



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

YANG MIN YA

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS DE *REHMANNIA*
GLUTINOSA LIBOSCH E *EUCOMMIA ULMOIDES* OLIVER ORIUNDOS DA ÁSIA

CAMPINAS

2018

YANG MIN YA

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOLÓGICOS DE *REHMANNIA*
GLUTINOSA LIBOSCH E *EUCOMMIA ULMOIDES* OLIVER ORIUNDOS DA ÁSIA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de MESTRA em Ciências. Área de
Concentração Patologia Clínica.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Mary Ann Foglio

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO YANG MIN YA, E ORIENTADO PELA
PROFa. DRa. MARY ANN FOGLIO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Y16a Yang, Min Ya, 1983-
Avaliação de parâmetros farmacológicos de *Rehmannia glutinosa* Libosch
e *Eucommia ulmoides* Oliver oriundos da Ásia / Yang Min Ya. – Campinas, SP :
[s.n.], 2018.

Orientador: Mary Ann Foglio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Medicina tradicional chinesa. 2. Anti-inflamatórios. 3. Rehmannia. 4.
Eucommiaceae. I. Foglio, Mary Ann, 1960-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of pharmacological parameters of *Rehmannia glutinosa*
Libosch and *Eucommia ulmoides* Oliver from Asia

Palavras-chave em inglês:

Medicine, Chinese traditional

Anti-inflammatory agents

Rehmannia

Eucommiaceae

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Mary Ann Foglio [Orientador]

Giovanna Barbarini Longato

José Luiz da Costa

Data de defesa: 21-09-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

YANG MIN YA

ORIENTADOR: Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO

MEMBROS:

- 1. Profa. Dra. GIOVANNA BARBARINI LONGATO**
- 2. Prof. Dr. JOSÉ LUIZ DA COSTA**
- 3. Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [21/09/2018]

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas (FMC) – Unicamp por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial à Marcinha, pela competência resolvendo toda a parte burocrática de forma sempre eficiente.

Ao Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - Unicamp, pela infraestrutura para a realização do trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) – Unicamp.

À FAEPEX pela bolsa de estudo concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos prezados membros da banca examinadora por aceitarem o meu convite, pelo interesse, disposição e contribuição com o meu trabalho.

RESUMO

Fórmulas da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) são compostas geralmente por mais de uma planta medicinal, com o propósito de produzir efeitos sinérgicos através de interação entre as plantas ou diminuir possíveis efeitos adversos da planta principal. Com o aumento de uso dos fitoterápicos chineses após o regulamento RDC 21/2014 e a falta de estudos destes produtos no Brasil, foi feita uma triagem farmacológica de duas espécies muito utilizadas tradicionalmente na China, *Rehmannia glutinosa* e *Eucommia ulmoides*. Ambas as espécies são utilizadas como tonificante renal segundo as teorias clássicas da MTC. Estudos descrevem indicação contra osteoporose, artrite reumatoide e inflamação. Apesar de amplamente utilizada na China, essas espécies vegetais ainda são pouco estudadas no Brasil. Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objetivo contribuir com dados de eficácia e qualidade destas plantas, visando validar o seu uso no Brasil atendendo as RDCs 21 e 26/2014 da ANVISA. Os marcadores descritos para as espécies foram monitorados através de espectrometria de massas. Foi verificado em teste de toxicidade aguda que em elevada dose (2000 mg/kg), *R. glutinosa* apresenta aumento de estímulo nos animais e para a espécie *E. ulmoides* nenhuma alteração comparada com grupo controle, o que indica baixa toxicidade das espécies isoladamente. Foram avaliadas as atividades anti-inflamatória e anti-ulcerogênica das espécies em modelos experimentais de edema de pata por carragenina e ulcera induzida por etanol respectivamente. Os resultados demonstraram ações complementares, ou seja, a espécie *E. ulmoides* inibiu 90% de úlcera em dose mais alta testada, 1000 mg/kg, e *R. glutinosa* apresentou área ulcerada aumentada em 217% na dose 300 mg/kg. No modelo de Edema de Pata, *R. glutinosa* mostrou atividade anti-inflamatória em até 70% e *E. ulmoides* não apresentou dados significativos. Os resultados sugerem que o mecanismo anti-inflamatório da espécie *R. glutinosa* pode estar envolvido com a inibição de cicloxigenase com diminuição de produção de PGs (prostaglandinas). A associação frequente destas duas espécies pelos praticantes da MTC poderia ter como objetivo minimizar efeitos adversos provocados pela *R. glutinosa*. Além disso, as PGs modulam função renal e a ação de *E. ulmoides* é utilizado tradicionalmente como tonificante renal, sugerindo possível mecanismo de ação. Porém mais estudos serão necessários para elucidar tais possibilidades, além da associação destas espécies.

Palavras chaves: Medicina tradicional chinesa, anti-inflamação, *Rehmannia*, *Eucommia*.

ABSTRACT

Traditional Chinese Medicine (TCM) formulas are generally composed of more than one medicinal plant, for the purpose of producing synergistic effects through interaction between plants or lessening possible adverse effects of the main plant. With the increased use of Chinese herbal medicines with RDC Regulation 21/2014 and the lack of studies of these products in Brazil, a pharmacological screening of two traditionally used species, *Rehmannia glutinosa* and *Eucommia ulmoides*, was carried out. Both species are used as renal toner according to classical TCM theories. Studies describe indication against osteoporosis, rheumatoid arthritis and inflammation. Although widely used in China, these plant species are still poorly studied in Brazil. Based on this, the present work had as objective to contribute with data of effectiveness and quality of these plants, aiming to validate its use in Brazil attending RDC 21 and 26/2014 of ANVISA. The markers described for the species were monitored by Mass Spectrometry. It was verified in the Acute Toxicity test that at high doses, 2000mg / kg, *R. glutinosa* shows increased stimulation in the animals and for the *E. ulmoides* no alterations compared to the control group, indicating low toxicity of the species alone. The anti-inflammatory and cytoprotective action of the species were evaluated in experimental models of Paw Edema by Carrageenan and ethanol-induced ulcer respectively. The results showed complementary actions, that is, the *E. ulmoides* inhibited 90% ulcer at the highest dose tested, 1000 mg / kg, and *R. glutinosa* presented an ulcerated area increased by 217% at the 300 mg / kg dose. In the Paw edema model, *R. glutinosa* showed anti-inflammatory activity in up to 70% and *E. ulmoides* did not present significant data. The results suggest that the anti-inflammatory mechanism of the *R. glutinosa* species may be involved with the inhibition of cyclooxygenase with decreased production of PGs (prostaglandins). The frequent association of these two species by TCM practitioners could be aimed at minimizing adverse effects caused by *R. glutinosa*. In addition, PGs modulate renal function and traditional use of *E. ulmoides* is renal toning, what suggest a possible mechanism of action. However, further studies are needed to elucidate those possibilities.

Key words: Traditional chinese medicine; anti-inflammatory; *Rehmannia*; *Eucommia*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1-1 REVISÃO DAS PRINCIPAIS TEORIAS DA MEDICINA TRADICIONAL CHINESA (MTC).....	9
1-2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS PLANTAS SELECIONADAS AO ESTUDO.....	12
1-3 CONTEXTO BRASILEIRO.....	20
1-4 ETNOFARMACOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS.....	22
1-5 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROTETORES GÁSTRICOS.....	25
1-6 MECANISMOS INFLAMATÓRIOS.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVO GERAL.....	41
3-1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4 MATERIAL.....	43
5 METODOLOGIA.....	44
5-1 ANÁLISE QUANTITATIVA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS).....	44
5-2 ANÁLISE QUALITATIVA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - HPLC.....	45
5-3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	47
5-4 TESTE DE FORMALINA.....	50
5-5 TESTE DE ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	51
5-6 TESTE DE INFLAMAÇÃO POR CARRAGENINA.....	52
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
7-1 TESTES FITOQUÍMICOS.....	55
7-2 TESTES <i>IN VIVO</i>	60
7-2.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA.....	60
7-2.2 TESTE DE FORMALINA.....	63
7-2.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	66
7-2.4 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	68
8 CONCLUSÃO.....	74
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	76
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
11 ANEXOS.....	85

1 – Introdução

1-1: Revisão das principais teorias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC)

A medicina Tradicional Chinesa (MTC) baseia-se nos conceitos de *Yin-Yang* e Cinco elementos, acreditando que o equilíbrio entre eles constitui a saúde do indivíduo.

