , LOQ  $0.029 \mu\text{g/mL}$ .

### 3.2.3 Analysis of antioxidant activity

#### 3.2.3.1 FRAP assay for antioxidant capacity

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed in triplicate, as described by Benzie and Strain (1996) with some modifications. Different dilutions of seed extract ( $2.5$ – $160 \mu\text{g/mL}$ ) were incubated with the working solution of  $10 \text{ mM}$  TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine) chloride solution,  $20 \text{ mM}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $0.3 \text{ M}$  acetate buffer, at  $37^\circ \text{C}$  for  $30 \text{ min}$ . The increase of absorbance resulting from the formation of the  $\text{Fe}^{2+}$ –TPTZ complex was registered against a blank at  $595 \text{ nm}$ . A calibration curve of  $\text{FeSO}_4$  at  $595 \text{ nm}$  was constructed. The results were expressed in  $\mu\text{molFe}^{2+}/\text{mL}$ .

#### 3.2.3.2 Antioxidant activity by DPPH scavenging assay

A DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) assay was carried out according to a previous study by (Brand-Williams et al. 1995) with some modifications. The DPPH solution was prepared by dissolving  $24 \text{ mg}$  DPPH in  $100 \text{ mL}$  chloroform and then diluting the solution until the absorbance reached  $1.1 \pm 0.02$  units at  $517 \text{ nm}$ . The DPPH solution ( $1.9 \text{ mL}$ ) was mixed with  $50 \text{ mL}$  each of chloroform and different concentrations of *P. bipinnatifidum* extract ( $10$ ,  $20$ ,  $40$ ,  $80$  and  $160 \mu\text{g/mL}$ ) and then incubated for  $120 \text{ minutes}$  at room temperature. A control was prepared by adding  $1.9 \text{ mL}$  of DPPH solution to  $100 \text{ mL}$  of chloroform. The absorbance was measured at  $517 \text{ nm}$  against a pure

chloroform blank in a spectrophotometer. All results were expressed as inhibition percentage and calculated as DPPH radical scavenging. A standard sample (control) was considered when reading the results. The concentration of antioxidant resulting in a 50% decrease in radical absorbance (IC<sub>50</sub>) was estimated for both the DPPH and ABTS radical assays (see below) by non-linear regression analysis using GraphPad Prism version 4.0 (La Jolla, CA).

### **3.2.4 Antimicrobial activity**

The antimicrobial activity was evaluated for gram-positive bacteria *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria monocytogenes* and gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, according methodologies described previously by (CLSI, 2015). For inoculum preparation were selected 2-4 bacterial colonies and transferred to a sterile 0.9% saline. The solution turbidity was adjusted as compared to the 0.5 McFarland scale, yielding the equivalent concentration of about  $1,5 \times 10^8$  cells/mL.

#### *3.2.4.1 Agar plug diffusion method*

In this technique, we seeded the microorganism of interest in Petri dishes with a culture medium Plate Count Agar (PCA) using a swab. Three equidistant holes were made in each plate, with 0.8 cm diameter approximately. In each hole was deposited an extract at a 0.40 g/ml concentration and incubated at 36 °C for 24 h. Then, we assessed the formation of a microbial growth inhibition zone, and performed the measurements using a caliper.

#### *3.2.4.2 Minimum inhibitory concentration (MIC)*

In MIC method, the highest extract concentration tested was 10.00 mg/ml, and the lowest concentration tested was 0.05 µg/ml obtained by dilution in aqueous 0.1 % Tween 80. We performed the filtration of extracts with Millipore filter 0.45 micrometres to ensure its sterility.

The assay was performed in sterile 96-well microplates bottomed "U". To each well was added 100 µL of Brain Heart Infusion broth (BHI) and 100 µL extract, along with 5 µL of solution containing the microorganism in a concentration of about  $1,5 \times 10^8$  cells/mL. For the

control tests, the wells of positive control were filled with 100  $\mu\text{L}$  of BHI and 5  $\mu\text{L}$  of microorganisms, the negative control was 100  $\mu\text{L}$  of BHI, 100  $\mu\text{L}$  of 0.5 % Tween 80 and 5  $\mu\text{L}$  microorganisms. Also it made blank test, which consisted only of 100  $\mu\text{L}$  of BHI.

The microplates were incubated at 36 °C for 20 h. After this time, we added to each well 20  $\mu\text{L}$  of TTC (2,3,5-trifeniltetrazólico chloride) an agent promoting the microbial cells coloring, making it possible to visualize bacterial growth. The microplates were returned to bacteriological incubator for a further 4 hours and then taken for reading. In order to evaluate the minimum bactericidal concentration (MBC) for every test tube in which microbial growth was not identified, the inoculum was then placed into Petri dishes with Agar Mueller-Hinton as the culture media to confirm which the lowest concentration at which bacteria failed to grow and caused microorganism death.

### **3.2.5 Total sugars analysis**

The phenol-sulfuric method was used for the analysis of total sugars according to (Dubois et al. 1956). The glucose standard solutions for calibration curve were 1.0; 0.80; 0.60; 0.40; 0.20; 0.10 and 0.05 g/L. In the tubes were pipetted into 50  $\mu\text{L}$  of the standard solution or the sample, 0.450 mL of water, 0.5 mL of phenol 5% and 2.5 mL of concentrated sulfuric acid. After cooled the solutions, absorbance reading was performed at 490 nm. The color change is proportional to the amount of sugar present in the sample and the result is expressed in equivalent mg glucose per 100 g of sample.

### **3.2.6 Intestinal disaccharidases activity**

For this test only the extract obtained through the ethyl acetate solvent was used in the following concentrations: 250, 500 and 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

The experimental protocol was approved by the local Ethics Committee on Animal Use (CEUA Number 004/2017). We used male wistar rats weighing 160–200 g (50–55 day-old) from Central Animal House-Unochapecó. After euthanasia, a segment of the small intestine was removed, washed in 0.9% NaCl solution, dried on filter paper, weighed, trimmed and homogenized (300 rpm) with 0.9% NaCl (400 mg duodenum per ml) for 1 min at 4 °C. The resulting extract was centrifuged at 8000 rpm for 8 min. The supernatant was used for the measurement of sucrase, lactase and maltase activity and protein determination (Pereira et

al., 2011). Maltase, lactase and sucrase activities were determined using a glucose diagnosis kit based on the reagent glucose oxidase. To determinate the disaccharidase activity, 10  $\mu$ l of supernatant were incubated at 37 °C for 60 min in maleate buffer (pH 6.0) containing sucrose, lactose or maltose and the extract.

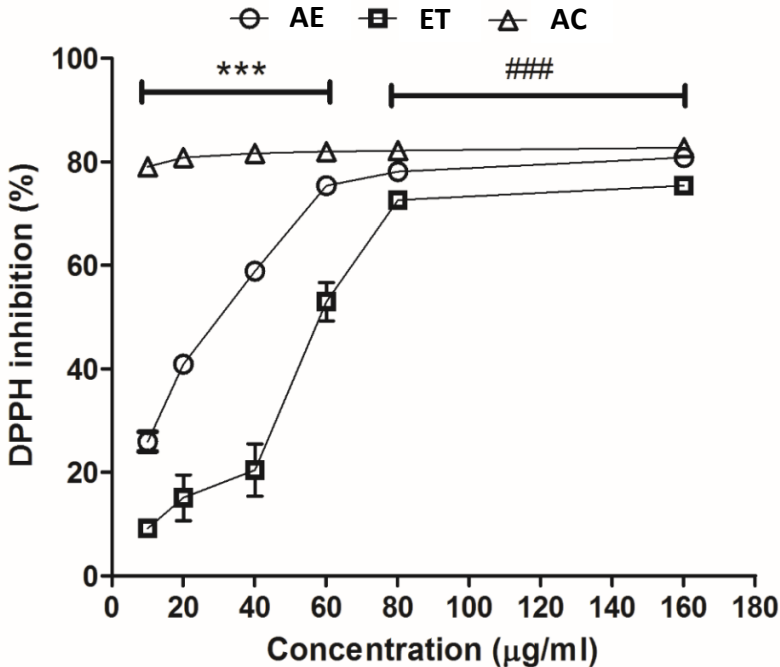
One enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme that catalyzed the release of 1  $\mu$ mol of glucose per min under the assay conditions. The specific activity was defined as enzyme activity (U) per mg of protein. Protein concentration was determined by the method described in (Lowry et al., 1951) using bovine serum albumin as the standard. The assays were performed in duplicate and conducted along with appropriate controls.

### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

The *P. bipinnatifidum* stems extracts showed high antioxidant activity by DPPH assay. This method is based on the antioxidant compound to transfer electrons to DPPH and lose its characteristic purple coloring, and is considered simple and sensitive, allowing a better correlation between the concentration of samples and the percentage inhibition of DPPH (Santos et al., 2013). The antioxidant activity was higher as higher was the extract concentration evaluated, with the most significant increase for the ethyl acetate extract, to reach  $75.34 \pm 0.11\%$  and  $80.81 \pm 0.79\%$  at the concentration of 160  $\mu$ g/ml for the ethanolic extracts and ethyl acetate, respectively (Fig. 3.1).

For the lowest concentrations tested, both extracts resulted in significantly less antioxidant activity than the ascorbic acid ( $P < 0.001$ ), which showed antioxidant activity above 78% already at the lowest concentration. For the highest concentrations tested (80 and 160  $\mu$ g/ml), the ethyl acetate extract had antioxidant activity comparable with ascorbic acid ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3.1).

Figure 3.1 - Percent inhibition of DPPH radical oxidation as a function of the concentrations of *P. bipinnatifidum* stems extracts and acid ascorbic. \*\*\* Different from ascorbic acid (AC) and different between extracts ethyl acetate (AE) and ethanol (ET) at the same concentration ( $P < 0.001$ , ANOVA/Tukey). ### Not different between extracts, not different between extract AE and ascorbic acid and different between extract ET and ascorbic acid at the same concentration ( $P < 0.001$ , ANOVA/Tukey).

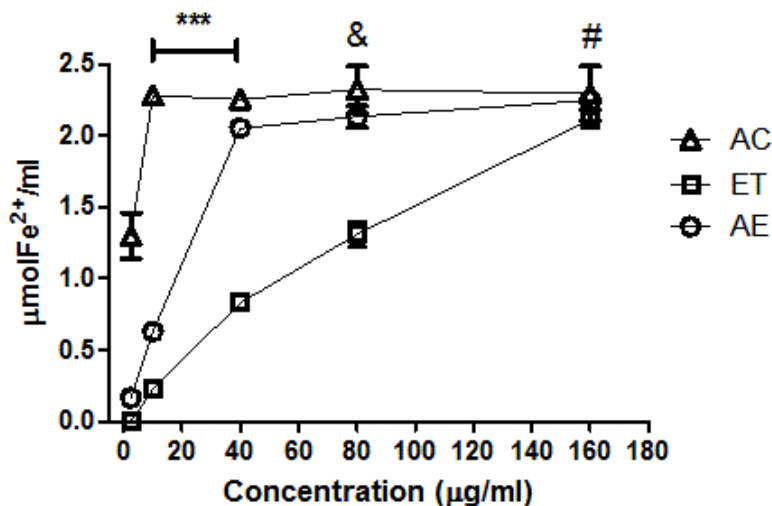


We calculated the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) by the reduction of 50% of the initial DPPH concentration, through the regression analysis. The  $IC_{50}$  values found for the *P. bipinnatifidum* stems extracts were 59.43 µg/ml for the fraction extracted with ethanol and 27.11 µg/ml for the ethyl acetate. Antioxidants are a type of complex compounds found in plants that act as a protective shield of our body against certain human diseases, such as arthritis, cancer, diabetes, atherosclerosis, ischemia, failures in immunity and endocrine functions (Rajendran et al., 2014), and the *P. bipinnatifidum* seems to be a plant that has large quantities of these compounds.



The antioxidant assay by FRAP is based on electron transfer, that measures the capacity of an antioxidant (water soluble in acidic pH) in ferric-to-ferrous ions reduction, which present different colors in solution, and the degree of color change is proportional to the concentration of antioxidant contained in the sample (Benzie and Strain, 1996). Similar results to the DPPH method were found by the FRAP method, since the antioxidant activity increased with the increase of extract concentration, as we can see in Figure 3.2. Again, the antioxidant activity was more significant for the ethyl acetate extract, being comparable to the ascorbic acid in the concentrations of 80 and 160  $\mu\text{g/ml}$ .

Figure 3.2 - Antioxidant activity measured by FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  equivalent per ml) as a function of the concentrations of *P. bipinnatifidum* stems extracts and acid ascorbic. \*\*\* Different from ascorbic acid (AC) and different between extracts ethyl acetate (AE) and ethanol (ET) at the same concentration ( $P < 0.001$ , ANOVA/Tukey). & Different between extracts, not different between extract AE and ascorbic acid and different between extract ET and ascorbic acid ( $P < 0.001$ , ANOVA/Tukey). # Not different between extracts and ascorbic acid ( $P > 0.05$  ANOVA/Tukey).



The extract we obtained with solvent ethanol showed a weak inhibition against *S. pyogenes* microorganism, resulting in inhibition zone of  $1.287 \pm 0.025$  cm, since the extract obtained with ethyl acetate solvent showed strong inhibition, resulting in inhibition zone of  $3.565 \pm 0.06$  cm.

In the tests of MIC and MBC, ethanol extract did not show antimicrobial activity at the concentrations tested, and the ethyl acetate extract resulted in MIC and MBC of 3.20 mg/ml. For the *E. faecalis* and *Listeria monocytogenes* microorganisms, only the ethyl acetate extract resulted antimicrobial activity, with inhibition zone of  $1.33 \pm 0.034$  cm and  $1.40 \pm 0.058$  cm, respectively. The MIC and MBC were 10.0 mg/ml for both microorganisms. There was no antimicrobial activity against *P. aeruginosa* for both extracts (Table 3.1).

The antimicrobial activity of the extracts observed for *S. pyogenes* is a very interesting result, since this plant is used in popular medicine for the treatment of erysipelas, a bacterial infection caused by *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* group A). In addition, *S. pyogenes* is one of the most important bacterial causes of cutaneous and soft tissue infections worldwide, being reported that cellulitis and erysipelas can be mild or moderately severe, whereas other diseases, as necrotizing fasciitis, myonecrosis and StrepTSS are life-threatening (Ferretti et al., 2016).

Table 3.1 - Antimicrobial activity of *P. bipinnatifidum* extracts.

Microorganism	Solvent Extract	Inhibition zone diameter (cm)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
<i>S. pyogenes</i>	Ethanol	$1.287 \pm 0.025$	nd	nd
	Ethyl acetate	$3.565 \pm 0.060$	3.20	3.20
<i>E. faecalis</i>	Ethanol	nd	nd	nd
	Ethyl acetate	$1.330 \pm 0.034$	10.00	10.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ethanol	nd	nd	nd
	Ethyl acetate	$1.400 \pm 0.058$	10.00	10.00
<i>P. aeruginosa</i>	Ethanol	nd	nd	nd
	Ethyl acetate	nd	nd	nd

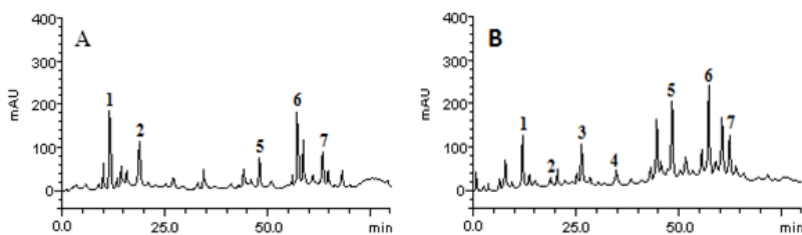
nd – not detected

It is possible to observe that the gram-positive bacteria were more susceptible than gram-negative for the extract. The bacteria cell envelope is a complex multilayered structure that serves to protect these organisms.

Gram-negative bacteria have thin peptidoglycan cell wall, which itself is surrounded by an outer membrane containing lipopolysaccharide. Gram-positive bacteria lack an outer membrane but are surrounded by layers of peptidoglycan many times thicker than is found in the Gram-negatives, that contain through these layers, long anionic polymers, called teichoic acids (Silhavy et al., 2010).

The difference between the antimicrobial activities observed for extracts with different solvents can be evaluated through the chemical composition, then the HPLC profile of *P. bipinnatifidum* extracts with ethanol and ethyl acetate were acquired (Fig. 3.3 – A and B). The ethanol extract contains gallic acid (retention time- $t_R$  = 10.53 min, peak 1), chlorogenic acid ( $t_R$  = 19.24 min, peak 2), quercetin ( $t_R$  = 48.06 min, peak 5), luteolin ( $t_R$  = 57.39 min, peak 6) and apigenin ( $t_R$  = 63.85 min, peak 7). For ethyl acetate extract, the presence of these compounds were also detected but other two were observed, caffeic acid ( $t_R$  = 25.06 min, peak 3) and rutin ( $t_R$  = 34.71 min, peak 4).