Segundo a teoria de *Yin-Yang*, que são duas forças opostas presentes em todos os fenômenos e objetos. E estas mantêm uma relação recíproca no meio natural e nenhum dos dois pode existir separadamente. De um modo geral, tudo o que é animado, em movimento, exterior, funcional, cujas capacidades se desenvolvem, tudo o que corresponde a uma ação é *Yang*. Tudo o que está em repouso, tranquilo, interior, material, cujas funções decrescem, tudo o que corresponde a uma substância é *Yin*. A segunda parte do livro “Clássico do Imperador Amarelo”, *Su Wen* disse: “O *Yin* está no interior, é o sustentador do *Yang*, o *Yang* está no exterior, é o enviado do *Yin*”. Ou seja, o *Yin* é a base material da capacidade de funcionar, é a essa título que é o sustentador do *Yang*. E o *Yang* é a manifestação, no exterior, do movimento da matéria interna, de onde ser chamado o enviado do *Yin*. Esta teoria explica que a atividade fisiológica do corpo humano é o resultado da manutenção de uma relação harmoniosa “da unidade dos contrários” dos dois princípios, o que explica a relação existente entre a “função” que pertence ao *Yang* e “a matéria” que é do domínio do *Yin*. O excesso ou a fraqueza do *Yin* ou do *Yang* são a causa essencial do desenvolvimento de doenças (Sun et al, 2018).

A teoria dos cinco elementos considera que o universo é formado pelo movimento e a transformação dos cinco princípios representados por: Madeira, Fogo, Terra, Metal e Água. Esta teoria considera-se que esses cinco princípios têm entre eles relações constantes originando o universo e toda a vida: eles se originam reciprocamente e são condicionados uns pelos outros. Seus movimentos e suas alterações incessantes realizam um ciclo que se sucede continuamente, dando a sua denominação: “Os cinco movimentos”. A expressão “produção recíproca” significa que os cinco movimentos se geram, se produzem mutuamente, favorecendo o seu crescimento respectivo. A dominação recíproca é o processo inverso pelo qual os elementos se governam e se restringem uns aos outros. Na MTC, os cinco movimentos e sua classificação em cinco elementos submetidos às leis de transformação, dominação e agressão explica concretamente a fisiologia humana, os

fenômenos patológicos constituem um guia para a elaboração do diagnóstico e do tratamento (Auteroche et al., 1992).

Baseando nesses princípios básicos da MTC, os órgãos existem parte *Yin* e *Yang* para o funcionamento e existe interação entre si, resultando em dominação e contra-dominação dos órgãos. Na situação de desequilíbrio, é possível interferir com medicamentos, que geralmente de origem natural, plantas, animais ou minerais ou com exercícios e tratamentos como massagem e acupuntura. Os órgãos são vistos como um sistema, que não funciona independente, mas em conjunto com outros órgãos. Dentro dos órgãos, existe parte de matéria, que é *Yin* e parte funcional, *Yang*. A matéria inclui a vascularização, tecidos, líquido extracelular entre outros e funcional que inclui metabolismo e todo funcionamento da parte material (Wu et al, 2018).

A MTC é atualmente estudada e comparada através dos métodos científicos e é valorizada devido às suas bases teóricas, registros sistemáticos com uso terapêutico tradicional e toxicidade das plantas medicinais, além das formulações consolidadas empiricamente por milhares de anos. Diferente da medicina ocidental, a MTC trata o paciente através de uma rede, empregando diversas plantas, minerais ou parte de animais com o único objetivo, voltar a homeostasia (Sun et al, 2018).

A MTC possui longa história e acúmulo de experiências clínicas, baseada no sistema cultural diferenciado e compreensão sobre o funcionamento do organismo vivo de forma única. O uso de fórmulas em MTC é fundamental para tratamento de sintomas e seu objetivo constitui no “múltiplo composto e múltiplo canal”, em que o fundamento é semelhante em alguns aspectos do conceito “*Network Pharmacology*” e “*Network Biology*” (Hu et al., 2017).

O conceito “*Network Pharmacology*” é frequentemente empregada para explicar a metodologia de cura da doença em MTC. A palavra “*network*” refere-se à rede molecular em um organismo alvo, por exemplo, os “alvos de rede” nos pacientes. Na “*Network Pharmacology*” de MTC, no entanto, o complexo dos fármacos MTC tornam-se outra rede molecular importante, que pode ser chamada de “balas de rede” que interagem com “alvos da rede” para ajudar o corpo a recuperar o equilíbrio. Especialmente, alguns componentes dos medicamentos MTC não são alvos de “alvos da rede”, mas visam outros componentes de medicamentos, de modo a aliviar seus efeitos colaterais, melhorar a atividade do componente principal, melhorar a absorção e/ou facilitar a droga principal atingir o sítio de ação e alvo da doença. Assim, a “*Network Pharmacology*” da MTC envolve pelo menos duas redes para serem consideradas na modelagem e análise (Xu et al., 2012).

De acordo com as teorias da MTC, é de suma importância escolher uma série de plantas medicinais (às vezes também partes dos animais ou minerais) com base em sintomas e características particulares de um paciente. Para montar uma fórmula (também conhecido como *fangji*), as ervas principais e habilitadoras são combinadas para melhorar a eficácia e minimizar os efeitos adversos. As espécies principais são conhecidas como plantas *jun*, que tratam a principal causa ou sintomas primários de uma doença. As espécies habilitadoras incluem as plantas de *chen*, que servem para aumentar ou ampliar os efeitos das *jun* e para aliviar os sintomas secundários; ervas *zuo*, que modulam os efeitos das ervas *jun* e *chen* e para neutralizar os efeitos tóxicos ou colaterais dessas ervas; e as ervas *shi*, que funcionam para facilitar a absorção e entrega de componentes ativos de ervas aos órgãos alvos. Assim, a combinação de componentes principais (*Jun*) e habilitantes (*Chen*, *Zuo* e/ou *Shi*) para formar uma rede de medicamentos pode-se constituir a base para a concepção de novas “*network bullets*” na futura aplicação da “*Network Pharmacology*” (Xu et al., 2012).

Segundo o clássico da Farmacopeia Chinesa, as espécies, *R. glutinosa* e *E. ulmoides*, possuem ação tonificante renal, tanto para *Yang* do Rim quanto para *Yin*. (Shi et al, 2016; Zhou et al., 2015; Zhu et al, 2016; Feng et al., 2016.) Entretanto, os sintomas descritos segundo diagnóstico de sistema de MTC são totalmente distintos comparando com a Medicina Ocidental, ou seja, apesar de ambas as plantas possuírem ação sobre a função renal, a finalidade do seu uso é sistêmica, agindo como hipoglicemiante, ação hipotensiva e etc. Além disso, os órgãos descritos na MTC possuem conotação de sistemas e energias que agem de forma integrada baseado na Teoria dos 5 Elementos. E segundo o Clássico do Imperador Amarelo, o Rim se manifesta nos ossos, ou seja, a saúde dos ossos é reflexo da saúde do sistema renal (Ye et. al., 2012; An et. al., 2016; Liu 2008; He et. al., 2013).

A informação etnofarmacológica da MTC das espécies *R. glutinosa* e *E. ulmoides* motivou avaliação de parâmetros farmacológicos para tentar compreender a associação destas espécies para o tratamento da osteoporoses, diabetes mellitus e hipertensão.

2-2: Revisão bibliográfica das plantas selecionadas ao estudo

Eucommia ulmoides Oliv (Eucommiaceae), originada da China, possui aproximadamente 15 a 20 m de altura. Suas folhas, caule e casca são tradicionalmente utilizados como suplemento antirreumático por mais de 2000 anos segundo registros da literatura. A planta também é incorporada nas formulações da MTC para tratamento de impotência, espermatorrea, osteoporose, síndromes da menopausa, hipertensão, artrites reumatóides e dor lombar (He et al, 2014).



Fonte: He et al, 2014

Figura 1: Foto ilustrativa da espécie *Eucommia ulmoides* Oliv., da família Eucommiaceae, suas folhas e cascas.

Segundo *Shennong Bencao Jing* e *Bencao Gangmu*, *E. ulmoides* fortalece órgãos internos, ossos e músculos, além de prevenir contra senescência, fratura óssea, doenças da junta e desordens da menopausa (Wang et al, 2011).

Vários compostos bioativos foram descritos para a espécie *E. ulmoides*, tais como iridoides (ácido geniposídico, geniposide e aucubina), lignanas (pinoresinol diglucoside), fenilpropanoides (ácido clorogênico), e flavonoides (rutina, quercetina e kaempferol), e polissacarídeos. Pesquisas modernas têm descoberto várias propriedades farmacológicas da *E. ulmoides* relacionadas a estes compostos (Wu et al. 2016).

O Ácido clorogênico, um dos compostos bioativos majoritários encontrados na espécie, possui atividade inibitória de peroxidação lipídica, proteção hepática, antimicrobiana e antiviral. Além disso, foi verificado que ácido clorogênico presente nos extratos aquosos da casca de *E. ulmoides* é um potencial antidepressivo, agindo como neuroproteção, promovendo a liberação de

serotonina penetrando na barreira hematoencefálica dos ratos nas doses 200 e 400 mg/kg/dia durante 7 dias (Wu et al. 2016).

Outros componentes descritos para a espécie são: Aucubina, composto bastante conhecido que possui ação de estimulação parassimpática e antimicrobiana. Ácido geniposídico, que exibe efeito anti-envelhecimento e anti-inflamatório, promovendo síntese de colágeno. Geniposide, que mostra atividade anti-trombótica, anti-inflamatória e antitumoral *in vivo*. Pinoresinol diglucoside tem mostrado atividade anti-hipertensiva (Xu et al, 2015).

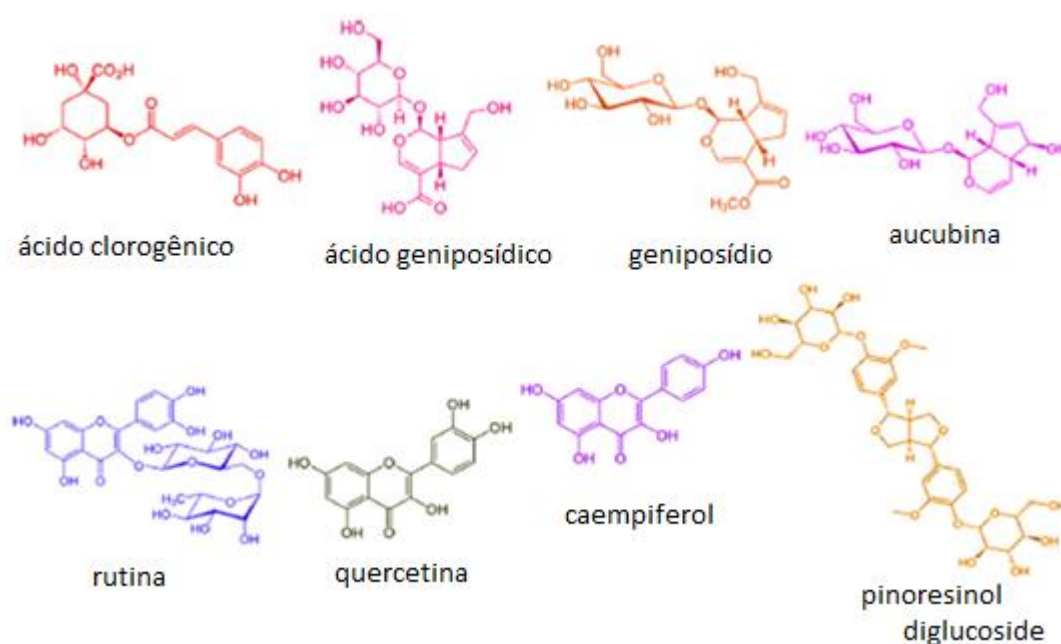


Figura 2: Estruturas químicas de compostos identificados na espécie *E. ulmoides*

Foi descrito que os compostos polifenóis da *E. ulmoides* previnem osteoporose induzido em ratos OVX. (Huang et al, 2014) Outro estudo revelou que o extrato da casca da planta possui componentes com atividade na prevenção de osteoporose nos ratos com deficiência estrogênica induzidos, sugerindo que alguns compostos podem desempenhar efeito fitoestrogênico (Wang et al, 2011).

Li et. al, em 2017, isolaram três frações da *E. ulmoides* através de cromatografia por troca iônica e gel-permeação todas contendo galactose e manose, que interagem com macrófagos segundo as evidências das décadas passadas. A fração que exerceu maior atividade anti-inflamatória contém ramnose, arabinose, galactose, manose e glicose na razão molar 4,6:8,6:6,1:1:2. No teste *in vivo*, os animais foram induzidos a choque séptico com lipopolissacarídeo (LPS), o grupo administrado com 10mg/kg da fração de *E. ulmoides* apresentou sobrevivência maior comparado

com outros grupos testados. Os resultados mostraram que os níveis de TNF- α e IL-6 estavam diminuídos. *E. ulmoides* é considerado uma das melhores plantas tônicas segundo MTC, o seu uso tradicional está relacionado com a regulação homeostásica, o que sugere, para autores, que essa regulação está relacionada com a imunidade inata. A imunidade inata desempenha papel central na regulação dos tecidos, cicatrização e regeneração dos ossos (Li et al., 2017).

Aucubina, um iridoide presente na *E. ulmoide* possui efeito anti-inflamatório. A casca da planta inibe produção de TNF- α , IL-6, cicloxigenase 1, prostaglandina E e NO em LPS nos macrófagos peritoneais. Segundo Wang et al., em 2017, artrite reumatoide é considerada como uma doença crônica e inflamatória, além de ser uma doença autoimune sistêmica (Wang et al., 2016).

As mudanças patológicas incluem proliferação de artrite tipo fibroblasto sinoviocitos (RA-FLS), espessamento da camada de revestimento, infiltração das células inflamatórias, formação de pannus e dano de cartilagem e de osso, resultando em deformação irreversível com perda de função (Wang et al., 2016).

O estudo comprovou que o extrato etanólico 70% exibe maior efeito apoptótico de RA-FLS, proliferação patológica do tecido sinovial. Os fatores inflamatórios foram estudados, pois a inflamação é a principal causa e células Th17-positivo é o subconjunto de células T que produzem IL-17 e promovem ocorrência e desenvolvimento do processo inflamatório (Wang et al., 2016).

Aumento de produção de IL-6, TNF- α , IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias por células Th17 e IL-7 podem promover sinergicamente o surgimento e desenvolvimento da inflamação. Células Th17 podem induzir proliferação de sinoviocitos e aumento de formação de osteoblasto, levando à destruição dos ossos (Wang et al., 2016).

Pela avaliação em citometria de fluxo, extrato etanólico 70% diminuiu o número de linfócitos Th17-positivo e níveis de sêrum IL-17, que podem fazer parte do mecanismo anti-inflamatório. IL-10 age reduzindo resposta inflamatória e expressão dos mediadores inflamatórios. IL-10 que reduz a migração dos linfócitos para local lesionado através de inibição de produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de níveis de substâncias endógenas anti-inflamatórias, tais como antagonistas de receptor TNF- α e IL-1, suprimindo, em seguida, produção de TNF- α e IL-1, inibindo a progressão da doença. Ensaios da ELISA também indicaram que extrato etanólico 70% aumentou o nível sêrum IL-10. A citocina TNF- α pró-inflamatória desempenha papel importante na regulação imunológica (Wang et al., 2016).

Aumento de produção de TNF- α provoca degradação de matriz da cartilagem e decomposição do colágeno, promovendo agregação plaquetária e infiltração das células inflamatórias. Antagonistas de TNF- α foram desenvolvidas comercialmente para uso clínico. Além disso, IL-1 β regula várias citocinas, regulação imunológica e mediadores pró-inflamatórios. Esta citocina desempenha papel importante na erosão dos ossos e destruição de cartilagem na artrite reumatoide. A diminuição de produção (downregulation) de TNF- α e IL-1 β pelo extrato etanólico da planta pode ser outro mecanismo de ação anti artrite reumatoide (Wang et al., 2016).

No estudo de Lu et al., em 2013, o mecanismo de ação farmacológica da casca de *E. ulmoides* contra osteoartrite é inibir apoptose dos condrócitos através da regulação de degradação de matriz extracelular, em que os níveis de metaloproteinase-1 (MMP-1), MMP-3 e MMP-13 presentes no líquido sinovial dos ratos com osteoartrite são diminuídos nos grupos com tratamento pela espécie *Eucommia* (Lu et al., 2013).

Xie et al. comprovou que o extrato aquoso de casca de *E. ulmoides* inibe progressão de osteoartrite através de inibição de apoptose de condrócitos nos modelos de rato. Além disso, o estudo revelou que o extrato da planta diminui a secreção de IL-1 β e IL-6, que inibe a reação inflamatória, produção de MMP-3 e diminuição de expressão de proteína p-Akt protegendo a cartilagem articular em doses dependentes (1,35 g/kg/dia e 2,70 g/kg/dia durante 8 semanas). Entretanto, com a observação das imagens radiográficas, esclerose subcondrial ainda estava presente, indicando que o extrato da planta não inibiu progressão de osteoartrite por completo. Ao mesmo tempo, o extrato também previne dano patológico de cartilagem articular, mas necrobiose parcial dos condrócitos ainda foi observado nos ratos tratados. Portanto, apesar de o extrato da planta possuir atividade sobre a secreção de matriz extracelular e apoptose dos condrócitos, o seu efeito na prevenção de degradação articular foi limitado (Xie et al., 2015).