Figure 3.3 - Representative high performance liquid chromatography profile of *Philodendron bipinnatifidum* extracts with ethanol (A) and ethyl acetate (B). Gallic acid (peak 1), chlorogenic acid (peak 2), caffeic acid (peak 3), rutin (peak 4), quercetin (peak 5), luteolin (peak 6) and apigenin (peak 7).



Through the quantification of the compounds in the extracts (Table 3.2) was possible to verify the presence in higher amounts of the compounds quercetin, luteolin and apigenin in the fraction extracted with ethyl acetate, that have proven antimicrobial activity against *S. pyogenes* (Lucarini et al., 2015; Siriwong et al., 2015). According to Siriwong et al. (2015), the inhibitory mode of action of luteolin and quercetin may be mediated inhibiting of peptidoglycan synthesis, increasing cytoplasmic membrane permeability, and decreasing nucleic acid but increasing the protein contents of bacterial cells. Another important compound detected

only in this extract was rutin, which also has antimicrobial activity proven against several microorganisms (Orhan et al., 2010; Ganeshpurkar et al., 2013).

In addition to the presence of these compounds in higher amounts in the ethyl acetate extract, another factor that may explain the lower antimicrobial activity of the ethanolic extract is the amount of sugars present in these extracts. The determination of total sugars resulted in 8915.6 mgEG/100 g to ethanolic extract, and 221.3 mgEG/100 g to ethyl acetate extract, proving the high amount of sugars in the extract with ethanol, which damage the antimicrobial activity, because such compounds will be used by microorganisms as carbon source for growth and proliferation.

Table 3.2 - Components of *Philodendron bipinnatifidum* extracts.

Compounds	Ethanol	Ethyl acetate
	mg/g	mg/g
Gallic acid	9.25 ± 0.01	6.02 ± 0.03
Chlorogenic acid	5.47 ± 0.03	0.61 ± 0.05
Caffeic acid	nd	4.23 ± 0.01
Rutin	nd	1.75 ± 0.01
Quercetin	2.11 ± 0.05	9.47 ± 0.04
Luteolin	9.36 ± 0.04	11.04 ± 0.01
Apigenin	2.15 ± 0.01	4.19 ± 0.02

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. nd – not detected.

The chemical composition of the extracts also explains the high antioxidant activity found. Within the compounds identified, ethanolic extract showed higher concentration of only one of the potent antioxidants, gallic acid, once it the highest concentration of chlorogenic compound in this extract does not contribute to the increase of antioxidant potential, according to (Sato et al., 2011), in the in vitro study, caffeic acid had stronger antioxidant activity than that of chlorogenic.

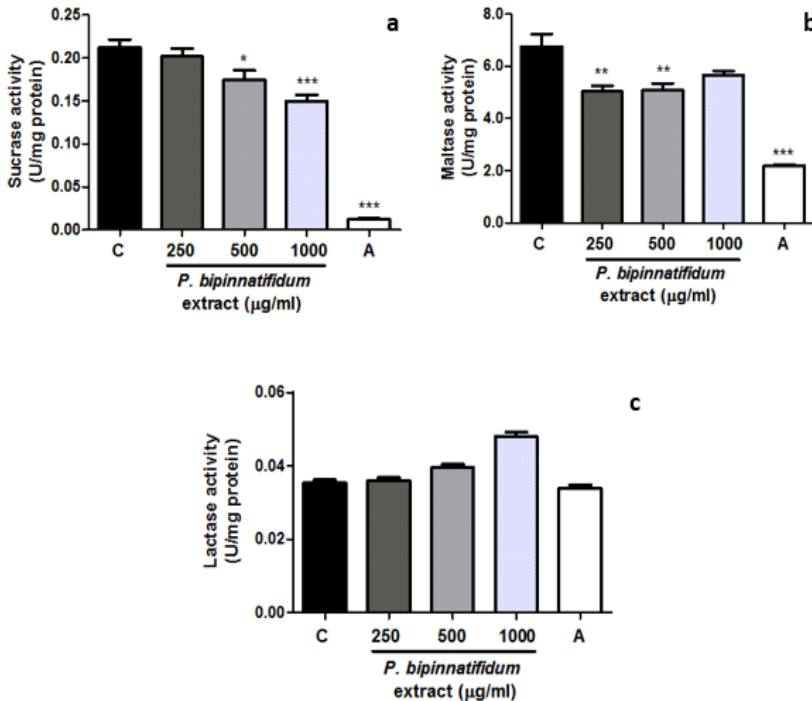
One of the compounds present in a significantly higher amount in the ethyl acetate extract is quercetin, a plant-derived aglycone form of

flavonoid glycosides, has been used as a nutritional supplement and may be beneficial against a variety of diseases, including cancer; it is considered as a compound with high antioxidant activity (Zhang et al., 2011; Mihaylova and Schalow, 2013). Other compounds that contribute to antioxidant activity of this extract are caffeic acid and rutin, both quantified only in this extract, according to (Yang et al., 2008) rutin exhibited strong DPPH radical scavenging activity and (Gülçin, 2006) reported the potent antioxidant activity of the caffeic acid.

These results demonstrate the importance of evaluating plant bioactivity resulting from different extraction methods and solvents. One cannot assert that a plant is not bioactive simply because particular plant parts do not have bioactive effects, when, for example, ethanol is used for obtaining the extract. Perhaps the extract of the same plant structure can present bioactive effects when prepared from nonpolar solvents, for example. Certainly, the extraction yield of the active component of the plant will also depend on its solubility in the solvent used.

From the best results obtained by the solvent ethyl acetate, only this one was submitted to the antidiabetic activity test. The extract inhibited the enzyme sucrase activity at concentration of 500 and 1000  $\mu\text{g/ml}$  around 18% ( $P<0.05$ ) and 30% ( $P<0.001$ ), respectively, whereas at the 250  $\mu\text{g/ml}$  no reduction was observed (Fig 3.4 – a). For the 1000  $\mu\text{g/ml}$ , the inhibition was statistically similar to acarbose, which is a  $\alpha$ -glycosidases inhibitor used in clinical practice to improve glycemic control in diabetic patients, reducing the carbohydrates absorption (DiNicolantonio et al., 2015). The maltase enzyme activity was reduced by 25% when using extract concentrations of 250 and 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $P<0.01$ ), whereas at 1000  $\mu\text{g/ml}$  there was no inhibition (Fig. 3.4 – b). There was no inhibition of the enzyme lactase at the concentrations evaluated, a result similar to that seen with acarbose (Fig 3.4 – c). According to (Gomis, 2008), acarbose is a medicine that acts as an adjuvant in the treatment of diabetes, as it inhibits the maltase and sucrase enzymes thus preventing the disaccharides breakdown and consequent transport of glucose into the bloodstream. This compound is interesting because of this  $\alpha$ -glycosides restriction, since it does not induce lactose intolerance in the patient, and it does not inhibit lactase; as observed for the extract of *P. bipinnatifidum* at the 500  $\mu\text{g/ml}$  concentration.

Figure 3.4 Effect of the *P. bipinnatifidum* extract (ethyl acetate) on the activity of sucrase (a), maltase (b) and lactase (c) intestinal disaccharidases. C: control; A: acarbose 80  $\mu\text{g/ml}$ . Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. Asterisks denote statistical significance, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , in relation to control group. ANOVA followed by Tukey's test.



The antidiabetic potential of *P. bipinnatifidum* extract is related to the presence of flavonoids in its composition, as flavonoids may exert beneficial effects in diabetes, due enhancing insulin secretion and promoting proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells, improving hyperglycemia through regulation of glucose metabolism in hepatocytes (Babu et al., 2013). In vitro studies showed that luteolin is an effective maltase inhibitor, while lower inhibition was observed against sucrose (Matsui et al., 2002). The anti-diabetic effect of quercetin was investigated in STZ-induced diabetic mice by (Kobori et al., 2009), and dietary supplementation with quercetin lowered blood glucose and enhanced serum insulin concentrations. These results demonstrate that the ethyl acetate fraction of *P. bipinnatifidum*, rich in flavonoids, should be better investigated for its antidiabetic action, by *in vivo* test.

### 3.4 CONCLUSION

The antimicrobial activity of *P. bipinnatifidum* extracts against *S. pyogenes* was high for the extract obtained with ethyl acetate solvent, and low for the extract obtained with ethanol. This result is directly related to the chemical composition of different extracts, where compounds with antimicrobial activity are present in greater amounts in the extract with ethyl acetate, such as quercetin, luteolin and apigenin. Antioxidant activity was high for both extracts, however due to higher concentration of flavonoids in ethyl acetate extract, this showed the highest antioxidant activity, comparable with standard solutions of ascorbic acid. Besides that, we believe that the fraction extracted with ethyl acetate exhibit a promising profile of antidiabetic potential and is good candidate for more in-depth evaluation.

### 3.5 REFERENCES

- Abdel-Nabi EE, Ibrahim MA, Samir ME, Laila ARMS. Antiproliferative effect of phenolic glucosides isolated from *Philodendron bipinnatifidum* on HepG2 cells. *Phytopharmacol*, 2012; 3:351–358.
- Akram M, Hamid A, Khalil A, Ghaffar A, Tayyaba N, Saeed A, Ali M, Naveed A. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2014, 27:313–319
- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*, 2013, 117:426–436.
- Babu PVA, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem*, 2013, 24:1777–1789.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996, 239:70–76.

- Boligon AA, Piana M, Kubiça TF, Mario DN, Dalmolin TV, Bonez PC, Weiblen R, Lovato L, Alves SH, Campos MMA, Athayde ML. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *J Appl Biomed*, 2015, 13:7–18.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*, 1995, 28:25–30.
- Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 87:218–228.
- CLSI (2015) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*
- DiNicolantonio JJ, Bhutani J, O’Keefe JH. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Open Heart*, 2015, 2:e000327.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*, 1956, 28:350–356.
- Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. *Streptococcus Pyogenes Basic Biol Clin Manif*, 2016, 1–15.
- Ganeshpurkar A, Bansal D, Dubey S, Dubey N. Experimental studies on bioactive potential of rutin. *Chron Young Sci*, 2013, 4:153.
- Gomis R. Inhibidores de las disacaridasas. *Endocrinol Nutr*, 2008, 55:13–16.
- Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 2006, 217:213–220.
- Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced



- disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53:859–868.
- Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*, 2002.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193:265–275.
- Lucarini R, Tozatti MG, Silva ML, Gimenez VM, Pauletti PM, Groppo M, Turatti IC, Cunha WR, Martins CH. Antibacterial and anti-inflammatory activities of an extract, fractions, and compounds isolated from *Gochnatia pulchra* aerial parts. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48:822–830.
- Matsui T, Kobayashi M, Hayashida S, Matsumoto K. Luteolin, a Flavone, Does Not Suppress Postprandial Glucose Absorption Through an Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase Action. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66:689–692.
- Menezes PR, Schwarz EA, Santos CAM. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia*, 2004, 75:398–400.
- Mihaylova D, Schalow S. Antioxidant and stabilization activity of a quercetin-containing flavonoid extract obtained from Bulgarian *Sophora japonica* L. *Braz Arch Biol Technol*, 2003, 56:431–438.
- Muelas-Serrano S, Nogal JJ, Martínez-Díaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR, Gómez-Barrio A. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71:101–107.
- Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res*, 2010, 165:496–504.
- Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol*, 2010, 140:164–168.
- Pereira DF, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MS, Guedes A, Pizzolatti MG, Silva FR. Effects of flavonoids on  $\alpha$ -

glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif, 2011, 27:1161–7.

Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EM, Lakshminarasaiiah U, Gopas J, Nishigaki I. Antioxidants and human diseases. Clin. Chim. Acta, 2014, 436:332–347.

Santos MS, Lima JJ, Petkowicz CLO, Candido LMB. Chemical characterization and evaluation of the antioxidant potential of gabiropa jam (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). Acta Sci Agron, 2013, 35:1–10.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int J Pharm, 2011, 403:136–138.

Silhavy T, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2:1–16.

Siriwong S, Thumanu K, Hengpratom T, Eumkeb G. Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. Evid Based Complement Alternat Med 2015.

Thabit AK, Crandon JL, Nicolau DP. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. Expert Opin Pharmacother, 2015, 16:159–77.

Xia DZ, Yu XF, Zhu ZY, Zou ZD. Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus* spp.) in China. Nat Prod Res, 2011, 25:1893–1901.

Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. LWT - Food Sci Technol, 2008, 41:1060–1066.

Zhang M, Swarts SG, Yin L, Liu C, Tian Y, Cao Y, Swarts M, Yang S, Zhang SB, Zhang K, Ju S, Olek DJ Jr, Schwartz L, Keng PC, Howell R, Zhang L, Okunieff P. 2011. Antioxidant properties of quercetin. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. pp 283–289.

## CAPÍTULO 4

Os resultados apresentados neste capítulo estão escritos no formato de artigo científico, intitulado “Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae)”, o qual foi submetido à revista *Journal of Ethnopharmacology*.

### **Abstract**

*Ethnopharmacological relevance:* Popular medicine use stems of *Philodendron bipinnatifidum* (Araceae) in inflammation cases, such as in erysipelas, as well as orchitis and rheumatism treatment. The present study, conducted for the first time in literature, investigate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *P. bipinnatifidum* stems ethyl acetate extract (EPB).

*Materials and methods:* GC/MS and HPLC analysis were performed for EPB extract. We used EPB at 250, 375 and 500 mg/kg (oral route, p.o.) in male Swiss mice. The antinociceptive activity of the plant extract assessed by acetic acid induced writhing and formalin tests. To investigate the possible participation of opioid system in EPB-mediated effects, we previously administered naloxone to the mice. Anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan-induced paw oedema. The open-field test aimed to investigate the possible EPB effects on the locomotor and exploratory activities. To assess the protective role of EPB on carrageenan-induced oxidative stress, the levels of NPSH, TBARS, as well as SOD and CAT activities were evaluated in blood and paw tissue. The acute toxicity of the EPB was investigated using OECD 423 guideline.

*Results:* The EPB chemical analysis by GC/MS and HPLC revealed the presence of flavonoids (luteolin and quercetin) and phytosterols ( $\beta$ -sitosterol and stigmasterol). The oral treatment with the EPB inhibited mice abdominal writhings ( $P < 0.01$ ) at 375 and 500 mg/kg, and reduced the formalin effect at the first-phase (500 mg/kg,  $P < 0.05$ ) and also at the second-phase (500 mg/kg,  $P < 0.001$ ) of the test. EPB (375 and 500 mg/kg) did not alter spontaneous locomotion in open field test, however the number of fecal bolus was significantly lower for the EPB group at 500 mg/kg when compared to the vehicle group ( $P < 0.05$ ). The pretreatment with naloxone caused significant inhibition of antinociceptive activity induced by EPB in the formalin test, revealing the possible involvement of opioid receptors. EPB extract administered at 500 mg/kg (p.o.)

prevented carrageenan-induced paw oedema ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ) until 6 hours after carrageenan injection. Evaluation of TBARS and NPSH levels, SOD and CAT activities in the blood and paw tissue of animals submitted to the carrageenan assay suggested that the anti-inflammatory effect of EPB may be linked to oxidative stress inhibition. The acute administration of the EPB (2000 mg/kg, p.o.) caused no mortality, demonstrating low toxicity.

*Conclusions:* The extract of *P. bipinnatifidum* displays antinociceptive and anti-inflammatory activities, causing no toxicological effects. The pharmacological activity of this vegetal species may be related to the presence of flavonoids and phytosterols. Our results support the ethnomedical use of this vegetal species as analgesic and anti-inflammatory agent.

*Keywords:* antinociception, inflammatory pain, medicinal plant, *Philodendron bipinnatifidum*.

### **Abbreviations**

EPB: ethyl acetate extract of *P. bipinnatifidum*. HPLC: High Performance Liquid Chromatography. GC/MS: gas chromatography with mass spectrometer. LOD: limit of detection. LOQ: limit of quantification; NPSH: *non-protein* sulfhydryls. SOD: superoxide dismutase enzyme. CAT: catalase. TBARS: thiobarbituric acid reactive substances. OECD: Organization for Economic Co-operation and Development. COX: cyclooxygenase. NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs. PMNs: polymorphonuclear neutrophils. LD<sub>50</sub>: median lethal dose.

## **4.1 Introduction**

The interest and the use of medicinal plants by humans and the recognition of their chemical properties are certainly related to the survival of the human species. The presence (and concentration) of secondary metabolites in plants arouses interest when it comes to pharmacological actions, aiming to identify bioactive compounds (phytochemicals) for diseases treatment (Wink, 2016). Currently, a wide variety of diseases uses many of the drugs originally isolated from plants or have semisynthetic analogs from phytochemicals. It is estimated that approximately 25% of all currently prescribed medications are plant originated. In addition, around 75% of new anticancer drugs marketed between 1981 and 2014 derived from plant compounds (Newman and Cragg, 2016). The interest in plant extracts initially occurs through reports

of popular knowledge, which can often be scientifically proven through *in vitro* and *in vivo* tests.