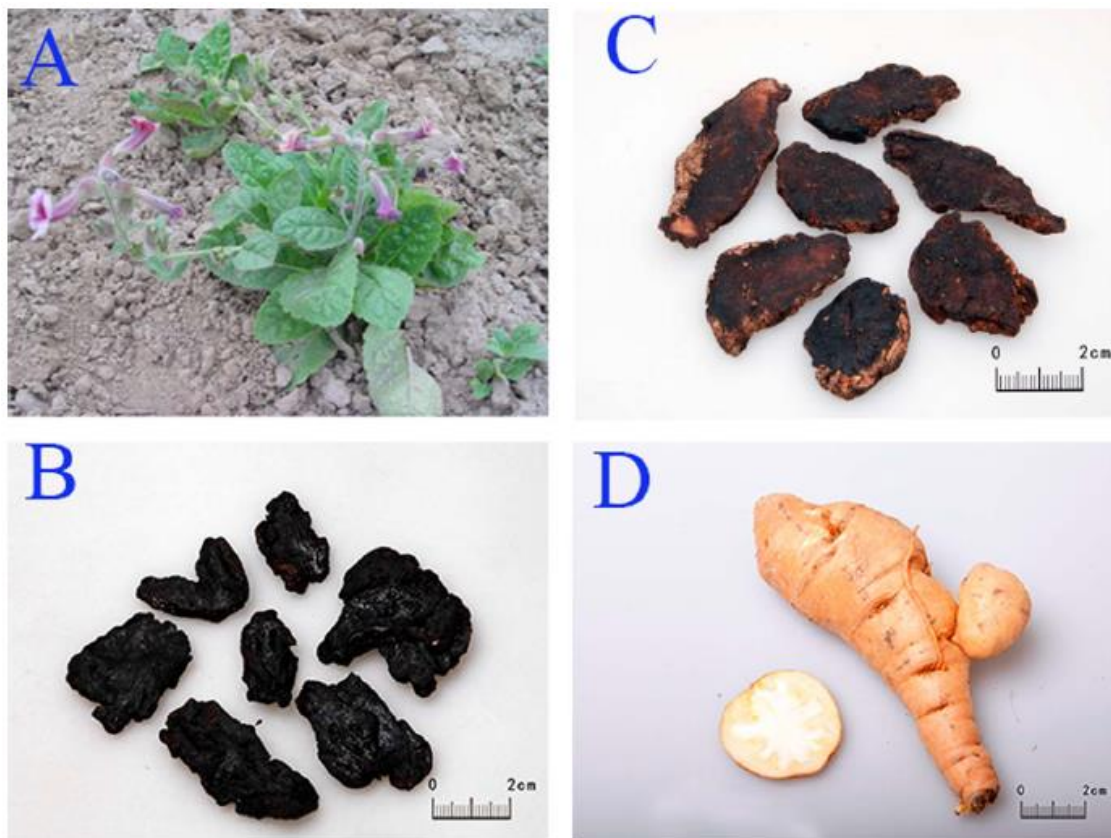
Segundo Niu et al., administração oral de 1g/kg/dia de extrato etanólico da casca da planta durante 20 dias nos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina foi avaliada com o objetivo de avaliar efeito da planta na doença nefropatia diabética e diabetes tipo 1. Foi observada diminuição significativa de proteinúria com diminuição de volume de urina. O efeito protetor renal da planta foi confirmado com diminuição de anormalidade de nefropatia diabética e perda de função renal nos animais, além de inibir fibrose renal. Entretanto, o efeito sobre glicemia não foi significativa, sugerindo que o melhoramento da função renal não estava relacionado com a diminuição da hiperglicemia, mas através da inibição de via de sinalização TGF- β /Smad, diminuição de TGF- β

(fator de crescimento transformador beta) e CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo) nos rins (Niu et al., 2016).

Recentemente, Wang et al (2016) demonstraram, através de citometria de fluxo, que *E. ulmoides* Oliv. é capaz de diminuir o nível sérico de IL-17, comprometendo parte de mecanismo anti-inflamatório. Além disso, no ensaio ELISA, os autores observaram aumento de nível sérico de IL-10, que reduz migração dos linfócitos para área lesionada através de inibição de produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de nível endógeno de substâncias anti-inflamatórias, tais como receptor TNF α solúvel e receptor antagonista de IL-1, o que inibe progressão da doença. (Wang et al., 2016)

Segundo Xie et al., a espécie *E. ulmoides* nas doses altas, 1,35 e 2,70 g/kg/dia nos ratos induzidos de osteoartrite possuem ação inibitória de expressão de MMP-3 de forma dose dependente, além de inibir a produção de TNF- α e IL-6 e supressão de secreção de COX₂ e PGE₂ (Xie et. al., 2015).

Rehmannia glutinosa Libosch (Scrophulariaceae), é utilizada terapeuticamente através de três métodos de processamento de acordo com as teorias de MTC: raiz fresca, seca e preparada. Acredita-se que o processamento da planta possui efeito de reduzir calor e ativação de circulação sanguínea, nutrir *Yin* e tonificar Rim. Pesquisas demonstraram atividades farmacológicas sobre o sistema imune, sistema circulatório, sistema endócrino, e sistema nervoso (Zhang et al, 2008).



Fonte: Liu, 2017

Figura 3: Ilustração da espécie *Rehmannia glutinosa* Libosch, da família Scrophulariaceae. A: imagem representativa da *R. glutinosa* (Gaertn) DC.; B: *R. glutinosa* preparata; C: raiz seca da *R. glutinosa*; D: raiz da *R. glutinosa* fresca.

Estudos fitoquímicos identificaram aproximadamente 70 compostos, incluindo polissacarídeos, oligossacarídeos, especialmente estaquiose e monossacarídeos, entre os compostos majoritários. Iridoides, como catalpol e dihidrocatalpol, flavonoides e aminoácidos também foram identificados na planta. Alguns compostos são transformados de acordo com o processamento, resultando em diferentes ações farmacológicas. *R. glutinosa* tem ganhado interesse nas comunidades de pesquisa não somente pelo seu uso tradicional na MTC, mas também por várias contribuições: 1) composto Catalpol identificado na planta possui ação hipoglicemiante, diurético e efeito laxativo, além de estaquiose, que possui ação como imunoestimulante e hipoglicemiante. Esses estudos explicam teoricamente o seu uso tradicional e requer mais pesquisas. 2) É utilizada normalmente em combinação com outras plantas na MTC e os compostos presentes nas formulações são mais complexos devido ao processamento e interação entre si, o que dificulta o seu estudo fitoquímico e justifica o seu largo uso (Zhang et al, 2008).

Glicosídeos iridoides, tais como catalpol, aucubina, leonuride e melittoside, e glicosídeos feniletilalcool, tais como acteoside, echinacoside e isoacteoside e derivados furfural, como 5-hidroxi metil-2-furfural (5-HMF) são componentes envolvidos com a atividade da planta.

Por exemplo, acteoside possui ação hepatoprotetora, 5-HMF possui ação anti-anemia. Os componentes acteoside, 5-HMF e catalpol devem ser utilizados como marcadores para controle de qualidade da *Rehmanniae radix* (Xu et al, 2012).

Segundo Xu et al.(2005), o composto 5-HMF é um componente resultante do processamento de *R. glutinosa*, marcador de identificação do processamento de *Rehmanniae* na farmacopeia chinesa (Vol. 1, versão 2005). Além disso, o catalpol degrada com o processamento da raiz da planta, encontrando em menor quantidade na raiz processada do que seca (Xu et al, 2012).

Rehmannia glutinosa (Libosch) é utilizado tradicionalmente em formulações na MTC. Na sua associação com *Astragali radix* na proporção 2:1, w/w (*Astragali Radix: Rehmanniae Radix*), é observado efeito de cicatrização nas úlceras dos pés diabéticos em modelos animais. (Zhang et al, 2012). Em associação com *Rhizoma dioscoreae* e *Comas officinalis*, é observado melhora significativa de qualidade de vida pós-cirúrgico nos pacientes de endometriose (Zhao et al, 2013). Formulação Yangkyuksanhwa-tang (*Lonicera japônica* Thunb., *Rehmannia glutinosa*, *Forsythiae fructus*, *Gardeniae fructus*, *Menthae herba*, *Anemarrhena rhizoma*, *Gypsm fibrosum*, *Schizonepetae herba*, *Ledebouriellae radix*) que compõe *Rehmannia glutinosa* como um dos componentes principais, melhora metabolismo lipídico, tolerância de glucose e inibe acúmulo de gordura corporal (Lee et al, 2016).

Segundo Zhou et al., em 2015, inflamação vascular e doenças cardiovasculares são as causas de mortalidade da população diabética. As citocinas proinflamatórias TNF- α , IL-6, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) e estresse oxidativo são os marcadores utilizados na inflamação vascular. Os níveis de citocinas e estresse oxidativo são elevados no sangue dos pacientes diabéticos. Níveis sanguíneos elevados de TNF- α e IL-6 são prejudiciais à sensibilidade celular contra insulina e promove inflamação vascular e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A fração precipitada de etanol obtida de extrato de água quente de raiz de *R. glutinosa* Libosch., que possui polissacarídeos como principal componente, demonstrou atividade hipoglicemiante nos camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Administração oral dessa fração polissacarídica de *R. glutinosa* (RGP) aumentou significativamente o nível de insulina sérica e insulina pancreática nos camundongos diabéticos, além de melhorar significativamente a secreção de insulina basal e conteúdo de insulina nas ilhotas pancreáticas dos camundongos diabéticos. A atividade antidiabética de RGP está associada com aumento de síntese e secreção de insulina pancreática, aumento de síntese glicogênio hepática e diminuição de gliconeogênese hepática. RGP também melhora o nível circulante dos marcadores de inflamação vascular e estresse

oxidativo nos camundongos diabéticos, diminuindo o nível sanguíneo de TNF- α , IL-6, MCP-1, MDA e aumentando, em paralelo, níveis sanguíneos de SOD (superóxido desmutase) e atividade GPx (glutathione peroxidase) (Zhou et al., 2015).

1-3: Contexto Brasileiro

Para que qualquer substância com potencial terapêutico, incluindo substâncias oriundas de produtos naturais, possa ser comercializada, registrada como medicamento fitoterápico ou mesmo ser investigada no âmbito clínico, é necessário cumprir critérios mínimos de investigação não clínica que tenham a capacidade de sugerir seu potencial toxicológico e inferir seus reais riscos à saúde. No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pelo registro de medicamentos e pela fiscalização das empresas que os produzem. Esta agência realiza o controle sanitário dos produtos, e normatiza desde a sua produção até distribuição, publicidade, consumo e descarte.

No Brasil, o uso das plantas medicinais de origem chinesa está aumentando. Segundo a RDC 21, de 25 de Abril de 2014, pelo período de três anos, há o acompanhamento da utilização de produtos da MTC no país. São considerados produtos da MTC as formulações obtidas a partir de matérias-primas de origem vegetal, mineral e cogumelos de acordo com as técnicas da MTC e integrantes da Farmacopeia Chinesa. Na sua fabricação, pode ser feita apenas de modo industrializado seguindo requisitos que evitem a contaminação e garantam a qualidade do produto (ANVISA, 2014).

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também instituiu que durante esse período de monitoramento, é obrigatório a todas as empresas estabelecidas no país que adquirissem insumos utilizados na produção de produtos da MTC cadastrassem junto à ANVISA todos os insumos farmacêuticos ativos com os quais trabalhariam (ANVISA, 2014).

Entretanto, formulações tradicionais são diferentes se comparar com drogas convencionais, pois são mistura das plantas medicinais, que dependem da época da colheita, do processamento e do método de preparo da formulação, afetando na qualidade do produto final (Chen et al, 2011).

Plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos seus próprios constituintes, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do usuário como idade, sexo, condições fisiológicas. A falta de regulamentação e controle na comercialização, fácil acesso, risco de contaminação e/ou adulteração do material e uso diferente da forma tradicional são fatores de risco que podem ocasionar problemas oriundos ao seu uso. Além disso, o uso desses produtos pode comprometer a eficácia de tratamentos convencionais, principalmente a medicamentos que possuem baixo índice terapêutico, devido a interações farmacodinâmicas e farmacocinéticas medicamentosas (Toccafondo & Huang, 2012; Balbino &

Dias, 2010; Silveira, Bandeira & Arrais 2008). Com base nisso, torna-se cada vez mais necessários estudos que avaliem possíveis interações entre os compostos presentes na espécie a fim de caracterizar qual o efeito decorrente a essas interações e quais são os compostos ou classe de compostos responsáveis pelo efeito em questão.

Segurança. Eficácia e Reprodutibilidade são critérios obrigatórios para possibilitar o registro de fitoterápicos em nosso país determinado pela Lei 6.360/76 e pela RDC 26/2014 que tem como principal objetivo estabelecer os requisitos mínimos para o registro e promover a entrada de medicamentos fitoterápicos com segurança, eficácia e qualidade, no mercado brasileiro. Esta resolução está apoiada pela Instrução Normativa IN 04/2014 que determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico.

Na maioria das vezes, os laudos fornecidos pelos fabricantes não possuem informações suficientes, tais como teores dos componentes envolvidos com a atividade, descrição de valores máximos e mínimos dos componentes tóxicos (caso existam) entre outros, que dificulta no controle de qualidade dos produtos.

Portanto, há necessidade de avaliar teor dos ativos, dosagem da quantidade dos marcadores, assim como toxicidade e eficácia das matérias primas adquiridas na China, contribuindo na consolidação do uso dos mesmos com segurança.

1-4: Etnofarmacologia e desenvolvimento de novos medicamentos

As propriedades medicinais das plantas conhecidas tradicionalmente pelos homens tem sido foco de pesquisa científica e a história demonstra que as plantas afetam relações humanas em todos os aspectos, incluindo evolução sócio-cultural e econômica de diferentes populações de diferentes regiões (Valli et al., 2012).

Medicina Tradicional Chinesa (MTC) é uma prática nos países asiáticos há milhares de anos. Seu uso particular ou combinado com tratamentos ocidentais permite melhores resultados em tratamentos. Fórmulas MTC são compostas geralmente por mais de uma planta medicinal, com o propósito de produzir efeitos sinérgicos através de interação entre as plantas ou diminuir seus possíveis efeitos adversos (Zhang et al. 2016).

A MTC trata o homem e o universo como uma unidade, ou seja, a relação entre o ser humano e a natureza deve ser harmônica. De acordo com ela, a doença é originada pela falta de equilíbrio com a natureza, a sociedade ou relação inter-pessoal, que é similar em vários aspectos com a medicina Galênica da Roma e da Grécia antiga (He 2015).

Esta prática da MTC está intimamente ligada à evolução da história, incluindo desenvolvimento da agricultura, período de grandes guerras, epidemias e fomes. Na sociedade primitiva, os homens viviam nas cavernas ou nos campos, onde sofriam, frequentemente, intoxicação alimentar, ataques de calor, resfriados e etc. Fuxi, imperador e representante do povo na época, testava plantas em busca do seu efeito terapêutico e toxicidade, além de transformar pedras em agulhas com a finalidade de estimular alguns pontos dolorosos para cura das enfermidades, considerado fundador de MTC. O conceito de utilizar alimento como cura na MTC também foi estabelecido nessa época, pois as fontes de alimentação como frutas, plantas e carne aumentavam a resistência da população contra determinadas enfermidades, assim como seu processamento para aumentar sua absorção (Zhang 2005).

Baseado nos conceitos de cura de Fuxi, Shennong ensinava noções de agricultura ao povo, além de testar gosto e efeito terapêutico das plantas. Estes registros sobre as plantas medicinais foram passados de geração em geração, que foram editados no livro “Shennong Ben Cao Jing” aproximadamente no século 2 a.C. O livro contém registro de 365 plantas medicinais, com classificação em soberano (plantas não tóxicas), subordinado (plantas com pouca toxicidade) e auxiliar (plantas com toxicidade alta) (Zhang 2005).

O sistema MTC inclui teorias tais como *yin* e *yang* (forças positivas e negativas que são interdependentes e alternadas entre si), e *wuxing* (cinco elementos – água, fogo, metal, madeira e terra. As relações entre eles são promocionais ou destrutivas), e *jingluo* (meridianos). Este sistema de teorias é derivado do livro *Huangdi Neijing*, que surgiu no período de Guerra dos Estados (475-221 B.C), estabelecendo características únicas de MTC (He 2015).

A teoria de *Yin-Yang* constitui pensamento central da MTC. No seu desequilíbrio, hiperatividade ou hipoatividade de forças *Yin* e *Yang*, as doenças surgem. Esse desequilíbrio na MTC é identificado utilizando-se estratégias tais como observação, cheiro, interrogação e palpação, definindo características únicas de cada paciente e personificando o tratamento (Shi et al. 2016).

A MTC enfatiza “a cura antes do surgimento da doença”, e quando a doença se estabelece no corpo físico, os tratamentos possuem objetivo de tentar interromper o seu desenvolvimento. Ao longo da história, MTC se desenvolveu num sistema único com características peculiares, incluindo tratamento acupuntura e moxabustão, massagem terapêutica e *qigong* (exercício de respiração), além de tratamento com plantas medicinais (He 2015).

Em contraste com a medicina natural que utiliza plantas e outros remédios de origem natural, MTC é um sistema de prática médica antiga que enfatiza regulação de integridade do corpo humano e a sua relação com o meio ambiente. Seguindo os princípios de compatibilidade de Rei (*Jun*), Ministro (*Chen*), Assistente (*Zuo*), Mensageiro (*Shi*), MTC cria combinações de plantas medicinais que interagem entre si para tratar a enfermidade. Tipicamente, estas formulações são compostas por vários tipos de plantas medicinais, parte dos animais ou minerais, em que apenas uma substância representa o componente principal e o restante exerce efeito sinérgico ou reduz a toxicidade (Bai, 2016).