The *Philodendron bipinnatifidum* plant Schott ex Endl (Araceae) is a shrub species found in South America tropical forests. In South and Southeast Brazil folk medicine, it is called "guaimbe", "banana-de-bugre" or "banana-co" and its stems are traditionally used for rheumatism treatment (Albertasse et al., 2010), as well as against orchitis, erysipela, ulcers and intestinal parasites (Alzugaray and Alzugaray, 1996; Mors et al., 2000). The popular use of aerial roots as contraceptive are referred to Balbach (1979). Also, there are reports of antitumor, anesthetic and anti-inflammatory activities of its leaves and stems; however, the popular use of stems are more frequent (Lorenzi and Matos, 2002).

Previous studies showed that hydroalcoholic extracts from *P. bipinnatifidum* roots have potential antioxidant effect (Menezes et al., 2004). Furthermore, the aqueous extract of branches and leaves present antiprotozoal activity (Muelas-Serrano et al., 2000), and the isolated antiproliferative effect of phenolic glucosides from this plant was already demonstrated on HepG2 cells (El-Deeb, 2012). Scapinello et al. (2018) identified three phytosterols in the ethyl acetate fraction of *P. bipinnatifidum* stem; campesterol,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, emphasizing that these two last compounds already present antinociceptive and anti-inflammatory activity described in the literature (Githinji et al., 2012, Nirval et al., 2012, Dighe et al., 2016, Paniagua-Pérez et al., 2016). In the ethanolic extract only  $\beta$ -sitosterol was identified, and still in smaller quantity when compared to the ethyl acetate fraction (Scapinello et al., 2018).

To the best of our knowledge, there are no scientific preclinical studies supporting the traditional use of *P. bipinnatifidum* so far. Moreover, the analgesic or anti-inflammatory activities of this vegetal species have not been studied yet, neither its possible toxicity. The numerous risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for pain and inflammation treatment suggest the use of medicinal herbs as alternative therapies (Simon, 2013). From the reported data, it is important to investigate the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the ethyl acetate fraction of *P. bipinnatifidum* (EPB) in pre-clinical tests as well as its acute toxicity for the first time.

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Plant material and extraction

We collected *P. bipinnatifidum* stems and leaves samples on July 2017 (winter) from Chapecó city native plants, in Southern Brazil (27° 05' S, 52° 40' W). The characteristic of this region is a humid subtropical mesothermal climate. Voucher specimens were deposited on the Herbarium at Universidade Comunitária de Chapecó (Herbarium Unochapecó, SC, Brazil) under the accession number UNO 3470.

After collection, stems were manually separated from the leaves, and just the stems were cut and dried (40 °C for 2 days) and then milled in an industrial blender. The milled stems were subjected to maceration using ethyl acetate PA solvent in a ratio of 1:20 grams of plant material per litre of solvent, and homogenized for two days at intervals of 12 h. Thereafter, the extract was filtered and the solvent removed in a rotary evaporator under reduced pressure. Finally, the extract was frozen at -80 °C and lyophilized for 24 h.

### 4.2.2 HPLC Analysis

All chemical were analytical grade. High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

The injection of *P. bipinnatifidum* extract was into reversed phase Phenomenex C<sub>18</sub> column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles. The mobile phases A and B were Milli-Q water, acidified to pH 2.0 with 1% of formic acid and methanol, correspondingly. Solvent gradient was used as follows: 0-10 min, 5% B; 10-25 min, 15% B; 25-40 min, 30%; 40-55 min 50% B; 50-65 min 70% B; 65-80 min, 100% B, following the method described by Waczuk et al. (2015) with slight modifications. The sample and mobile phases were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the methanol: water (1:1, v/v) at a concentration range of 0.030 - 0.500 mg/mL. Quantifications were carried out by the integration of the peaks using the external standard method, at 270 nm for gallic acid; 325 nm for caffeic acid and chlorogenic acid; and 366 for

quercetin, rutin, luteolin and apigenin. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curves of the compounds: gallic acid:  $Y = 11957x + 1308.1$  ( $r = 0.9997$ ); caffeic acid:  $Y = 13259x + 1164.5$  ( $r = 0.9999$ ); apigenin:  $Y = 14386x + 1247.0$  ( $r = 0.9996$ ); chlorogenic acid:  $Y = 10985x + 1274.3$  ( $r = 0.9998$ ), quercetin:  $Y = 12763x + 1405.9$  ( $r = 0.9999$ ); rutin:  $Y = 10863x + 1354.7$  ( $r = 0.9997$ ) and luteolin:  $Y = 13462x + 1184.9$  ( $r = 0.9994$ ). All of the chromatography operations were carried out in room temperature and in triplicate runs.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Boligon et al. (2015). The calculation of LOD and LOQ were 3.3 and 10  $\sigma/S$ , respectively, where  $\sigma$  is the response standard deviation and  $S$  is calibration curve slope.

#### 4.2.3 GC/MS analysis

Gas chromatography analysis was performed on Agilent GC/MS (7890B) equipment coupled to a quadripolar mass spectrometer (5977A) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The experimental conditions of the GC/MS system were described by Scapinello et al. (2018). The chemical components present in the extracts were identified by comparison with the equipment library (The National Institute of Standards and Technology, 2004). The relative amounts of each individual component were calculated using their respective peak areas in the chromatogram.

For the  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol quantification, the calibration curves were prepared by serial dilutions at concentration range of 0.35 to 1.75 mg/mL. Quantifications were performed by integrating the compound peak area. The calibration curves equations were obtained, being  $\beta$ -sitosterol:  $y=58,212,297x-2,382,298$  ( $r = 0.9968$ ) and stigmasterol:  $y=91,591,756x-2168640$  ( $r = 0.9952$ ). To analyse, extracts were solubilized in dichloromethane.

#### 4.2.4 Animals

Male *Swiss* mice (20-30 g) bred in-house were used in all behavioural experiments. Non-pregnant and nulliparous female mice (30-35g,  $n = 3-6$ /group) were used for toxicity analysis. A controlled

environment kept the animals ( $22 \pm 2$  °C) with a 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m. to 6 p.m.), fed standard lab chow and water *ad libitum*. The animal care and experiments were conducted in accordance to the ethical principles of animal research, approved by Universidade Comunitária Regional de Chapecó Ethics Committee (approval number 007-17), in accordance with Brazilian law (Brazil, 2016, 2008) and European Communities Council Directive from 24 November 1986 (86/609/EEC). All experiments were carried out between 8:00 a.m. and 6:00 p.m. Experimenters were blinded to treatment conditions.

#### 4.2.5 Acetic acid-induced writhing response

The abdominal writhing number induced by the intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid (0.6%, 10 mL/kg) counted cumulatively over a period of 20 min and considered as indicative of nociception (Koster et al., 1959). Initially, the animals (n=6-8/group) were pretreated with different doses of EPB (250, 375, or 500 mg/kg, intragastric route (p.o.)) indomethacin (10 mg/kg, p.o., used as a positive control), or vehicle (0.9% NaCl, 1% Tween 80, 10 mL/kg, p.o., control group) 1 h prior to the i.p. injection of acetic acid.

The dose that presented the best result in this experiment was chosen to be used in the other tests of nociception and inflammation.

#### 4.2.6 Open-field test

The open-field test was performed in order to evaluate the possible effects of the EPB on the locomotor and exploratory activities, and was performed according to Müller et al. (2012) with minor modifications. For this purpose, mice (n=6-8/group) orally received the EPB doses that significantly reduced the nociceptive behavior in the acetic-acid writhing test 1 h before being observed in the open-field. The control group was orally treated with vehicle (0.9 % NaCl, 1 % Tween 80, 10 mL/kg). Animals were individually placed in an acrylic box (40 × 30 × 30 cm), in a 24 squares equally divided floor. After the habituation to arena for 5 min, the number of squares crossed with the four paws (crossing), rearing and grooming was recorded in a 10 min session by human observers blind to the treatment. Then, the number of fecal bolus was counted and the apparatus was cleaned with 70% ethanol after each mice exposition.



#### 4.2.7 Formalin test

The procedure was similar to the previously described method (Santos et al., 1999). The animals (n=6-8/group) were treated with vehicle (0.9 % NaCl, 1 % Tween 80, 10 mL/kg, p.o., control group), EPB (500 mg/kg, p.o.) 1 h before the injection of 2 % formalin (20  $\mu$ L/paw, ipl) in the right hind paw. Indomethacin was used as a positive control (10 mg/kg, p.o., administered 1 h before the test). Immediately after the formalin injection, the animal was observed on pain-related behavior. The time spent licking, biting or lifting the injected hind paw was considered as nociceptive behavior and measured during the first phase (0-5 min, neurogenic phase) and the second phase (15-30 min, inflammatory phase) of the test.

#### 4.2.8 Carrageenan-induced paw oedema

Animals were subcutaneously injected (s.c.) under the plantar surface of the right hind paw with 20  $\mu$ L of carrageenan (300  $\mu$ g/paw, in 0.9% NaCl), which was performed 1 h after the administration of EPB (500 mg/kg, p.o.), indomethacin (20 mg/kg, p.o.) or vehicle (0.9% NaCl, 1% Tween 80, 10 mL/kg, p.o.) as described before (Oliveira et al., 2009). Hind paw oedema formation was described as  $\Delta$ paw thickness = test paw thickness – basal paw thickness; paw thickness was measured using a caliper (Trevisan et al., 2012).

#### 4.2.9 Biochemical analysis

Biochemical analysis was performed with the animals submitted to the carrageenan test. Blood and inflamed paw tissue were collected 3 h after the induction of inflammation. For the collection of paw tissue, 4 animals from the same group were used to make a sample (pool).

The paw tissue was homogenized (1:10 w/v) in a Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) solution at 4 °C. A reserved part of this homogenate was used for NPSH assays, and the remainder centrifuged for 10 min at 3,000 rpm, 4 °C.

The blood was collected in heparinized tubes and then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Trichloroacetic acid 4% was added to a fraction of the supernatant to determine NPSH levels. In the other fraction of supernatant, trichloroacetic acid 40% was added to determine TBARS levels, then the tubes were centrifuged again for 10 min at 3000 rpm and the final supernatant was used for the assays.

NPSH content was determined according to Ellman (1959), with minor modifications. Lipid peroxides were estimated using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to Ohkawa et al. method (1979). The activity of superoxide dismutase enzyme (SOD) was assayed by the method of Fridovich (1972) and catalase (CAT) activity was assessed by the method of Aebi (1984). Total proteins were quantified by the method of Lowry et al. (1951).

#### *4.2.10 Opioid receptor involvement in the EPB antinociceptive activity*

To examine the possible role of the opioid system in the antinociceptive effect of the EPB, mice were pre-treated with naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist; 2 mg/kg, i.p.) or vehicle (0.9 % NaCl, 10 mL/kg, i.p.) as described by Trevisan et al. (2013). After 15 min, the animals were treated with EPB (500 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, s.c.) or vehicle (0.9% NaCl, 1% Tween 80, 10 mL/kg, p.o.). Spontaneous nociception was evaluated immediately after the intraplantar injection of formalin and the test was performed 1 hour after the oral treatment or 30 min after the subcutaneous treatment.

#### *4.2.11 Acute toxicity*

The guideline of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) based the acute toxicity study. The worldwide-recognized OECD Test Guideline is the standard reference tool for chemical testing. The acute oral toxicity in mice adopted The Guideline 423 (2001).

Briefly, animals received a single EPB dose of 2000 mg/kg by gavage (n=6). The control group (n=3) was orally treated with a single administration of vehicle (0.9% NaCl, 1% Tween 80, 10 mL/kg). After that, observed animals had special attention during the first 4 hours after treatment and daily for 14 days. The occurrence of mice death and gross behavior such as piloerection, palpebral ptoses, abdominal contortions, locomotion, hypothermia, muscular tonus, shacking, posterior paws paralysation, salivation, bronchial secretion and convulsions were registered. . In addition, the body weight and food intake were recorded for 13 days.

#### 4.2.12 Reagents and drugs

Ethyl acetate, acetic acid and formaldehyde were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Flavonoids gallic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, quercetin, rutin, luteolin and apigenin, and phytosterols  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Naloxone and morphine were purchased from Cristália (São Paulo, Brazil). Indomethacin and carrageenan were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other Analytical grade reagents were purchased from local suppliers.

#### 4.2.13 Statistical analysis

The results of antinociceptive and anti-inflammatory activities are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of  $n$  animals per group. Statistical analysis of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test. The analysis of toxicity data used two-way repeated measures ANOVA.  $P$  values less than 0.05 were considered significant.

### 4.3 Results

#### 4.3.1 Phytochemical analysis

The EPB HPLC analysis revealed the presence of gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, quercetin, luteolin and apigenin, with the major components being luteolin and quercetin, with concentrations of 11.04 and 9.47 mg/g, respectively (Table 1). The EPB GC/MS analysis revealed the presence of the two phytosterols,  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, with concentrations of 133.03 and 39.68 mg/g, respectively (Table 4.1).

Table 4.1 - Compounds determined by HPLC and GC/MS in ethyl acetate fraction of *P. bipinnatifidum*.

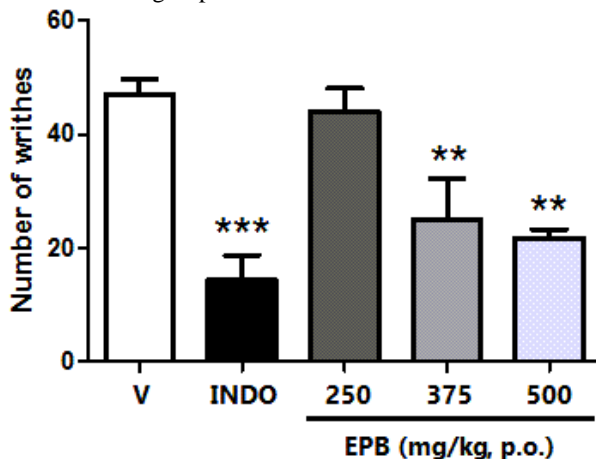
Method of analysis	Compound	Concentration	LOD	LOQ
		mg/g	µg/mL	µg/mL
HPLC	Gallic acid	6.02 ± 0.03	0.024	0.079
	Chlorogenic acid	0.61 ± 0.05	0.013	0.042
	Caffeic acid	4.23 ± 0.01	0.017	0.056
	Rutin	1.75 ± 0.01	0.008	0.026
	Quercetin	9.47 ± 0.04	0.011	0.035
	Luteolin	11.04 ± 0.01	0.025	0.083
	Apigenin	4.19 ± 0.02	0.009	0.029
GC/MS	β-sitosterol	133.03 ± 0.18	0,013	0.409
	Stigmasterol	39.68 ± 0.15	0.078	0.236

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations. LOD: detection limit, LOQ: quantification limit.

#### 4.3.2 Acetic acid-induced abdominal writhing test

The acid acetic (0.6%, i.p.) promoted successive abdominal writhing in the mice. The EPB (375 and 500 mg/kg, p.o.) and indomethacin (10 mg/kg, p.o.), reduced the number of abdominal writhing caused by acetic acid injection when compared to the vehicle group. The EPB caused an inhibition of 46.80% ( $P < 0.01$ ) and 53.54% ( $P < 0.01$ ) at 375 and 500 mg/kg, respectively. Additionally, indomethacin (10 mg/kg) exhibited significant 69.36% ( $P < 0.001$ ) inhibition of the abdominal writhes in the test (Fig. 4.1).

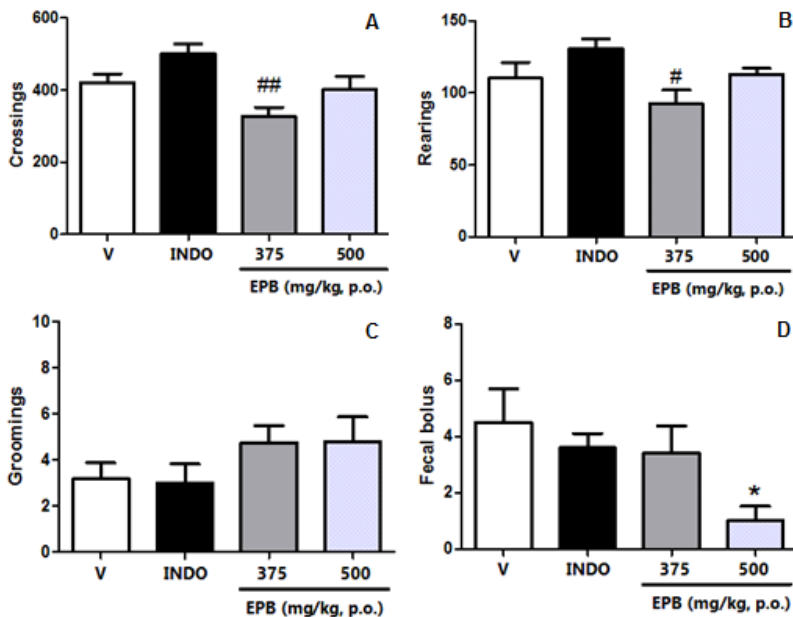
Figure 4.1. Effect of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate fraction (EPB) in mice acetic-acid induced abdominal-writhing test. V: vehicle-treated group (NaCl 0.9% + Tween 1%, 10 mL/kg p.o., n=8). INDO: indomethacin (10 mg/kg p.o., n=6) or EPB (250, 375 and 500 mg/kg p.o., n=6-8), 1 hour before acid acetic administration. Each column represents the mean±S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, \*\* $P<0.01$  and \*\*\* $P<0.001$ : different from the vehicle group.