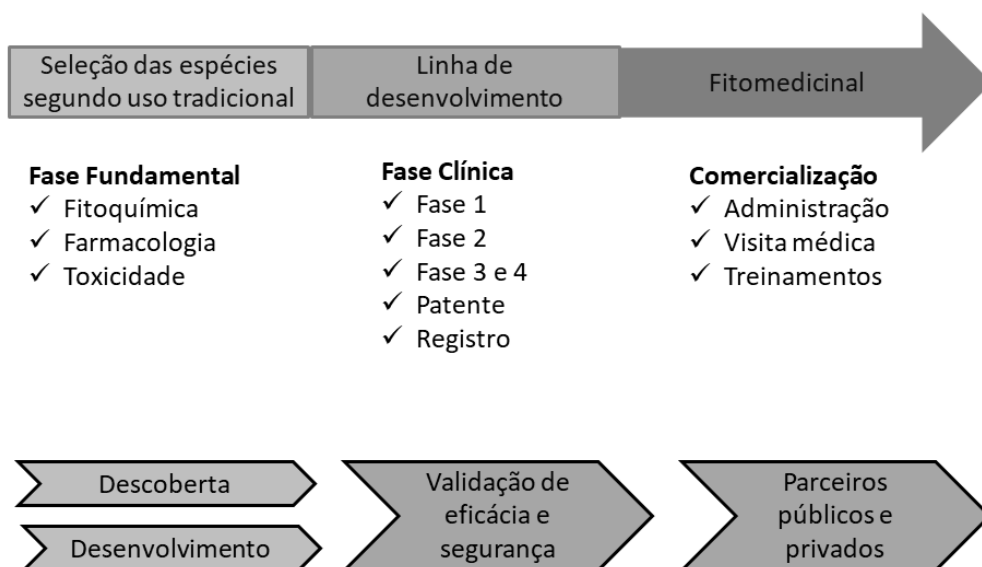
Numerosas destas prescrições foram estudadas tendo suas atividades comprovadas baseadas na farmacologia moderna, porém muitos dos mecanismos de ação envolvidos são desconhecidos, assim como seus componentes ativos (Wang, et al. 2008).

Apesar das limitações dessas formulações de MTC, tais como composto ativo desconhecido, disponibilidade de matéria prima limitada, qualidade de matéria prima variada, pouca estabilidade de preparação e testes de toxicidade pouco conhecidos, ainda é uma prática viável como fonte de espécies vegetais para bioprospecção devido às informações empíricas ricas e seu uso crônico comprovado (Chan, K. 1995). Estes conhecimentos tradicionais são vantajosos e representam uma terapia alternativa especialmente nos países onde a pesquisa e o desenvolvimento

das indústrias farmacêuticas são escassos, pois o custo é mais baixo e reduz o tempo de desenvolvimento de novas drogas, ao comparar-se com identificação de novas moléculas (Valli, 2012).

Com a finalidade de investigar as plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica consiste uma estratégia valiosa em combinar informações extraídas a comunidades locais que fazem uso destas com estudos químicos e farmacológicos realizados em laboratórios especializados. O método etnofarmacológico permite a formulação de hipótese em relação às substâncias ativas e atividades farmacológicas responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas pelas comunidades. A seleção de espécies vegetais para pesquisa e desenvolvimento baseada no uso tradicional de um dado efeito terapêutico em humanos pode se constituir num valioso atalho para a descoberta de novos fármacos e moléculas, pois o seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica em humanos (Elisabetsky, et al. 2000).

Partindo do método etnofarmacológico de seleção das espécies, as plantas inicialmente são estudadas quanto às características fitoquímicas, farmacológicas e toxicidade. A etapa após o desenvolvimento de novos produtos para medicamentos é a fase de validação de eficácia e segurança, consistindo em testes de fases clínicas envolvendo mamíferos e humanos, patente e registro, e a última etapa corresponde à comercialização. O esquema a seguir resume o processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (Figura 4):



Fonte: Valli, 2012 – Quím Nova

Figura 4: Esquema das etapas envolvidas no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos

1-5: Mecanismos de ação dos protetores gástricos

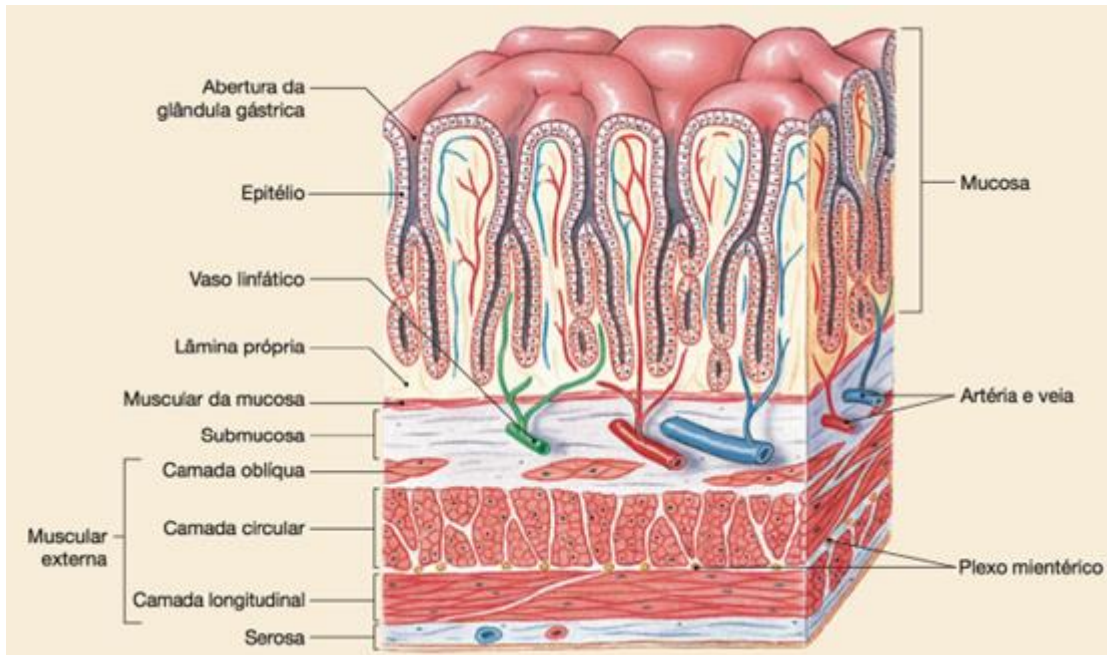
O estômago possui o ambiente peculiar principalmente pela quantidade elevada de ácido clorídrico, que mantém o pH entre 0,9 e 2,0. Esse ambiente ácido, além de participar da digestão, desempenha papel de extrema importância impedindo a entrada de muitos microorganismos e, portanto, protege o organismo de agentes infecciosos. No entanto, isso faz com que as mucosas estomacais e duodenais fiquem expostas à ação do ácido e da pepsina, responsáveis pelo início do processo de digestão (Bighetti, et al., 2002)

Mecanismos tais como presença de junções estreitas intercelulares entre as células epiteliais gástricas, presença de camada de mucina, presença de prostaglandinas na mucosa gástrica e a secreção de íons de bicarbonato na camada de mucina protegem o estômago contra lesões causadas pelo suco gástrico (Sauer et al 2018).

A mucosa gástrica completa é capaz de resistir à digestão ácida, possuindo uma camada aderente de muco viscoelástico, agindo como uma barreira física, além de conter HCO_3^- , secretado para muco neutralizar ácidos presentes na região estomacal. Muitas funções protetoras dependem da síntese de prostaglandinas PGE_2 e PGI_2 pelas células da mucosa gástrica (Waller et al., 2018).

As prostaglandinas E_2 e I_2 inibem a secreção de suco gástrico através de efeito direto nas células parietais e aumentam o fluxo sanguíneo na mucosa, além de estimular a secreção de muco e bicarbonato (Hardman et al, 2012).

A estrutura básica da parede gastrointestinal consiste em quatro camadas, que são mucosa interna voltada para o lúmen, camada conhecida como submucosa, camada de músculo liso conhecidas coletivamente como muscular externa e, por fim, uma cobertura de tecido conectivo denominada serosa (Silverthorn, 2017).



Fonte: Silverthorn, 2017

Figura 5: Vista seccional do estômago e intestino. Camada mucosa interna voltada para o lúmen, camada submucosa, camada de muscular externa e camada serosa.

As úlceras pépticas são compreendidas como desequilíbrio entre os fatores de defesa da mucosa (bicarbonato, mucina, prostaglandina, óxido nítrico, outros peptídios e fatores de crescimento). E, segundo sua localização, as úlceras pépticas podem ser classificadas em gástricas ou duodenais, sendo ambas histologicamente semelhantes (Monteiro, 2006).

A úlcera gástrica é uma patologia complexa e multifatorial, cuja etiologia está relacionada com o desequilíbrio entre os fatores agressores e os defensores da mucosa gástrica. Durante o processo digestivo, essa mucosa está continuamente exposta ao ácido clorídrico e pepsina secretados. A produção de muco citoprotetor e bicarbonato criam uma barreira que neutraliza a ação do ácido sobre as células. Tal peculiaridade faz com que o controle da secreção, da digestão e da produção de fatores citoprotetores seja de extrema complexidade, com a participação do sistema nervoso central, plexo mioentérico, sistema nervoso autônomo, hormônios, neurotransmissores e autacóides (Sauer et al 2018).