#### 4.3.3 Open-field test

The evaluation of the effect of EPB and indomethacin on motor performance of animals lasted 15 min. This test was performed due to possible motor alterations induced by the EPB, that could interfere in the measurement of nociception. The EPB (375 and 500 mg/kg, p.o.) or indomethacin (10 mg/kg, i.p.) did not alter spontaneous locomotion, evaluated by the number of squares crossed with the four paws (crossing), rearing and grooming when compared to the group that received only vehicle, as can be seen in the Figures 4.2 A, B and C. The number of fecal bolus was significantly lower for the EPB group at 500 mg/kg when compared to the vehicle group ( $P<0.05$ ) (Fig. 4.2 D).

Figure 4.2. Effect of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) on mice locomotor activity (open field test). A: number of crossings. B: number of rearings. C: number of groomings. D: number of fecal bolus at the end of test. V: vehicle-treated group (NaCl 0.9% + Tween 1%, p.o., n=6). INDO: indomethacin (10 mg/kg, n=6). EPB (375 and 500 mg/kg, p.o., n=6). Each column represents the mean±S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test., \* $P<0.05$  in relation to vehicle group. # $P<0.05$  and ## $P<0.01$  in relation indomethacin group.

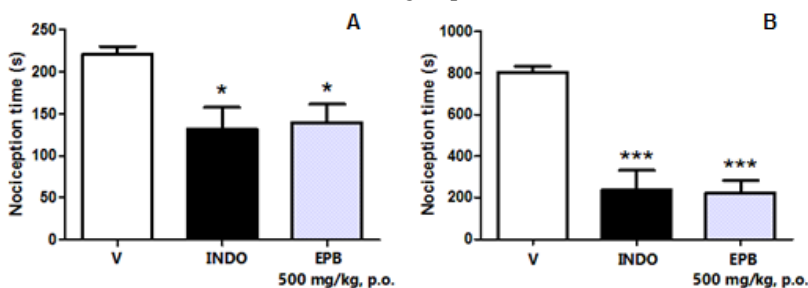


#### 4.3.4 Formalin test

In this test, the paw lifting or licking induced by formalin were cumulatively counted over a period of 0-5 min after formalin injection, which corresponds to neurogenic nociception (first phase of the test) and 15-30 min after formalin injection, which corresponds to inflammatory nociception (second phase of the test). EPB (500 mg/kg, p.o.) and indomethacin (10 mg/kg, i.p.) produced antinociception in both phases of the formalin test (Fig. 4.3 A and B). During the neurogenic phase, the EPB as well as indomethacin reduced the nociception around 40% ( $P<0.05$ ) when compared to the vehicle group, whereas for the

inflammatory phase there was a significant reduction around 70% ( $P < 0.001$ ).

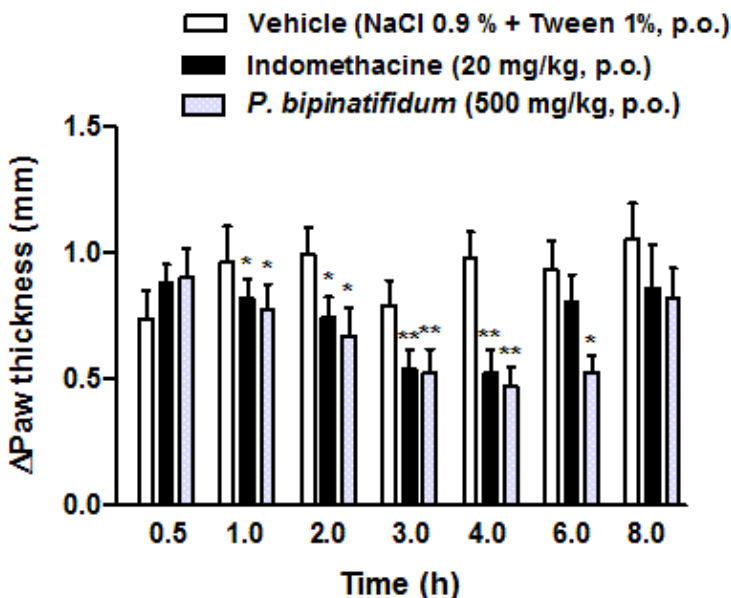
Figure 4.3. Effect of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) in mice nociceptive behavior assessed in the formalin-induced nociception test. Nociceptive behavior was considered as the time spent licking/biting or lifting the paw in the first-phase (A, 0-5 min) or second-phase (B, 15-30 min) of the test. V: vehicle-treated group (NaCl 0.9% + Tween 1%, 10 ml/kg p.o., n=8). INDO: indomethacin (10 mg/kg p.o., n=6) or EPB (500 mg/kg, p.o., n=6), 1 hour before formalin 2% administration. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , different from the vehicle group.



#### 4.3.5 Carrageenan-induced paw oedema

Figure 4.4 shows the effect of EPB and indomethacin at different time points in carrageenan-induced paw oedema model. The administration of EPB at 500 mg/kg (p.o) prevented carrageenan-induced paw oedema with inhibition percentages of 37.15, 40.63, 43.34, 49.73 and 43.47 ( $P < 0.05$  and 0.01) at 1, 2, 3, 4 and 6 hours after carrageenan administration (i.p.), respectively. Indomethacin (20 mg/kg, p.o.) prevented carrageenan-induced paw oedema with inhibition percentages of 30.25, 29.18, 40.68 and 43.77 ( $P < 0.05$  and 0.01) at 1, 2, 3 and 4 hours after carrageenan administration (i.p.), respectively.

Figure 4.4 Effect of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) (500 mg/kg, p.o.) on mice paw oedema induced by carrageenan. V: vehicle-treated group (NaCl 0.9% + Tween 1%, p.o., n=8). Groups of mice were pre-treated with vehicle (10 ml/kg p.o., n=12), Indomethacin (INDO, 20 mg/kg p.o., n=12), or EPB (500 mg/kg, p.o., n=12) 1 hour before carrageenan-induced paw oedema (300 µg/paw). Measurements were performed at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h after the intraplantar injection of carrageenan. Each column represents the mean±S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01, as compared to vehicle group.



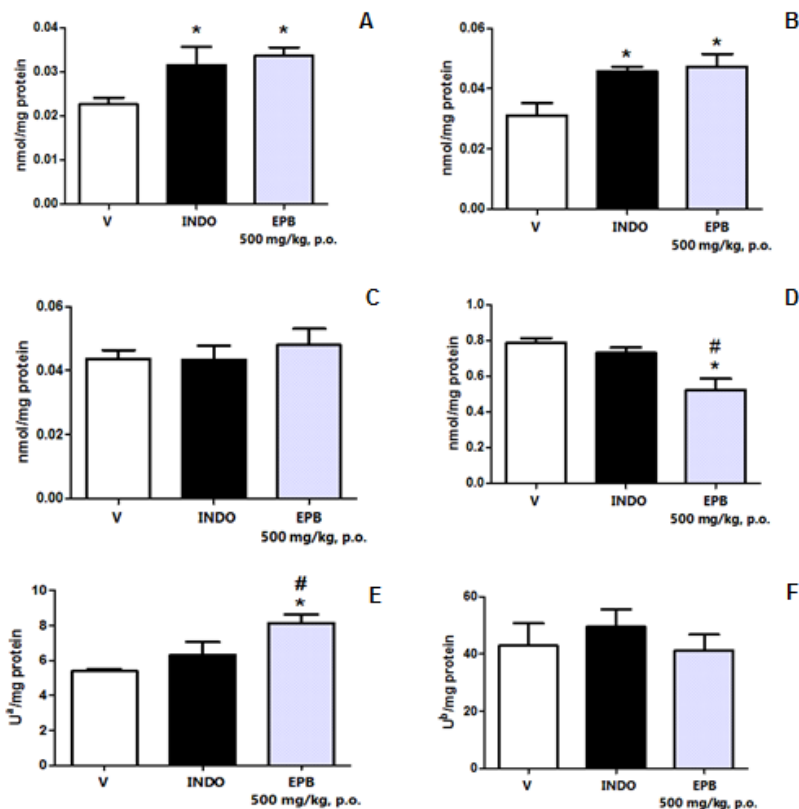
#### 4.3.6 Antioxidant levels in blood and paw tissue

To assess the protective role of EPB on carrageenan-induced oxidative stress, mice were euthanized 3 hours after the algogenic stimulus, since the maximal EPB effect in the test was observed at this time point. Carrageenan elicited a reduction in NPSH levels, in the blood (Fig. 4.5 A) as well as in the paw tissue (Fig. 4.5 B). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were not altered in mice blood (Fig 4.5 C); however, a significant ( $P$ <0.05) reduction in TBARS levels of the paw tissue was observed in the carrageenan+EPB-treated group (Fig 4.5 D).



Additionally, carrageenan injection decreased SOD activity in the paw tissue, which was prevented by EPB treatment ( $P<0.05$ ) (Fig. 4.5 E). No alterations in CAT enzyme activity were observed between the groups (Fig 4.5 F).

Figure 4.5. Effects of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) (500 mg/kg, p.o.) on antioxidant levels in mice blood and paw tissue. A: NPSH levels (nmol/mg protein) in the blood. B: NPSH levels (nmol/mg protein) in the paw tissue. C: Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels (nmol/mg protein) in the blood. D: TBARS levels (nmol/mg protein) in the paw tissue. E: Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in the paw tissue ( $U^a$ : enzyme concentration required to inhibit chromogen production by 50% in 1 min). F: Catalase (CAT) enzyme in the paw tissue ( $U^b$ : micromole  $H_2O_2$  decomposed per minute). Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, \* $P < 0.05$  as compared to vehicle group, # $P < 0.05$  as compared to Indomethacin group.

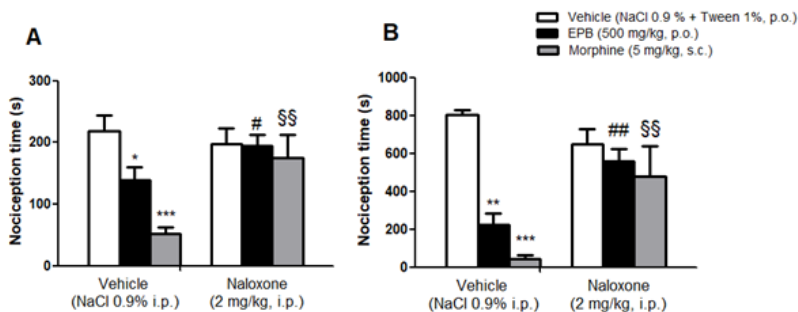


#### 4.3.7 Opioid receptor involvement in the EPB antinociceptive activity

Naloxone is a specific opioid receptor antagonist in the central nervous system, capable to block the effect of anesthetics, such as

morphine (which was used as the positive control of the assay). This test investigated the possible involvement of opioid receptors in the mechanism of EPB action. Naloxone treatment (2 mg/kg, i.p.) fully prevented the antinociceptive effect of EPB (500 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg, s.c.) in the formalin test in both phases [neurogenic (Fig. 4.6A) -  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively - and inflammatory (Fig. 4.6B) -  $P<0.01$ ].

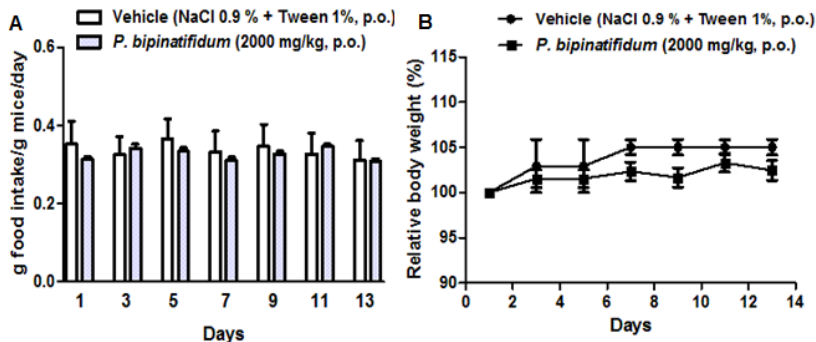
Figure 4.6. Effect of mice pretreatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive effect of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) (500 mg/kg, p.o.) in the formalin test. Nociceptive behavior was considered as the time spent licking/biting or lifting the paw in the first-phase (A, 0-5 min) or second-phase (B, 15-30 min) of the test. Morphine (5 mg/kg, s.c.) was used as positive control of the test. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M (n=4-7 mice/group). One-Way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test, \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  as compared with vehicle plus vehicle group. # $P<0.05$ ; ## $P<0.01$  as compared to vehicle plus EPB group; §§ $P<0.01$  as compared to vehicle plus morphine group.



#### 4.3.8 Acute toxicity

There was neither significant change in mice's gross behavior nor toxicity signs throughout the experimental period. The ingestion of the extract did not affect mice food intake (Fig. 4.7 A) and body weight (Fig. 4.7 B). No death was recorded, and therefore the oral toxicity of the EPB can be classified in category 5 (the lethal acute toxicity is greater than 2000 mg/kg) according to the Globally Harmonized Classification System of OECD (Guideline 423, 2001).

Figure 4.7. Effect of the *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) acute treatment (2000 mg/kg, p.o.) on mice food intake (A) (g food intake/g mice/day) and relative body weight (%) (B). Data are expressed as mean + S.E.M. Two-way repeated measures ANOVA.



#### 4.4 Discussion

The present study demonstrates for the first time that *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract (EPB) at 500 mg/kg (p.o.) displays antinociceptive and anti-inflammatory properties, and provides some evidence on the mechanisms implicated in these effects. Furthermore, the oral administration of EPB at this dose did not induce any behavioral adverse effect. Also, the acute EPB administration (at 2000 mg/kg, p.o.) was not related to mice mortality during 14 days, which demonstrates that the extract is devoid of acute toxicity according to the OECD Guideline 423 (2001).

Initially, our results showed that EPB (p.o.) produces significant antinociception in the acetic acid writhing test at 375 and 500 mg/kg. This model is sensitive to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as indomethacin (Collier et al., 1968), and is used to detect the potential antinociceptive activity of new drugs. It is known that acetic acid injection evokes abdominal writhes, since it elicits the peripheral production of several pro-inflammatory mediators, e.g. prostaglandin, bradykinin, substance P, prostacyclin and other cytokines, which, therefore, excite the nociceptors in the nerve terminals (Franzotti et al., 2000; Hosoi et al., 1999).

In this study, we used this test to select an effective antinociceptive dose to continue the other behavioral tests. Considering the smaller number of abdominal writhing and the lower standard error, we chose the dose 500 mg/kg.

It is necessary to consider that many drugs elicit false-positive responses in nociceptive tests due to sedation and motor activity impairment (Trevisan et al., 2012). Therefore, we evaluated whether the EPB was able to cause some adverse effects on locomotor and exploratory activities. Neither EPB at 500 mg/kg nor indomethacin altered the spontaneous locomotion of mice; however, the EPB at 375 mg/kg resulted in a lethargic locomotor activity when compared to indomethacin. Considering these results, we chose use the EPB dose of 500 mg/kg in the subsequent experiments.

We also investigated the effects of EPB in the formalin test, and observed that the extract at 500 mg/kg, similarly to indomethacin, inhibits the paw licking or lifting induced by formalin, both in the first- and second-phases of the test. The first phase of formalin test is associated to neurogenic pain, when the activation of nociceptive neurons occurs, while the second phase is related to the release of inflammatory mediators, such as histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins (Abbott et al., 1995). EPB was more effective on the nociceptive behavior induced by formalin during the inflammatory phase of the test, which suggests that EPB effectiveness is better in alleviating the pain triggered by the inflammatory process.

It is well known that NSAIDs inhibit the action of cyclooxygenase (COX) (Meek et al., 2010; Süleyman et al., 2007). Indeed, these drugs are also more effective in inhibiting the nociceptive behavior during the second phase of the test. Therefore, our results suggest that the EPB might produce antinociceptive action through inhibition of COX and, consequently, prostaglandin synthesis. Nevertheless, investigation of this hypothesis can go further.

The analysis of EPB chemical constitution revealed that it is enriched in flavonoids. These results are relevant, since Verri et al. (2012) reported that quercetin, luteolin and rutin present antinociceptive activity. Therefore, it is possible that those compounds presented in the EPB contribute (at least in part) to the antinociceptive/anti-inflammatory effects observed in the present study. Other studies have demonstrated that the systemic administration of luteolin as well as plant extracts containing luteolin present antinociceptive effects on acute thermal pain and persistent inflammatory pain in rodents (Backhouse et al., 2008; Büyükkuroglu et al., 2008; Nsonde Ntandou et al., 2010). It has been reported that quercetin inhibits (*i*) the nociceptive behavior in the acetic acid-induced pain test, (*ii*) the nociceptive behavior induced by formalin in both phases of the test and also (*iii*) the nociception induced by

glutamate and capsaicin, through mechanisms that involve the interaction with L-arginine-nitric oxide, serotonin, and GABAergic systems (Filho et al., 2008). Additionally, the oral administration of gallic acid decreased the spontaneous nociception triggered by allyl isothiocyanate, cinnamaldehyde, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in male Swiss mice (Trevisan et al., 2014).

The presence of phytosterols in the EPB may justify its antinociceptive action, considering that  $\beta$ -sitosterol is the major compound of the EPB. Of note,  $\beta$ -sitosterol isolated from *Oxalis corniculata* leaves elicits an analgesic activity in the hot plate test and acetic acid-induced writhings in rodents (Dighe et al., 2016). Moreover, different plant extracts containing  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, as well as these isolated compounds, present antinociceptive action in the acetic acid-induced writhing, formalin and hot-plate tests in mice (Dina et al., 2010; Nirmal et al., 2012; Santos et al., 2011; Githinji et al., 2012, Tatiya et al., 2017).

Mice orally treated with EPB at 500 mg/kg expelled a significantly lower amount of fecal bolus when compared to vehicle-treated animals. This result has aroused interest in investigating the involvement of opioid receptors in the EPB antinociceptive action mechanism, considering that some analgesics that act as exogenous agonists of opioid receptors may lead to a delay in bowel movement, leading to constipation (Leppert, 2012).

To check the opioid involvement in the mechanism of EPB antinociceptive action in the formalin test we used an opioid antagonist, naloxone. The blockade of EPB effects by naloxone demonstrated the possible mechanism of central analgesic on the pain threshold of mice. Thus, it is possible that EPB exerts its effects through central opioid receptors or promotes the release of endogenous opioid peptides. Dighe et al. (2016) demonstrated that naloxone in the hot plate test reverses  $\beta$ -sitosterol antinociceptive activity. These results are particularly interesting, since  $\beta$ -sitosterol is the major constituent of the EPB. However, the administration of naloxone failed to antagonize the analgesic activity of stigmasterol in the formalin test (Githinji et al., 2012). Thus, considering the significant concentration of  $\beta$ -sitosterol in EPB, we suggest that this phytosterol may be, at least in part, responsible for the effects observed in the present study.

To assess the anti-inflammatory effect of EPB we used carrageenan-induced mice paw oedema. This animal model is widely employed in non-steroidal anti-inflammatory drug development and has been frequently used to assess this effect of plant extracts (Ben Khedir et al., 2016). In this model, the inflammatory response is quantified by an

increase in paw thickness, and NSAIDs reduce the swelling associated to this inflammatory stimulus (Bacchi et al., 2012). Our results demonstrate a marked reduction in mice paw oedema induced by carrageenan after the EPB administration, which was similar to the NSAID indomethacin. The effects of indomethacin lasted 4 hours, while the EPB at 500 mg/kg presented a prolonged effect, up to 6 h, showing that the anti-inflammatory activity of the extract remains for a longer period when compared to the reference drug indomethacin. These results are particularly relevant, since the oedematogenic response induced by carrageenan results from the rapid production of several inflammatory mediators such as histamine, serotonin and bradykinin in a first-phase. This is followed by the release of prostaglandins and NO in a second-phase (at 3 h), produced by inducible isoforms of COX (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS), respectively (Dray and Perkins, 1993). Therefore, our results allow us to suggest that the EPB effects could be mediated by the inhibition of prostaglandin and/or NO release, in accordance to the results of the formalin test.

Chen et al. (2014) suggested that luteolin may act as a potential therapeutic reagent for treating septic diseases, while Xia et al. (2016) reported that luteolin may exert potent anti-inflammatory effects on experimental autoimmune thyroiditis. Jeon et al. (2014) suggested that luteolin is a potential therapeutic agent against inflammation and itch-related skin diseases, since luteolin inhibited the secretion of inflammatory cytokines and significantly reduced the histamine release. In the carrageenan-induced paw oedema test, the oral administration of luteolin efficiently suppressed paw oedema, and it has been shown that luteolin may be a potent selective inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression. (Ziyan et al., 2007). Additionally, quercetin was reported as a substance that possesses strong anti-inflammatory properties that can be expressed on different cell types, both in animal and human models (Li et al., 2016), causing an anti-inflammatory response in the carrageenan-induced paw oedema in mice (Morikawa et al., 2003). Lee et al. (2007) reported that apigenin might be useful for therapeutic management of inflammatory diseases, stating that its anti-inflammatory activity involves the blockage of the nitric oxide-mediated COX-2 expression and monocyte adherence. Considering the data mentioned above, the anti-inflammatory activity of the EPB found in the carrageenan-induced paw oedema test as well as in the second-phase of the formalin test, might be attributable to its chemical constituents.

Moreover, the anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol has already been demonstrated in different animal models. In the rat paw oedema test induced by carrageenan, the oral administration of  $\beta$ -sitosterol caused an inhibitory effect around 50 to 70%. In the rat pleurisy assay, we observed a reduction of 46% in the volume of pleural exuded, as well as a low amount of neutrophils (20%) in comparison to the control group. In the mouse ear edema test,  $\beta$ -sitosterol demonstrated a mean inflammatory inhibition of 75%, inducing a significant inhibition of mieloperoxidase activity (Paniagua-Pérez et al., 2016). The petroleum ether extract of *Nyctanthes arbortristis* Linn. was active in reducing carrageenan-induced paw oedema in rats, and the results showed that  $\beta$ -sitosterol from *N. arbortristis* leaves might be responsible for the anti-inflammatory activity (Nirmal et al., 2012). It has also been reported by others authors that  $\beta$ -sitosterol or plant extracts containing this compound are able to inhibit rat paw oedema (Jiménez-Suárez et al., 2016; Saha et al., 2013; Dighe et al., 2016; Santos et al., 2011). The topical anti-inflammatory activity of *Eryngium foetidum* L. hexane extract (enriched in stigmaterol, 95%) as well as isolated stigmaterol were already demonstrated. Both the extract and stigmaterol significantly reduced the auricular oedema (acutely and chronically) and inhibit the meloperoxidase enzyme in rats, indicating that stigmaterol can be considered an important anti-inflammatory agent (García et al., 1999). Stigmaterol also inhibited dimethyl benzene-induced ear oedema, at the dose of 30 mg/kg, which was comparable to the anti-inflammatory activity of dexamethasone at 10 mg/kg (Githinji et al., 2012).

Considering the antioxidant properties of flavonoids and phytosterols present in the EPB, we evaluated whether the anti-inflammatory effect of the extract is associated to antioxidant action mechanisms, since reactive oxygen species are molecules that play an important role in the progression of inflammatory disorders. An increase in the amount of these species, generated by polymorphonuclear neutrophils (PMNs) at the site of inflammation, causes endothelial dysfunction and tissue injury (Mittal et al., 2014). The production of oxygen-free radicals triggered by the inflammation leads to decreased NPSH levels as well as SOD and CAT activities, as a consequence of their consumption during oxidative stress and cellular lysis (Lubrano, 2015). This effects contribute to increased cellular damage, since the cells experience the oxidative stress (when enhanced oxidant production overcome the capacity of antioxidant enzymes), therefore, favouring the attack by free radicals (Mohsin et al., 2013). Mice EPB treatment elicited an increase in NPSH levels and SOD activity, probably by competing



with the free radicals scavenging, and, therefore, probably helped to preserve the integrity of cellular membranes. CAT activity was not significantly altered by the EPB, which may be related to the time point at which the analysis was performed. Considering that CAT degrades the products resulting from SOD action (Mylona and Polidoros, 2000), possibly at the time of evaluation (3 h), we did not detect effect on the enzyme. Lipid peroxidation is an oxidative damage that occurs during inflammation, referring to high levels of TBARS (Mohsin et al., 2013). The TBARS levels were significantly decreased in EPB+carrageenan-treated mice, at least on the paw tissue. Thus, the extract may protect the formation of free radicals in the tissue, which might contribute to reduce inflammation. These results suggest that the administration of EPB may exert its anti-inflammatory effect by retarding lipid peroxidation and modulating the cellular antioxidant defence system.

Plants extracts are believed to be harmless than conventional drugs, without serious side effects, and are normally assumed to be safe and devoid of toxicity (Da Silva et al., 2014). Nevertheless, it is very important to verify the toxicity to confirm the safety of its use. Decreases or increases in the animals' body weight may be associated with toxic effects of substances (Kifayatullah et al., 2015), but the EPB at 2000 mg/kg did not cause changes in body weight gain, and no alteration in the amount of food intake, during the 14 days of evaluation ( $P > 0.05$ ). Besides, no mortality and no alterations in the gross behavior were observed in acutely EPB-treated (2000 mg/kg, p.o.) animals. Thus, the EPB can be classified according to OECD Guideline 423 (2001) in the category 5 ( $LD_{50}$  is greater than 2000 mg/kg).

#### 4.5 Conclusions

The results presented in current study provides the biological evidence for the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *P. bipinnatifidum* stems and support the traditional use of this plant as an analgesic and anti-inflammatory agent in popular medicine. The opioid receptors mediated the antinociceptive effect of this vegetal species, and its anti-inflammatory effect inhibits the oxidative stress. Lastly, the acute administration of the EPB at 2000 mg/kg did not cause mortality to mice, which demonstrates that this extract is devoid of acute toxicity.

## Acknowledgements

This work was supported by PIBIC/FAPE Brazilian agency [grant number 042/2017]. The authors are thankful to Unochapecó for the support.

## 4.6 References

- Abbott, F. V., Franklin, K.B.J., Westbrook, R.F., 1995. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 60, 91–102. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)00095-V](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)00095-V).
- Abdel-Nabi El-Sayed El-Deeb, Ibrahim Mohamed Abdel-Aleem, Samir Mohamed El-Amin, Laila Abdel-Ghany Refahy, M.A.E.-S., 2012. Antiproliferative effect of phenolic glucosides isolated from *Philodendron bipinnatifidum* on HepG2 cells. *Phytopharmacology* 3, 351–358.
- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Albertasse, P.D., Thomaz, L.D., Andrade, M.A., 2010. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. *Rev. Bras. Plantas Med.* 12, 250–260. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000300002>
- Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, a, Coppolino, M.F., 2012. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* 11, 52–64.
- Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodríguez, J., Delporte, C., 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J. Ethnopharmacol.* 116, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.025>
- Ben Khedir, S., Mzid, M., Bardaa, S., Moalla, D., Sahnoun, Z., Rebai, T., 2016. In Vivo Evaluation of the anti-Inflammatory effect of *Pistacia lentiscus* fruit oil and its effects on oxidative stress. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2016, 6108203. <https://doi.org/10.1155/2016/6108203>
- Boligon, A.A., Piana, M., Kubiça, T.F., Mario, D.N., Dalmolin, T.V., Bonez, P.C., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S.H., Campos, M.M.A., Athayde, M.L., 2015. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *J. Appl. Biomed.* 13, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2014.01.004>

- Brasil, C.M., 2016. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica - DBCA, Resolução Normativa MCTI.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Brasil, C.C., 2008. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Constituição Fed. 4–9.
- Büyükkokuroglu, M.E., Berashvili, D., Gepdiremen, A., Altinkeser, M., 2008. Antiinflammatory and antinociceptive properties of luteolin diglucuronide and apigenin diglucuronide obtained from *Perilla nankinensis*. *Asian J. Chem.* 20, 1900–1906.
- Chen, D., Bi, A., Dong, X., Jiang, Y., Rui, B., Liu, J., Yin, Z., Luo, L., 2014. Luteolin exhibits anti-inflammatory effects by blocking the activity of heat shock protein 90 in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 326–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.122>
- Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32, 295–310.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>
- Da Silva, A.R.H., Moreira, L.D.R., Brum, E.D.S., De Freitas, M.L., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Roman, S.S., Mazzanti, C.M., Brandão, R., 2014. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *J. Ethnopharmacol.* 153, 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.063>
- Dighe, S.B., Kuchekar, B.S., Wankhede, S.B. 2016. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *Int. J. Pharmacol. Res.* 6, 109-113. <https://doi.org/10.7439/ijpr>.
- Dina, T.A., Rahman, M.A., Ahmed, N.U., Uddin, M.N., 2010. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Argyrea argentea* methanol extract in animal model. *J. Taibah Univ. Sci.* 3, 1–7.  
[https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60014-4](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60014-4)
- Dray, A., Perkins, M., 1993. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90133-7)
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Filho, A.W., Filho, V.C., Olinger, L., De Souza, M.M., 2008. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch. Pharm. Res.* 31, 713–721.

- <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1217-2>
- Franzotti, E.M., Santos, C.V.F., Rodrigues, H.M.S.L., Mourão, R.H.V., Andrade, M.R., Antonioli, A.R., 2000. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J. Ethnopharmacol.* 72, 273–278.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00205-1)
- Fridovich, H.P.M. and I., 1972. The Role of superoxide anion in the epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- García, M.D., Sáenz, M.T., Gómez, M.A., Fernández, M.A., 1999. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phyther. Res.* 13, 78–80. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199902\)13:1<78::AID-PTR384>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199902)13:1<78::AID-PTR384>3.0.CO;2-F)
- Githinji, C.G., Mbugua, P.M., Kanui, T.I., Kariuki, D.K., 2012. Analgesic and anti-inflammatory activities of 9-hexacosene and stigmaterol isolated from *Mondia whytei*. *Phytopharmacology* 2, 212–223.
- Hosoi, M., Oka, T., Abe, M., Hori, T., Yamamoto, H., Mine, K., Kubo, C., 1999. Prostaglandin E2 has antinociceptive effect through EP1 receptor in the ventromedial hypothalamus in rats. *Pain* 83, 221–227. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00105-0)
- Jeon, I.H., Kim, H.S., Kang, H.J., Lee, H.S., Jeong, S. Il, Kim, S.J., Jang, S. Il, 2014. Anti-inflammatory and antipruritic effects of luteolin from perilla (*P. frutescens* L.) leaves. *Molecules* 19, 6941–6951. <https://doi.org/10.3390/molecules19066941>
- Jiménez-Suárez, V., Nieto-Camacho, A., Jiménez-Estrada, M., Alvarado Sánchez, B., 2016. Anti-inflammatory, free radical scavenging and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Hamelia patens* and its chemical constituents. *Pharm. Biol.* 54, 1822–1830.  
<https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1129544>
- Kifayatullah, M., Mustafa, M.S., Sengupta, P., Sarker, M.M.R., Das, A., Das, S.K., 2015. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of *Pericampylus glaucus* (Lam.) Merr. in BALB/c mice. *J. Acute Dis.* 4, 309–315.  
<https://doi.org/10.1016/j.joad.2015.06.010>
- Lee, J.-H., Zhou, H.Y., Cho, S.Y., Kim, Y.S., Lee, Y.S., Jeong, C.S., 2007. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch. Pharm. Res.* 30, 1318–1327.