A perda da integridade da mucosa gastrointestinal é multifatorial, com diminuição dos elementos protetores (redução das funções do sistema imune e da capacidade de cicatrização) e aumento dos fatores de injúria (infecção de *Helicobacter pylori*, uso de antiinflamatórios não esteroidais, aumento de acidez, histórico familiar, fumo, álcool, estresse e inflamação). Com o desenvolvimento de medicamentos supressores de acidez gástrica, especialmente antagonistas de receptores de histamina (bloqueador de H₂) e inibidores de bomba de próton, abriu um novo

capítulo para tratamento de úlcera péptica. Esta abordagem reduziu drasticamente a necessidade de cirurgia e aumentou papel dos fármacos na terapia (Eichenseher et al., 2018).

A secreção ácida gástrica é regulada por mecanismos centrais e periféricos. A regulação central envolve a estimulação vagal pelo sistema nervoso central (mediada por receptores muscarínicos M_1) e consequente liberação de neurotransmissores das fibras pós-ganglionares no epitélio gástrico. A regulação periférica, por sua vez, compreende os eventos de exocitose em células endócrinas gástricas e intestinais, estimuladas principalmente pela histamina, acetilcolina e pela gastrina (Schubert, 2000).

Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica podem ser didaticamente divididos em proteção pré-epitelial, epitelial e subepitelial (Guha & Kaunitz, 2002).

A proteção pré-epitelial é constituída pela barreira muco-bicarbonato, que auxilia na prevenção dos efeitos lesivos do conteúdo gástrico secretado. O muco, constituído principalmente por mucinas glicoproteicas, é secretado no lúmen gastroduodenal pelas células epiteliais superficiais, pelas células do colo glandular e pelas glândulas submucosas de Brunner. É armazenado em grânulos no citoplasma das células mucosas do colo e nas células epiteliais superficiais, antes de ser liberado por exocitose (Allen & Flemstrom, 2005).

Diversos secretagogos estimulam a secreção de mucinas no estômago. Dentre eles estão os agonistas muscarínicos, os agonistas β -adrenérgicos, a substância P, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), as prostaglandinas (E_1 , E_2 , $F_2\beta$, I_2) e a secretina. O Ca^{2+} , a proteína quinase C e o AMPc, são os principais mediadores intracelulares envolvidos nos processos de secreção de mucinas (Forstner, 1994).

O bicarbonato é produzido e secretado pelas células epiteliais superficiais da mucosa gástrica e pelas células de Brunner duodenais, tornando a secreção mucosa alcalina. A secreção gástrica do bicarbonato é estimulada pelo odor, paladar, visão e pensamento nos alimentos (fase cefálica), pelo ácido no lúmen gástrico (fase gástrica) e pelo ácido gástrico no lúmen duodenal (fase duodenal) (Qiao et al., 2006).

Peptídeo intestinal, prostaglandinas e agonistas muscarínicos também estimulam esta secreção. A ativação do sistema nervoso simpático (em situações de estresse) é capaz de inibir a secreção gástrica de bicarbonato. A proteção epitelial é garantida pelas propriedades intrínsecas das células epiteliais presentes na mucosa gástrica, graças à sua morfologia e características bioquímicas. Essas propriedades incluem a) o caráter hidrofóbico da mucosa que impede a difusão

de íons hidrogênio, b) a presença de compostos sulfidrílicos não-proteicos, capazes de sequestrar ânions superóxidos e proteger diretamente a camada de muco dos radicais livres, e c) a capacidade de renovação tecidual através de migração e proliferação celular, apresentando um dos menores tempos de renovação dos tecidos corporais (Sauer et al, 2018).

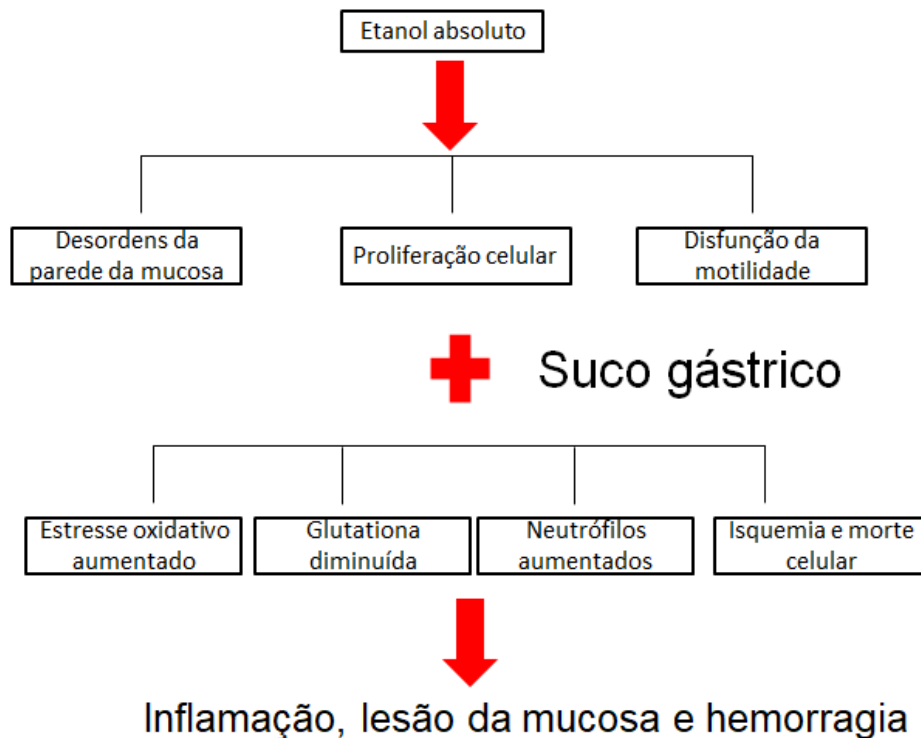
Os pacientes com úlcera duodenal, na maioria dos casos, produzem mais ácido que os indivíduos de controle, especialmente à noite (secreção basal). Apesar de os indivíduos com úlcera gástrica apresentem uma produção normal de ácido ou mesmo inferior àquela de indivíduos de controle, as úlceras raramente ocorrem na ausência de ácido, ou seja, sem ácido, sem úlcera. Nos pacientes portadores de úlceras gástricas, mesmo os níveis mais baixos de ácido, podem produzir lesão devido ao enfraquecimento da defesa da mucosa e à diminuição de produção de bicarbonato. Os agentes exógenos como fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) interagem com esses fatores de maneira complexa, causando diátese ulcerosa (Hardman et al, 2012).

Apesar do emprego dos antiácidos ao longo do tempo e o seu efeito desejado nos pacientes com úlcera péptica, a sua inconveniência reside nas várias doses diárias, além de causar efeitos colaterais indesejados, tais como osteoporose, encefalopatia e miopatia proximal nos indivíduos com insuficiência renal devido aos íons Al^{3+} presentes; hipercalcemia transitória devido aos Ca^{2+} , trazendo sérios problemas aos pacientes com uremia, além de alcalose causado pelo $NaHCO_3$ não neutralizado (Hardman et al, 2012).

Os AINEs são frequentemente associados às úlceras pépticas. A lesão tópica causada pelo uso do fármaco na luz gastrointestinal, presumivelmente, desencadeie um papel menos importante na patogênese dessas úlceras, tal como evidencia o fato de que as úlceras podem ocorrer com doses bastantes baixas de ácido acetilsalicílico (10 mg) ou mesmo com a administração parenteral de AINE. O mecanismo desses fármacos é mediado por via sistêmica e o elemento fundamental é a supressão da cicloxigenase (COX-1) na mucosa e uma redução de prostaglandinas citoprotetoras (Hardman et al, 2012).

As ulcerações induzidas por etanol não são inibidas por substâncias que interferem na secreção de ácido, como a cimetidina, mas são inibidas por agentes que aumentam os fatores de defesa da mucosa, como, por exemplo, as prostaglandinas. O mecanismo da lesão induzida por etanol é bastante variado, incluindo a redução da secreção de bicarbonato e da produção de muco, danos ao fluxo sanguíneo gástrico e lesão de células da mucosa. As lesões gástricas induzidas por etanol são também associadas à produção excessiva de radicais livres, que atacam constituintes celulares essenciais como ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos. O aumento do conteúdo de

peróxidos lipídicos e radicais livres derivados de oxigênio resulta em alterações significativas em nível celular e causa danos às membranas, morte celular, esfoliação e erosão epitelial (Donatini et. al., 2009).



Fonte: autor

Figura 6: Mecanismo de dano do etanol absoluto sobre a mucosa gástrica.

Dentre os mediadores endógenos relacionados à defesa gástrica destacam-se as prostaglandinas (principalmente PGE_2 e PGI_2), o óxido nítrico, os neuropeptídeos (CGRP) e as taquicininas (substância P, neurocinina A-NKA) (Martin & Wallace, 2006).