- <https://doi.org/10.1007/BF02980273>
- Leppert, W., 2012. The impact of opioid analgesics on the gastrointestinal tract function and the current management possibilities. *Wspolczesna Onkol.*  
<https://doi.org/10.5114/wo.2012.28792>
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M.T., Wang, S., Liu, H., Yin, Y., 2016. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients.*  
<https://doi.org/10.3390/nu8030167>
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas, *Medicina.*
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Lubrano, V., 2015. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J. Exp. Med.* 5, 218. <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i4.218>
- Meek, I.L., van de Laar, M.A.F.J., Vonkeman, H.E., 2010. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: An overview of cardiovascular risks. *Pharmaceuticals.* <https://doi.org/10.3390/ph3072146>
- Menezes, P.R., Schwarz, E.A., Santos, C.A.M., 2004. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia* 75, 398–400. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.01.014>
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Mohsin, S., Kurup, G.M., Mahadevan, R., 2013. Effect of ascophyllan from brown algae *Padina tetrastromatica* on inflammation and oxidative stress in carrageenan-induced rats. *Inflammation* 36, 1268–1278. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9665-4>
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., Morikawa, S., 2003. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.* 74, 709–721. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.036>
- Muelas-Serrano, S., Nogal, J.J., Martínez-Díaz, R.A., Escario, J.A., Martínez-Fernández, A.R., Gómez-Barrio, A., 2000. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Ethnopharmacol.* 71, 101–107.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00185-3)
- Müller, L.G., Salles, L.A., Stein, A.C., Betti, A.H., Sakamoto, S.,

- Cassel, E., Vargas, R.F., von Poser, G.L., Rates, S.M.K., 2012. Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 36, 101–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.08.015>
- Mylona, P. V, Polidoros, A.N., 2000. ROS Regulation of antioxidant. *ROS Regul. Antioxid. Genes* 101–127.  
<https://doi.org/10.1201/9781439854082-7>
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nirmal, S.A., Pal, S.C., Mandal, S.C., Patil, A.N., 2012. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology* 20, 219–224.  
<https://doi.org/10.1007/s10787-011-0110-8>
- Nsonde Ntandou, G.F., Banzouzi, J.T., Mbatchi, B., Elion-Itou, R.D.G., Etou-Ossibi, A.W., Ramos, S., Benoit-Vical, F., Abena, A.A., Ouamba, J.M., 2010. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *J. Ethnopharmacol.* 127, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.040>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oliveira, S.M., Gewehr, C., Dalmolin, G.D., Cechinel, C.A., Wentz, A., Lourega, R. V., Sehnem, R.C., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Rubin, M.A., Bonacorso, H.G., Ferreira, J., 2009. Antinociceptive effect of a novel tosylpyrazole compound in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 122–129. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00353.x>
- Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J.A., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., 2016. Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 14, 123–130.  
<https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.13>
- Saha, S., Subrahmanyam, E.V.S., Kodangala, C., Mandal, S.C., Shastri, S.C., 2013. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. *Brazilian J. Pharmacogn.* 23, 651–661. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000055>

- Santos, A.R., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 417–426. [https://doi.org/0022-3565/99/2891-0417\\$03.00/0](https://doi.org/0022-3565/99/2891-0417$03.00/0)
- Santos, E.N., Lima, J.C.S., Noldin, V.F., Cechinel-Filho, V., Rao, V.S.N., Lima, E.F., Schmeda-Hirschmann, G., Sousa, P.T., de Oliveira Martins, D.T., 2011. Anti-inflammatory, antinociceptive, and antipyretic effects of methanol extract of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 557–566. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652011005000006>
- Scapinello, J.; Aguiar, G.P.S., Dal Magro, C., Capelezzo, A.P., Niero, R., Dal Magro, J., Oliveira, D., Oliveira, J.V., 2018. Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 125, p. 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.079>
- Simon, L.S., 2013. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their risk: a story still in development. *Arthritis Res. Ther.* 15, S1. <https://doi.org/10.1186/ar4173>
- Süleyman, H., Demircan, B., Karagöz, Y., 2007. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Reports.*
- Tatiya, A.U., Saluja, A.K., Kalaskar, M.G., Surana, S.J., Patil, P.H., 2017. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Bridelia retusa* (Spreng) bark. *J. Tradit. Complement. Med.* 7, 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.009>
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Tonello, R., Hoffmeister, C., Klafke, J.Z., Rosa, F., Pinheiro, K. V., Pinheiro, F. V., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2014. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 387, 679–689. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-0978-0>
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.I.B., Klafke, J.Z., Rosa, F., Oliveira, S.M., Tonello, R., Guerra, G.P., Boligon, A.A., Zanon, R.B., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2012. Identification of the plant steroid  $\alpha$ -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 258–269. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.195909>
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.I.B., Oliveira, S.M., Rosa, F.,

- Tonello, R., Silva, C.R., Machado, P., Boligon, A.A., Martins, M.A.P., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Athayde, M.L., Rubin, M.A., Calixto, J.B., Ferreira, J., 2013. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. *Neuropharmacology* 73, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.011>
- Verri, W.A., Vicentini, F.T.M.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Cardoso, R.D.R., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Fonseca, M.J. V, Casagrande, R., 2012. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms, *Stud. Nat. Prod. Chem.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>
- Waczuk, E., Kamdem, J., Abolaji, A., Meinerz, D., Bueno, D., do Nascimento Gonzaga, T., do Canto Dorow, T., Boligon, A., Athayde, M., da Rocha, J., Ávila, D., 2015. *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes. *Toxicol. Res. (Camb)*. 4, 739–748. <https://doi.org/10.1039/c4tx00122b>
- Wink, M., 2016. Secondary metabolites, the role in plant diversification of. In: *Encyclopedia of evolutionary biology*. pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00263-8>
- Xia, N., Chen, G., Liu, M., Ye, X., Pan, Y., Ge, J., Mao, Y., Wang, H., Wang, J., Xie, S., 2016. Anti-inflammatory effects of luteolin on experimental autoimmune thyroiditis in mice. *Exp. Ther. Med.* 12, 4049–4054. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3854>
- Ziyan, L., Yongmei, Z., Nan, Z., Ning, T., Baolin, L., 2007. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med.* 73, 221–226. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967122>



## CAPÍTULO 5

Os resultados apresentados neste capítulo estão escritos conforme o artigo científico intitulado “Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique”, autores Jaqueline Scapinello, Gean Pablo S. Aguiar, Camila Dal Magro, Ana Paula Capelezzo, Rivaldo Niero, Jacir Dal Magro, Débora Oliveira e J. Vladimír de Oliveira, que está publicado na revista *Industrial Crops and Products*, volume 125, páginas 65-71, 2018. (DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.08.079).

### Abstract

The *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl is a plant used in popular medicine and has some pharmacological actions proven by scientific studies, as high antioxidant potential. The aim of this work was to investigate the application of Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) technique in the encapsulation of *P. bipinnatifidum* extract, rich in  $\beta$ -Sitosterol, in poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) biopolymer. For this, a  $2^2$  Central Composite Design (CCD) with 3 central points was used to assess the influence of extract concentration (5.0, 12.5 and 20.0 mg·mL<sup>-1</sup>) and temperature (35.0, 37.5 and 40.0 °C) on particle size and encapsulation efficiency. In most of experiments, spherical particles were obtained and the highest encapsulation efficiency (89.56%) was verified using 20.0 mg·mL<sup>-1</sup> of extract concentration (ratio 1:1 extract and PHBV) and temperature of 35.0 °C. In these conditions, also the lowest mean particle size, resulting in  $0.622 \pm 0.232$   $\mu\text{m}$ , was achieved. GC/MS analysis of the particles demonstrated that the process caused small variation in the chemical composition of the extract, maintaining its main constituents, such as the phytosterols campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol. For the  $\beta$ -sitosterol compound, there was an increase of about 35 % in its concentration in the extract after the encapsulation process. The results obtained demonstrate the possibility of applying SEDS technique to encapsulate extracts with bioactive compounds of phytosterols class.

Keywords: *P. bipinnatifidum*; phytosterols;  $\beta$ -sitosterol, SEDS, encapsulation; biopolymer.

## 5.1 Introduction

The interest in plant extracts occurs initially through reports of popular knowledge, which can often be scientifically proven through *in vitro* and *in vivo* tests. An endemic species of South America, *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl (Araceae), popularly known in Brazil as *guaímbé*, *banana-de-macaco* or *imbé*, is a plant widely used in folk medicine, with reports of anesthetic, anti-inflammatory, hemostatic, anthelmintic and antitumor activities (Lorenzi and Matos, 2002). Although it is widely used in Brazilian popular medicine, there are few scientific studies on this species, with reports of the roots antioxidant potential (Menezes et al., 2004), antiprotozoal activity of branches and leaves (Muelas-Serrano et al., 2000) and antiproliferative effect on liver cancer cells (El-Deeb, 2012).

Pharmacological action of plants is due to the presence of secondary metabolites such as alkaloids, terpenes, flavonoids and phytosterols. Phytosterols are a group of naturally occurring plant sterols which have similarity to cholesterol in structure. In this compounds class stands out  $\beta$ -sitosterol, which is related to prevention of heart disease, hypercholesterolemia, modulating the immune system, prevention of cancer, as well as for rheumatoid arthritis, cervical cancer and benign prostatic hyperplasia (Saeidnia, 2014; Ulbricht, 2016).

Encapsulation process aims to protect bioactive compounds, thus reducing interactions with environmental factors, such as heat and light; modulate the compounds release, since it directly influences dissolution rate; and modify the surface properties of the particles used (Ezhilarasi et al., 2013). Among the techniques used for compounds encapsulation, those using supercritical fluids have some advantages over conventional methods, with the formation of micro and/or nanoparticles with narrow size distribution, good encapsulation efficiency, control of crystal polymorphism, possibility of processing thermosensitive compounds and production of high purity particles (Sheth et al., 2012).

Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) technique is based on the reduction of the active compound solubility in an organic solvent by this saturation with the supercritical fluid, which causes the solvent extraction and substrate precipitation. Besides the antisolvent effect, the supercritical fluid acts on the solution dispersion, enhancing mass transfer and achieving smaller particle sizes (Jung and Perrut, 2001).

The aim of this work is to obtain *P. bipinnatifidum* extracts from different solvents and perform the phytochemical characterization of

these, then, the best extract will be selected in relation to the chemical composition, and this will be submitted to the encapsulation process by the SEDS technique, where parameters such as temperature and extract concentration will be evaluated in relation to efficiency and particle size. Moreover, the analysis of the composition encapsulated particles will be performed and compared with the original extract to verify if the process causes alteration in the phytochemical profile.

## 5.2 Materials and Methods

### 5.2.1 Materials

*P. bipinnatifidum* stems and leaves samples were collected on November 2016 (spring) from the native plants of Chapecó city, which is located approximately 659 m above sea level, in the South Region of Brazil. This region is characterized by a humid subtropical mesothermal climate. Voucher specimens were deposited on the Herbarium at Universidade Comunitária de Chapecó (Herbarium Unochapecó, SC, Brazil) under the accession number UNO 3470.

Carbon dioxide (mass fraction purity 0.999 in the liquid phase) was supplied by White Martins S.A. (São Paulo, SP, Brazil). Dichloromethane (minimum mass fraction purity 0.995) and ethyl acetate (minimum mass fraction purity 0.995) were purchased from Merck (Darmstadt, HE, Germany) and used without any further treatment.  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol and campesterol were supplied by Sigma-Aldrich. PHBV with average molar mass of 196,000 and polydispersity index of 1.85, was kindly supplied by PHB Industrial S.A. (Serrana, SP, Brazil) and was previously submitted to purification by dissolving in chloroform (minimum mass fraction purity 0.995) and re-precipitation in n-heptane (minimum mass fraction purity 0.995), both purchased from Quimex (São Paulo, SP, Brazil) (Boschetto et al., 2014).

### 5.2.2 Extraction of bioactive compounds from *P. bipinnatifidum*

The extraction methodology was performed according to Fernandes et al. (2016), with some modifications. After collection of *P. bipinnatifidum* stems and leaves, stems were manually separated from the leaves, and were cut and dried (40.0 °C for 2 days). Then, both were milled separately in an industrial blender. The milled stems or leaves were subjected to maceration using absolute ethanol solvent in a ratio of 1:20 grams of plant material per liter of

solvent and homogenized for 3 days at intervals of 24 h, at 25 °C and atmospheric pressure. Thereafter, the extract was filtered, and the solvent removed in rotary evaporator under reduced pressure. Finally, the extract was frozen and lyophilized for 24 h, resulting in *P. bipinnatifidum* extract. Only the stems were also submitted to the same procedure described, but with other solvents, ethyl acetate and petroleum ether.

Based on extracts chemical profile, which will be described in the sequence, the extract obtained from *P. bipinnatifidum* stems using ethyl acetate as solvent was chosen as the best and selected to be encapsulated in PHBV employing the SEDS technique.

### 5.2.3 *Experimental apparatus and procedure for encapsulation using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS)*

The SEDS experimental apparatus and procedure used for *P. bipinnatifidum* extract encapsulation in PHBV, employing supercritical CO<sub>2</sub> as antisolvent, is described in details by Boschetto et al. (2013), Franceschi et al. (2008) e Machado Jr et al. (2014).

Encapsulation process parameters were adopted based on previous works of the group: extract concentration in organic solution of 5.0, 12.5 and 20.0 mg·mL<sup>-1</sup>, PHBV concentration of 20 mg·mL<sup>-1</sup>, temperature of 35.0, 37.5 and 40.0 °C, solution flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>, antisolvent flow rate of 20 mL·min<sup>-1</sup> (at 20 MPa and 5 °C) and operating pressure of 8.0 MPa (Aguiar et al., 2017, 2016; Boschetto et al., 2013; Dal Magro et al., 2017). Extract solubilization was performed with dichloromethane. A 2<sup>2</sup> Central Composite Design (CCD) with 3 central points (Table 5.1) was employed to evaluate the influence of variables temperature and extract concentration on encapsulation efficiency and particle size obtained.

Table 5.1 Operational conditions employed in the encapsulation process. Following parameters were fixed at all experimental conditions: PHBV concentration of 20 mg·mL<sup>-1</sup>, solution flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>, anti-solvent flow rate of 20 mL·min<sup>-1</sup> (at 20 MPa and 5 °C) and pressure of 8.0 MPa. T: temperature and EC: extract concentration in the organic solution.

Run	Coded variables		Actual variables	
	T	EC	T (°C)	EC (mg·mL <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	35.0	5.0
2	-1	+1	35.0	20.0
3	+1	-1	40.0	5.0
4	+1	+1	40.0	20.0
5	0	0	37.5	12.5
6	0	0	37.5	12.5
7	0	0	37.5	12.5

#### 5.2.4 Determination of the percentage of encapsulation and encapsulation efficiency

Percentage of encapsulation (PE) and encapsulation efficiency (EE) were determined by UV–vis spectrophotometry according to methodology of (Boschetto et al., 2013). Initially, a sample of dried powder (extract encapsulated in PHBV) was weighed. Afterwards, particles were dissolved in dichloromethane and the solution was analyzed in a UV-vis spectrophotometer (Femto, model 800XI) at 415 nm, wavelength previously determined through sample scanning. Comparing the absorbance results with a pattern curve of absorbance versus solution concentration, the PE and EE of each run were evaluated by the following expressions (Kalogiannis et al., 2006):

$$PE [\%] = \frac{\text{mass of extract encapsulated}}{(\text{mass of extract} + \text{mass of PHBV})} \times 100 \quad (1)$$

$$EE [\%] = \frac{\text{percentage of extract encapsulated}}{\text{theoretical loading percentage of extract encapsulated}} \times 100 \quad (2)$$

where, the theoretical loading percentage is the ratio between the mass of extract and the total mass of extract and PHBV used in the encapsulation experiments.

### 5.2.5 *In vitro release experiments*

In vitro release tests were accomplished based on the works of (Dal Magro et al., 2017; Loss et al., 2016). The release media used to evaluate the co-precipitated particles were a phosphate buffer solution (PBS) pH 6.8 and a solution of HCl 0.1 M, with runs performed individually for each medium. The first medium was chosen because is very close to the physiological conditions, while the second one refers to the gastric system (Danhier et al., 2010). The sample selected was from run 4. The samples at concentration of  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  were placed in contact with the release medium, with temperature controlled at  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  and rotation of 100 rpm. At scheduled time intervals, 1.0 mL was collected from the solution and immediately replenished with pure medium to maintain the original volume. The sample collected was filtered through a membrane filter with porosity of  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  and analyzed at 415 nm to determine its concentration.

### 5.2.6 *Morphology and determination of particle size*

Particles characterization was performed regarding to morphology, by scanning electron microscopy (SEM - JEOL JSM-6390LV, United States).

From the SEM images, particle size was determined using the software Size Meter (version 1.1) (Aguiar et al., 2018), where it was evaluated the measures of length and thickness (highest characteristic measurement) of approximately 600 to 700 particles for each experimental condition analyzed. Thereby, average particle size, standard deviation and coefficient of variation (CV) were determined and used as statistical tools to express the data variability.

### 5.2.7 *Chemical profile of the extracts*

*P. bipinnatifidum* extracts and particles of the extract encapsulated in PHBV were analyzed by gas chromatography to access their chemical profiles. For analysis, the extracts were solubilized in dichloromethane, while the particles underwent an additional step to remove the polymer, by addition 0.3 ml of methanol (which caused PHBV precipitation) and

0.7 ml of dichloromethane to the solution and subsequent centrifugation at 15,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was then removed and analyzed.

Gas chromatography analysis was performed on Agilent GC/MS (7890B) equipment coupled to a quadripolar mass spectrometer (5977A) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The experimental conditions of the GC/MS system were as follows: Agilent19091S capillary column, dimension: 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ . The mobile phase flow (carrier gas: He) was adjusted to 1.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The GC temperature program was 85.0  $^{\circ}\text{C}$  at 4.0 minutes to 290.0  $^{\circ}\text{C}$  at a rate of 40  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (maintained for 1.0 min) and up to 300.0  $^{\circ}\text{C}$  at a rate of 5.0  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (maintained for 15 min). The injector temperature was 280.0  $^{\circ}\text{C}$ , sample injection volume 1  $\mu\text{L}$ , split ratio 1:20. The MS transfer line temperature was set to 150.0  $^{\circ}\text{C}$  and the source of ions temperature was set at 230.0  $^{\circ}\text{C}$ . For GC-MS detection, an electron ionization system was used with ionization energy set at 70 eV, and mass range at  $m\cdot z^{-1}$  40-500. The chemical components present in the extracts were identified by comparison with the equipment library (Agilent P/N G1033A). The relative amounts of each individual component were calculated using their respective peak areas in the chromatogram. For the  $\beta$ -sitosterol quantification, the calibration curves were prepared by serial dilutions at concentration range of 0.35 to 1.75  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Quantifications were performed by integrating the compound peak area. The calibration curve equation was obtained:  $y = 58,212,297.15x - 2,382,298.65$  ( $R^2 = 0.9968$ ).

## 5.3 Results and discussion

### 5.3.1 Results of extractions and chemical profile of extracts

Among the solvents employed for bioactive compounds extraction from *P. bipinnatifidum* stems, ethanol extraction produced a significantly higher yield, resulting in 13.08%. At the same time, yield of 10.34% was obtained for leaves extraction with the same solvent. Otherwise, for the solvents ethyl acetate and petroleum ether, the yield was 1.08% and 0.93%, respectively. This is probably due to the difference in polarity among solvents; ethanol is a solvent of medium polarity, and thus can solubilize a greater quantity of compounds, both polar and nonpolar. In an extraction using a nonpolar solvent, as ethyl acetate and petroleum ether, the compounds with high polarity are not well dissolved in the solvent, and the extraction efficiency is lower.

Inspection of phytochemical compounds profile allowed identifying the presence of terpenoids, sterols, flavonoids and alkaloids in all extracts of *P. bipinnatifidum*. It can be observed from Table 5.2 that almost all compounds extracted from stems with ethyl acetate were identified (92.83%) by the GC/MS, while about 75.31% were identified for leaves ethanol extract, 74.82% for stems petroleum ether and 62.68% for stems ethanol extract.

Among the compounds identified, some of them are common for all extracts, as the phytol acetate, palmitic acid, phytol and  $\beta$ -sitosterol. The last one is present in greater percentage in all the stems extracts and is related to many pharmacological actions. It is reported that  $\beta$ -sitosterol have antidiabetic and antioxidant potential (Gupta et al., 2011), anti-inflammatory (Paniagua-Pérez et al., 2016), antibacterial (Ododo et al., 2016) and antifungal (Mbambo et al., 2012) properties. According to (Bin Sayeed and Ameen, 2015),  $\beta$ -sitosterol is a plant derived nutrient with anticancer properties against breast cancer, prostate cancer, colon cancer, lung cancer, stomach cancer, ovarian cancer, and leukemia. Studies have shown that the compound interfere with multiple cell signaling pathways, including cell cycle, apoptosis, proliferation, survival, invasion, angiogenesis, metastasis and inflammation. Besides the highest percentage of  $\beta$ -sitosterol, the extract obtained from ethyl acetate solvent also presented other sterols, such as stigmasterol and campesterol, compounds that also have proven pharmacological activities.

The quantification of  $\beta$ -sitosterol was performed for all extracts, resulting in 133.04 mg of  $\beta$ -sitosterol per g of extract for ethyl acetate, 92.30 mg·g<sup>-1</sup> for petroleum ether, 13.14 and 17.00 mg·g<sup>-1</sup> for stems and leaves with ethanol, respectively. These results also show that a higher overall extraction yield is not directly related to the higher concentration of active compounds, since the extracts obtained with apolar solvents resulted in a higher concentration of  $\beta$ -sitosterol than the extracts obtained with ethanol. Due to this, the extract obtained with ethyl acetate was the most interesting to be used in the encapsulation in PHBV through SEDS technique.



Table 5.2. Chemical composition of *P. bipinnatifidum* extracts obtained from different organic solvents by the GC/MS.

Compound	Retention time (min)	Stems			Leaves	
		Ethyl acetate (%)	Ethanol (%)	Petroleum ether (%)	Ethanol (%)	
$\alpha$ -Resorcinol	6.66	1.95	-	-	-	
Ethyl iso-allocholate	8.28	-	1.24	-	-	
Phytol acetate	8.61	1.82	9.47	3.08	8.01	
3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	8.73	0.87	5.52	3.06	-	
Palmitic acid	8.95	8.30	13.81	7.82	6.38	
Phytol	9.31	0.83	6.30	4.12	30.51	
Linoleic acid	9.43	15.72	2.84	-	-	
Acetate of 7-methyl-Z-tetradecen-1-ol	10.03	0.42	-	-	-	
Glycerol 1-palmitate	10.47	4.96	-	-	-	
Diisooctyl phthalate	10.62	-	-	10.74	-	
$\alpha$ -glyceryl linoleate	11.18	3.68	-	-	-	
Heptacosane	12.03	3.85	-	4.62	-	
Ingol 12-acetate	12.42	1.47	-	-	-	
6,7-epoxypragn-4-n-9,11,18-triol-3,20-dione-11,18-diacetate	13.16	-	-	-	4.97	

Nonacosane	13.32	0.54	-	-	-	-
dl- $\alpha$ -tocopherol	13.78	2.65	-	4.13	18.84	-
D-asarinin	14.16	3.29	-	-	-	-
Campesterol	14.86	6.87	-	4.06	-	-
Stigmasterol	15.15	5.52	-	2.73	-	-
$\beta$ -Sitosterol	15.91	28.91	23.50	26.98	6.60	-
Betulin	17.45	1.18	-	3.48	-	-
Total	-	92.83	62.68	74.82	75.31	-

### 5.3.2 Encapsulation of *P. bipinnatifidum* ethyl acetate extract in PHBV by SEDS technique

The morphology of the encapsulated particles, characterized by scanning electronic microscopy, is shown in Figure 5.1. It can be observed that particles obtained in all the experimental runs presented mostly spherical morphology, except for experimental condition 1 (35.0 °C and 5.0 mg·mL<sup>-1</sup>), which presented agglomerated particle formation with irregular shapes. Morphology and average particle size are factors that directly influence in the particles application, affecting physicochemical properties such as dissolution rate, stability and active principle release. From the industrial point of view, the spherical morphology is generally the most interesting, since it exhibits higher surface contact area and, consequently, higher mass transfer in the system.

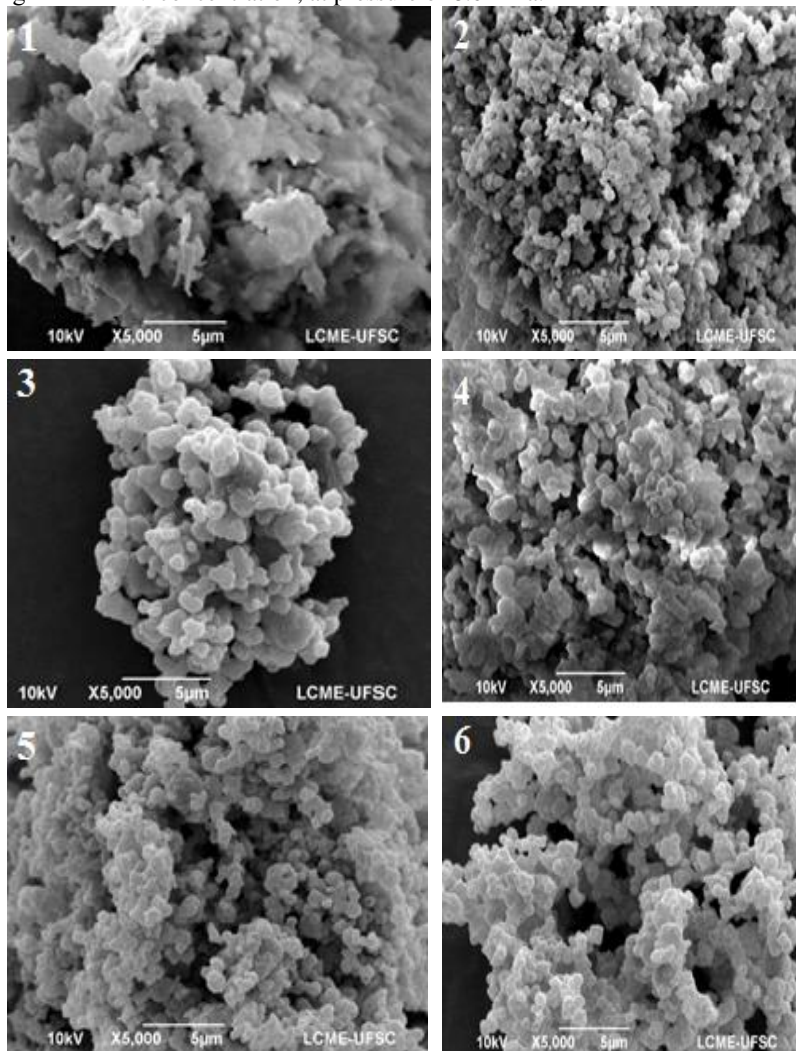
Regarding to the average particle size, all experimental conditions resulted in submicrometer particles (size between 0.1 and 1.0 µm), according to the classification cited by Silva et al. (2014), as shown in Table 5.3. Similar results were obtained by (Dal Magro et al., 2017) in the encapsulation of resveratrol in PHBV by the same technique.

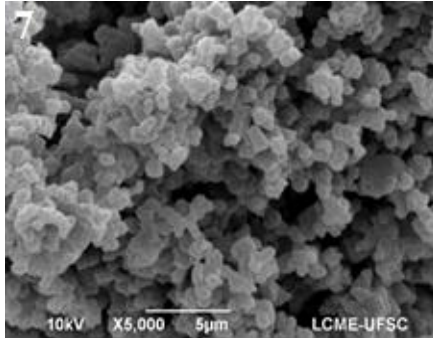
Table 5.3. Percentage of encapsulation (PE) and encapsulation efficiency (EE) of SEDS process, particle size values and coefficient of variation (CV).

Run	PE (%)	EE (%)	Particle size ( $\mu\text{m}$ )			CV (%)**
			Minimum	Maximum	Mean*	
1	16.67	36.86	0.175	0.825	$0.825 \pm 0.407$	49.32
2	66.67	89.56	0.164	1.441	$0.622 \pm 0.232$	37.34
3	25.58	56.62	0.431	3.026	$0.971 \pm 0.290$	29.86
4	66.19	88.54	0.034	2.438	$0.841 \pm 0.283$	33.71
5	52.04	82.81	0.254	2.315	$0.738 \pm 0.249$	33.77
6	55.15	83.02	0.225	2.286	$0.746 \pm 0.267$	35.75
7	50.84	80.14	0.302	2.635	$0.802 \pm 0.354$	39.21

\* Mean  $\pm$  standard deviation, \*\* coefficient of variation, calculated as (standard deviation/mean size)  $\times$  100.

Figure 5.1. SEM images of the *P. bipinnatifidum* extract encapsulated in PHBV by SEDS technique. Experimental conditions: 1: 35 °C and 5.0 mg·mL<sup>-1</sup> of extract; 2: 35 °C and 20.0 mg·mL<sup>-1</sup>; 3: 40 °C and 5.0 mg·mL<sup>-1</sup>; 4: 40 °C and 20.0 mg·mL<sup>-1</sup>; 5, 6 and 7: 37.5 °C and 12.5 mg·mL<sup>-1</sup>. All runs were performed with 20.0 mg·mL<sup>-1</sup> PHBV concentration, at pressure of 8.0 MPa.





The lowest mean particle size value was recorded in the assay with the highest extract concentration and lowest temperature ( $20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  and  $35.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ), with a value of  $0.622 \pm 0.232 \text{ }\mu\text{m}$ . On the other hand, the highest value was recorded for the assay with lower extract concentration and higher temperature, resulting in  $0.971 \pm 0.290 \text{ }\mu\text{m}$ . These results indicate that increasing temperature leads to an increase in the average particle size and, as the extract concentration increases, size decreases. This behavior can be confirmed analyzing the response surface of the variables temperature and extract concentration on the particle size, shown in Figure 5.2. One-way analysis of variance (ANOVA,  $P < 0.05$ ) indicated that both extract concentration and temperature had a significant influence on mean particle size, with p-value equal to 0.0425 and 0.0337 for extract concentration and temperature, respectively.

Figure 5.2. Response surface of temperature *versus* extract concentration to mean particle size.

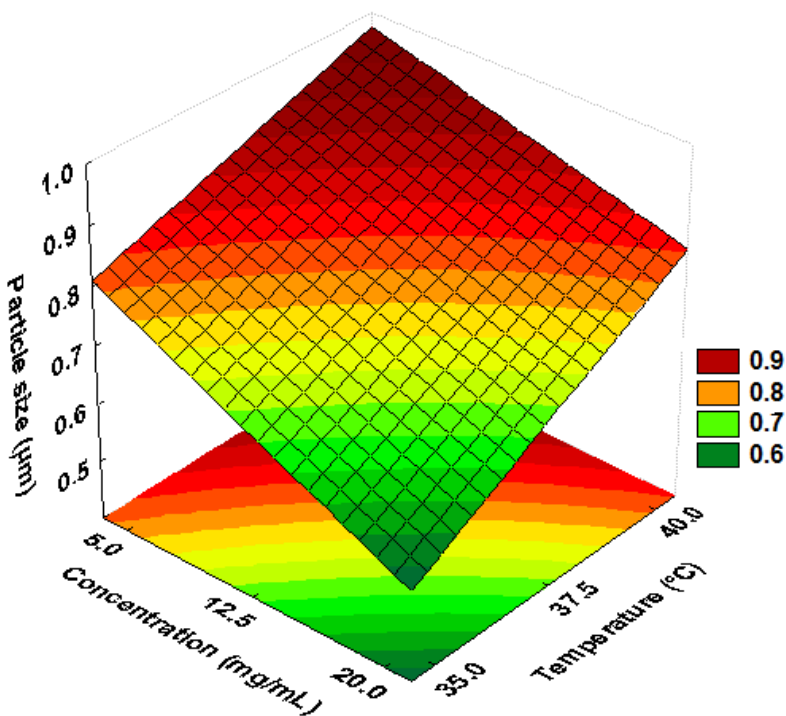
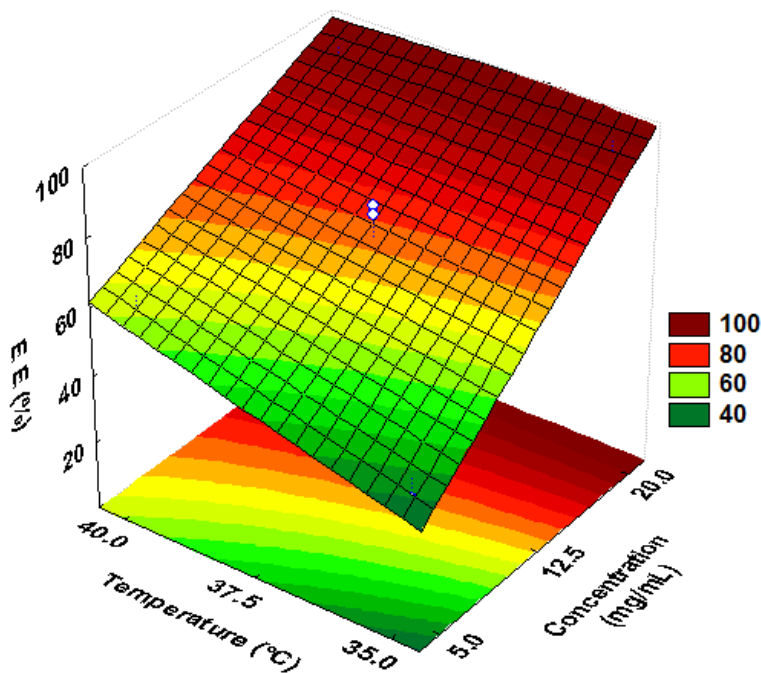


Table 5.3 also presents the percentage of encapsulation and encapsulation efficiency achieved in the SEDS process. The highest encapsulation efficiency was obtained in the run with the highest extract concentration and lower temperature (20 mg·mL<sup>-1</sup> and 35 °C), followed by the run with the highest extract concentration and higher temperature (20 mg·mL<sup>-1</sup> and 40 °C), that is, when a 1:1 extract-PHBV ratio was used. Similar results were reported by (Boschetto et al., 2013) for grape seed extract encapsulation in PHBV and by (Priamo et al., 2010), who observed that increasing  $\beta$ -carotene concentration and maintaining fixed PHBV concentration, higher percentage of solute was encapsulated, increasing SEDS process efficiency.

According to one-way ANOVA, only the extract concentration had a significant effect on the encapsulation efficiency ( $P = 0.0291$ ). Figure 5.3 shows the response surface of the effects of temperature and extract

concentration on this parameter. The fact that temperature has not influenced significantly the process efficiency is an interesting result, since it becomes possible to work at the lowest level of temperature, reducing the risk of bioactive compounds degradation. In addition to that, employing lower temperatures implies in lower cost of system operation.

Figure 5.3. Response surface of temperature versus extract concentration to encapsulation efficiency.



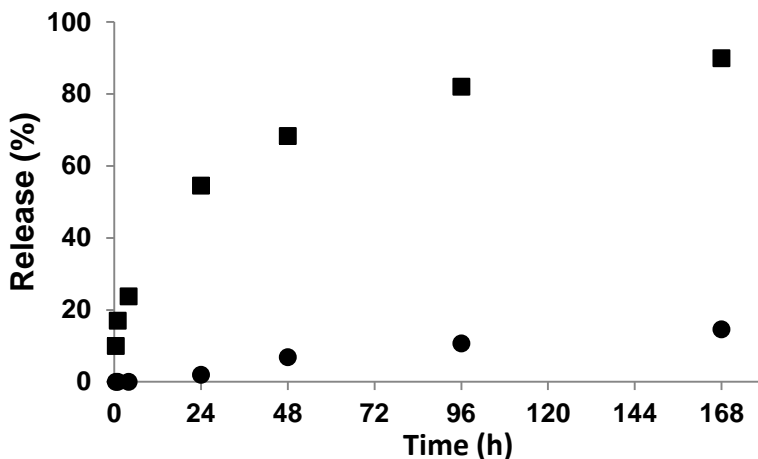
Therefore, it can be stated that the best condition for *P. bipinnatifidum* extract encapsulation is run 2 (35 °C and 20 mg·mL<sup>-1</sup>), when working at the highest level of extract concentration, or a 1:1 ratio of extract-PHBV, and lower temperature level.

For the release experiments, run 2 were employed due to greater encapsulation efficiency exhibited. Fig. 5.4 shows the time evolution of release percentage in PBS pH 6.8 and HCl 0.1 M, from 0 to 168 h. Different release profiles were observed for the different media, which means that the pH of the medium did affect the release of extract. A burst release can be seen in the first 24 h for the PBS medium and then the



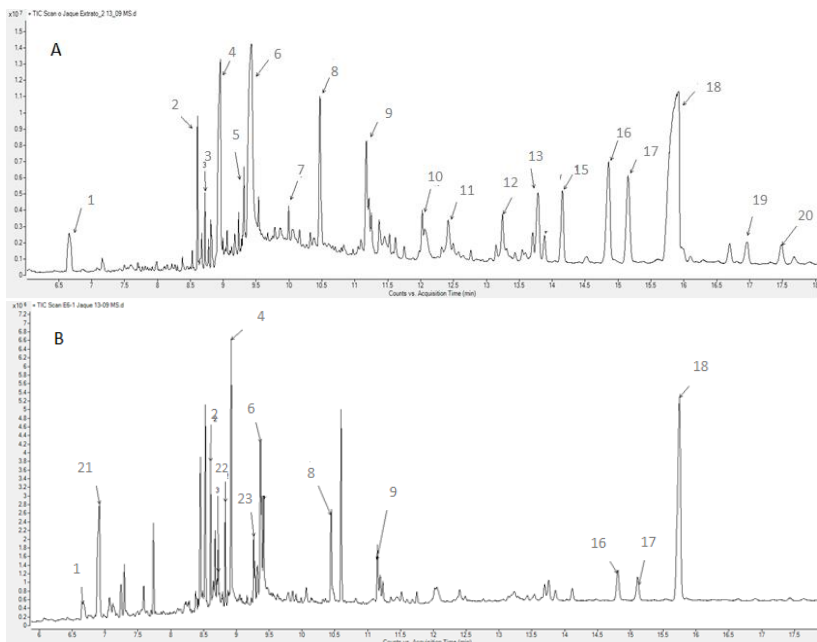
increase increased at a lower rate. However, in HCl medium the release profile more slowly, releasing only after the first 24 hours, reaching a release of around 10% from 96 to 168 h, while for the PBS medium release was 82% at 96 h and reached 90% in 168 h. According Dal Magro et al. (2017), the burst release enables the achievement of the effective concentration of compound rapidly in plasma, while the controlled release allows maintaining this concentration for a long time. The poor bioavailability of some compounds due to its fast metabolism and elimination could be partially avoided by this process, extending its biological in vivo half-time.

Figure 5.4. *In vitro* release profiles in  $0.25 \text{ mol.L}^{-1}$  HCl (●) and PBS pH 6.8 (■) of particles obtained in the co-precipitation run 2.



To verify the possible occurrence of bioactive compounds degradation due to the supercritical process, encapsulated particles were submitted to GC/MS analysis. Figure 5.5 shows the chromatograms of *P. bipinnatifidum* extract obtained with ethyl acetate (Figure 5.5-A) and the particles obtained in run 2 ( $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Figure 5.5-B).

Figure 5.5. Chromatograms by GC/MS. A: Ethyl acetate extract and B: Particles of run 2 (35 °C and 20 mg·mL<sup>-1</sup>). 1:  $\alpha$ -resorcinol; 2: phytol acetate; 3: 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol; 4: palmitic acid; 5: phytol; 6: linoleic acid; 7: acetate of 7-metil-Z-tetradecen-1-ol; 9:  $\alpha$ -glyceryl linoleate; 10: heptacosane; 11: ingol 12-acetate; 12: nonacosane; 13: dl- $\alpha$ -tocopherol; 15: D-asarinin; 16: campesterol; 17: stigmasterol; 18:  $\beta$ -sitosterol; 19: cyclerenol acetate; 20: betulin; 21: 5-nanalol; 22: Palmitic acid methyl ester; 23: 8,11-octadecadienoic acid methyl ester.



Comparing them, it is possible to imply that major compounds of *P. bipinnatifidum* extract were not degraded after co-precipitation process, with presence of phytosterols  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol. The chromatogram of encapsulated particles also showed some fatty acids that were not previously present in the extract, like the palmitic acid, methyl ester and 8,11-octadecadienoic acid, methyl ester, possibly due to the occurrence of some fatty acids esterification during the SEDS process. This result demonstrates that the co-precipitation process by SEDS technique must be used with caution for samples that have fatty acids in their composition.

Quantification of  $\beta$ -sitosterol in some experimental conditions was also performed and the results are shown in Table 5.4. The particles with best encapsulation efficiency and lower particle size (run 2) presented 180.45 mg of  $\beta$ -sitosterol per g of extract, run 6 (central point) presented 133.36  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  and run 1, the lower encapsulation efficiency, only 119.40  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Comparing the amount of  $\beta$ -sitosterol in run 2 with the compound in the original extract, the concentration increased from 133.04  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  to 180.45  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , an increase of around 35%. This result suggests that the encapsulation process resulted in the purification of the extract, increasing the concentration of the active compound  $\beta$ -sitosterol. According to (Freiberger et al., 2015), volatile compounds may reduce their concentration in the capsules because of their high volatility. Compounds that presented high  $\text{CO}_2$  affinity may also have been partially lost during SEDS process, having migrated to soluble phase and being dragged out of the precipitation camera.

Table 5.4.  $\beta$ -sitosterol quantification in *P. bipinnatifidum* extract obtained with ethyl acetate (EA extract) and capsules of run 1 (35 °C; 5.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), Run 2 (35 °C; 20.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and Run 6 (37.5 °C; 12.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

	Concentration ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of particles)	Concentration ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of extract) *
EA Extract	-	133.04
Run1	19.91	119.40
Run 2	99.52	180.45
Run 6	88.27	133.36

\* calculated as concentration ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of particles) $\times$ 100/PE.

## 5.4 Conclusions

*P. bipinnatifidum* extract encapsulation in PHBV by SEDS technique resulted in high encapsulation efficiency (89.56%) using the highest extract concentration (20.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and lower temperature (35 °C). Under these conditions, the lowest mean particle size was also observed, resulting in  $0.622 \pm 0.232 \mu\text{m}$ , with a coefficient of variation of 37.34%. Most of the runs resulted in particles with spherical morphology. The encapsulation process can be considered promising since it caused few changes in the extract chemical composition, maintaining its main

constituents, and even increasing the concentration of the main compound identified, the  $\beta$ -sitosterol.

### Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES, FAPESC/SC and FAPÉ-Unochoapéco for financial support and scholarships and also LCME – UFSC for the SEM analysis.

### 5.5 References

- Aguiar, G.P.S., Arcari, B.D., Chaves, L.M.P.C., Magro, C.D., Boschetto, D.L., Piato, A.L., Lanza, M., Oliveira, J.V., 2018. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.* 112, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.008>
- Aguiar, G.P.S., Boschetto, D.L., Chaves, L.M.P.C., Arcari, B.D., Piato, A.L., Oliveira, J.V., Lanza, M., 2016. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 89, 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.047>
- Aguiar, G.P.S., Marcon, M., Mocelin, R., Herrmann, A.P., Chaves, L.M.P.C., Piato, A.L., Lanza, M., Oliveira, J.V., 2017. Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: Evaluation of in vitro and in vivo biological activity. *J. Supercrit. Fluids* 130, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.010>
- Bin Sayeed, M.S., Ameen, S.S., 2015. Beta-Sitosterol: A Promising but Orphan Nutraceutical to Fight Against Cancer. *Nutr. Cancer.* <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1087042>
- Boschetto, D.L., Aranha, E.M., de Souza, A.A.U., Souza, S.M.A.G.U., Ferreira, S.R.S., Priamo, W.L., Oliveira, J.V., 2014. Encapsulation of bixin in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. *Ind. Crops Prod.* 60, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.050>
- Boschetto, D.L., Dalmolin, I., de Cesaro, A.M., Rigo, A.A., Ferreira, S.R.S., Meireles, M.A.A., Batista, E.A.C., Vladimir Oliveira, J., 2013. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract

encapsulation by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 50, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.044>

Dal Magro, C., Aguiar, G.P.S., Venerai, J.G., dos Santos, A.E., de Chaves, L.M.P.C., Oliveira, J.V., Lanza, M., 2017. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. *J. Supercrit. Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.025>

Danhier, F., Feron, O., Pr eat, V. 2010. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release*, 148, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>

El-Deeb, Abdel-Nabi El-Sayed, Abdel-Aleem, Ibrahim Mohamed, El-Amin, Samir Mohamed, Refahy, Laila Abdel-Ghany, El-Shazly, Maha Awad, 2012. Antiproliferative effect of phenolic glucosides isolated from *Philodendron bipinnatifidum* on HepG2 cells. *Phytopharmacology* 3, 351–358.

Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C., 2013. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol.* <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>

Fernandes, C.E.F, Fernanda Kuhn, F., Scapinello, J., Lazarotto, M. Bohn, A., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Zanatta, M.S., Zantta, L., Dal Magro, J., Oliveira, J.V. 2016. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. *Ind. Crops Prod.* 81, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.078>

Franceschi, E., De Cesaro, A.M., Feiten, M., Ferreira, S.R.S., Dariva, C., Kunita, M.H., Rubira, A.F., Muniz, E.C., Corazza, M.L., Oliveira, J.V., 2008. Precipitation of  $\beta$ -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* 47, 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.002>

Freiberger, E.B., Kaufmann, K.C., Bona, E., Hermes de Ara ujo, P.H., Sayer, C., Leimann, F.V., Gonçalves, O.H., 2015. Encapsulation of

roasted coffee oil in biocompatible nanoparticles. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.039>

Gupta, R., Sharma, A.K., Dobhal, M.P., Sharma, M.C., Gupta, R.S., 2011. Antidiabetic and antioxidant potential of  $\beta$ -sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *J. Diabetes* 3, 29–37. <https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2010.00107.x>

Jung, J., Perrut, M., 2001. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *J. Supercrit. Fluids* 20, 179–219. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00064-X)

Kalogiannis, C.G., Michailof, C.M., Panayiotou, C.G., 2006. Microencapsulation of amoxicillin in poly(L-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 8738–8743. <https://doi.org/10.1021/ie060529q>

Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas, *Medicina*. 512 pp.

Loss, R.A., Pereira, G.N., Boschetto, D.L., Aguiar, G.S.P., Machado, J.R., Chaves, L.M.P.C., Silva, M.J.A., Oliveira, D., Oliveira, J.V. 2016. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. *J. Food Sci. Techn.* 53, 3859–3864. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2362-1>

Machado Jr, F.R.S., Reis, D.F., Boschetto, D.L., Burkert, J.F.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., Burkert, C.A.V., 2014. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Crops Prod.* 54, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.007>

Mbambo, B., Odhav B., Mohanlall, V. 2012. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). *J. Med. Plants Res.* 6, 5135–5141. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.151>

Menezes, P.R., Schwarz, E.A., Santos, C.A.M., 2004. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. *Fitoterapia* 75, 398–400. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.01.014>

- Muelas-Serrano, S., Nogal, J.J., Martínez-Díaz, R.A., Escario, J.A., Martínez-Fernández, A.R., Gómez-Barrio, A., 2000. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Ethnopharmacol.* 71, 101–107.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00185-3)
- Ododo, M.M., Choudhury, M.K., Dekebo, A.H., 2016. Structure elucidation of  $\beta$ -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. *SpringerPlus* 5. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2894-x>
- Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J.A., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., 2016. Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 14, 123–130.  
<https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.13>
- Priamo, W.L., De Cezaro, A.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., 2010. Precipitation and encapsulation of  $\beta$ -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids* 54, 103–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.02.013>
- Saeidnia, S., 2014. The Story of Beta-sitosterol- A Review. *Eur. J. Med. Plants* 4, 590–609. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/7764>
- Sheth, P., Sandhu, H., Singhal, D., Malick, W., Shah, N., Kislalioglu, M.S., 2012. Nanoparticles in the pharmaceutical industry and the use of supercritical fluid technologies for nanoparticle production. *Curr. Drug Deliv.* 9, 269–84. <https://doi.org/10.2174/156720112800389052>
- Silva, P.T. da, Fries, L.L.M., Menezes, C.R. de, Holkem, A.T., Schwan, C.L., Wigmann, É.F., Bastos, J. de O., Silva, C. de B. da, 2014. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciênc. Rural* 44, 1304–1311.  
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>
- Ulbricht, C.E., 2016. An Evidence-Based Systematic Review of Beta-Sitosterol, Sitosterol (22,23- dihydrostigmasterol, 24-ethylcholesterol)

by the Natural Standard Research Collaboration. *J. Diet. Suppl.* 13, 35–92. <https://doi.org/10.3109/19390211.2015.1008812>



## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES

Os estudos realizados nessa tese sobre as atividades biológicas de *P. bipinnatifidum* comprovaram a utilização dessa espécie na medicina popular para o tratamento de algumas doenças, principalmente às associadas à dor e à inflamação. Basicamente, este trabalho teve como objetivo investigar as ações farmacológicas dos extratos de *P. bipinnatifidum* e propor um método de encapsulação. Resultados interessantes foram obtidos, sendo os principais descritos a seguir.

Os extratos com solvente etanol e acetato de etila dos talos de *P. bipinnatifidum* resultaram em elevada atividade antioxidante, com  $IC_{50}$  de 27,11 e 59,43  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, sendo o extrato de acetato de etila nas concentrações de 80,0 e 160,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  comparável com o padrão ácido ascórbico em relação ao percentual de inibição do radical DPPH. Resultado semelhante foi obtido na análise antioxidante pelo método FRAP.

A atividade antimicrobiana de extratos de *P. bipinnatifidum* contra *S. pyogenes* foi alta para o extrato de acetato de etila (MIC 3,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e baixa para o extrato de etanol. Para os microrganismos de *E. faecalis* e *Listeria monocytogenes*, apenas o extrato de acetato de etila resultou em atividade antimicrobiana, com MIC de 10,0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para ambos os microrganismos. Não houve atividade contra *P. aeruginosa* para ambos os extratos.

Estes resultados estão diretamente relacionados à composição química dos diferentes extratos, onde compostos que contribuem para as atividades antimicrobiana e antioxidante estão presentes em maiores quantidades no extrato de acetato de etila, como os flavonoides quercetina, luteolina e apigenina, e os fitoesteróis  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol.

Nos testes *in vivo*, o extrato de acetato de etila a 500  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  apresentou atividade antinociceptiva significativa nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e formalina (em ambas as fases do teste). O extrato na mesma concentração também reduziu o edema da pata induzido por carragenina até 6 horas após administração, demonstrando significativa atividade anti-inflamatória. Os

receptores opióides mediarão o efeito antinociceptivo do extrato e seu efeito anti-inflamatório está relacionado com a inibição do estresse oxidativo. Os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato, provavelmente, estão relacionados à presença do composto  $\beta$ -sitosterol, considerando que este composto está em considerável concentração no extrato e já possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória comprovadas. No teste do campo aberto, o extrato a  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  não causou alterações na locomoção espontânea dos animais. Por fim, a administração aguda do extrato a  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$  não causou mortalidade em camundongos, o que demonstra que esse extrato é desprovido de toxicidade aguda.

Os ensaios de encapsulamento do extrato de acetato de etila pela técnica SEDS resultaram em maior eficiência de encapsulamento (89,56%) utilizando  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  de concentração de extrato (relação 1:1 extrato e PHBV) e temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nessas condições também foi verificado o menor tamanho médio de partículas, resultando em  $0,622 \pm 0,232 \text{ }\mu\text{m}$ , com coeficiente de variação de 37,34%. A maioria dos ensaios resultaram em partículas com morfologia esférica. A análise cromatográfica das partículas obtidas demonstrou que o processo provocou pequena variação na composição química do extrato, mantendo seus principais constituintes, como os fitoesteróis, campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Para o fitoesterol  $\beta$ -sitosterol, houve aumento em torno de 35% em sua concentração no extrato após o processo de encapsulação, sendo este um resultado bastante interessante, considerando as ações farmacológicas já relatadas cientificamente desse composto.