As prostaglandinas são eicosanoides sintetizados a partir do ácido araquidônico pela ação das cicloxigenases. São encontradas em altas concentrações no trato gastrointestinal e são capazes de aumentar o fluxo sanguíneo, estimular a síntese de muco e bicarbonato, promover a manutenção dos grupos sulfidrílicos, bem como reduzir a secreção ácida gástrica e a motilidade gástrica (Sauer et al 2018).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir dos átomos de nitrogênio no terminal guanidina da L-arginina. Existem duas classes de enzimas que estão envolvidas em sua síntese, a saber, a NO sintase constitutiva (com atividade cálcio-dependente) e a NO sintase indutível (com atividade independente de cálcio). A primeira está presente em altas concentrações na mucosa gástrica, em diversos tipos celulares, tais como células produtores de muco, músculo liso, corpos

celulares de neurônios do plexo mioentérico e células endoteliais. Essa ampla distribuição reflete a ampla participação do NO nos processos fisiológicos desse órgão, tais como a secreção de muco e bicarbonato, regulação do fluxo sanguíneo, modulação do tônus musculares e regulação da secreção ácida gástrica. Entretanto, altas concentrações de NO produzidas pela ação da NO sintase indutível são lesivas à mucosa gástrica (Wallace, 2006).

Os mediadores que participam do chamado “sistema neural de emergência” são o peptídeo CGRP e as taquicinas (substância P e NKA), cujas ações são mediadas pelo NO. Esse sistema envolve a estimulação de fibras nervosas aferentes sensoriais presentes no trato gastrointestinal, plexo mioentérico, camada muscular circular e mucosa gástrica, facilitando os processos de defesa pré-epitelial (Holzer, 2000).

1-6: Mecanismos inflamatórios

A inflamação é uma reação local em resposta a uma agressão tecidual, que se caracteriza por alterações do sistema vascular, dos componentes líquidos e celulares, além de adaptações do tecido conjuntivo vizinho. Todas essas alterações dos componentes teciduais são consequências de modificações que ocorrem nas células agredidas, passando a adquirir comportamentos diferentes tais como locomoção, alterações de forma e liberação de enzimas e de substâncias farmacológicas que tem por objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto, uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual (Siqueira et al., 2000).

Dano tecidual e inflamação são importantes ativadores de regeneração e fibrose. Dano tecidual não induz apenas a inflamação, mas também determina o tipo de inflamação e ativação de uma variável de diferentes tipos celulares de sistema imune inata e adaptativa. Todavia, inflamação não é o pré-requisito para regeneração tecidual ou fibrose, muitas vezes, respostas inflamatórias seguidas de dano tecidual visam prevenir a fibrose. Entre os fatores indutores de fibrose, podem-se destacar células Th-2, que liberam IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13, sendo três últimos relacionados ao desenvolvimento de fibrose. As citocinas pró-inflamatórias clássicas como IL-6, IL-1 β e TNF- α liberadas das células do sistema imune inata são também pró-fibróticas. Existem muitos fatores indutores de fibrose, a inibição de um ou de um grupo de citocinas pró-fibróticas pode levar ao aumento de produção de outro grupo de citocinas e algumas destas desempenham também importante papel anti-inflamatório e regeneração tecidual. Nas décadas passadas, os imunossupressores e medicamentos anti-inflamatórios têm estimulado aos profissionais na busca de mecanismos imunológicos mais específicos que prevalecem certas doenças. Futuramente, os imunossupressores e seus combinados deverão ser capazes de prevenir a inflamação, além de fibrose e promoção de regeneração (Mack, 2017).

A inflamação ocorre por diferentes mecanismos e pode ser dividida em **reações inatas (pré-inflamatórias)** e **reações imunologicamente específicas**. As **reações inatas** são classificadas em eventos vasculares (hiperemia, vasodilatação, marginação de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular) e em eventos celulares. Durante os eventos vasculares são produzidos mediadores químicos (histamina, bradicinina (BK) e fator de ativação plaquetária (PAF), fibrinolítico de coagulação, o sistema complemento e prostaglandinas) pelas células, e esses mediadores regulam os eventos vasculares e celulares (Xu et al, 2017).

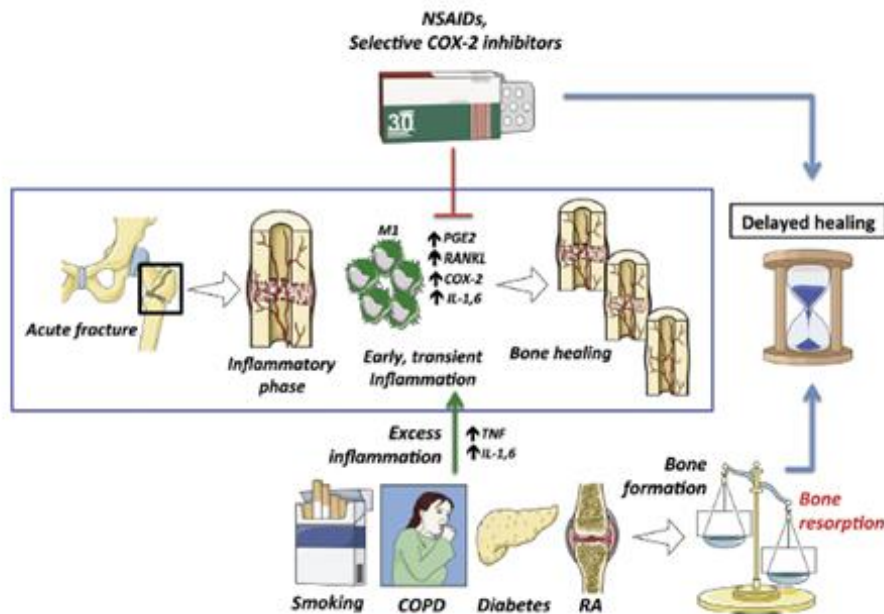
Os fenômenos celulares da inflamação incluem a ativação das capacidades celulares de movimentação, adesão e englobamento de partículas. As células envolvidas nesse processo incluem células endoteliais vasculares, mastócitos, macrófagos e plaquetas. O principal fenômeno é a saída de leucócitos da luz vascular e sua migração para o local agredido (Rang et al., 2016).

A resposta inflamatória aguda faz parte de uma imunidade inata induzida, de caráter inespecífico, não distinguindo então ao agente agressor, tampouco o que é próprio ou não do organismo típico ou relativamente, possui curta duração (horas a dias). As principais características da inflamação aguda são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos (Xu et al, 2017).

Já a **resposta imunológica adaptativa** é desenvolvida quando os patógenos superam os elementos inatos de defesa. Possui alta especificidade e a capacidade de aumentar a atividade de defesa depois de sucessivas exposições a esse patógeno. A resposta defensiva do hospedeiro se torna mais eficaz com a exposição, como também mais específica ao patógeno invasor: os *linfócitos B*, células-chave para produção de anticorpos, os *linfócitos T* são importantes na indução dessa resposta imunológica e responsáveis pelas reações imunológicas mediadas por células. Essas células migram ao lugar da injúria e iniciam a resposta inflamatória, que quando adequadamente orquestrada, levam a destruição do patógeno e reparo tecidual, mas quando não, a resposta inflamatória torna-se crônica (Rang et al., 2016).

Um exemplo é a recuperação de fratura, que pode ser caracterizada pelas três fases: inflamação, reparo e remodelação. A fase inflamatória leva 1 semana para recuperação óssea em humanos. A lesão aguda resulta em danos nos ossos, tecidos vasculares e moles e os macrófagos e outras células iniciam uma cascata inflamatória. Durante o processo de cura da fratura, as MCSs (células mesenquimatosas) sinalizam a macrófagos para solucionar a inflamação e iniciar o processo de reparo. Embora o processo de cicatrização natural se mova em direção a um ambiente anti-inflamatório, a inflamação aguda é importante para o reparo da fratura, pois estimula a angiogênese e promove a proliferação e diferenciação de MSCs para osteoblastos. Estudos têm comprovados que os macrófagos tipo M1 promovem a osteogênese de MSC através de transição de M1 para M2 de 72 a 96 horas. Depois das atividades dos macrófagos, linfócitos migram a local de fratura e iniciam resposta imune adaptativa, em que secretam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, entre outros. Inibição desta fase inflamatória é prejudicial à formação dos ossos e aumenta o risco de complicações. Por exemplo, COX-2 é altamente expressivo depois da fratura, além de prostaglandina E2, conhecido como chave principal desta fase

de cura e promove diferenciação de MSCs para osteoblastos. Estudos têm demonstrado o uso de AINEs e inibidores seletivos de COX-2 prejudicam na recuperação óssea (Gibon et al, 2017).



Fonte: Gibon et al., 2017

Figura 7: Fatores de reparação de fratura óssea. COPD: doença pulmonar obstrutiva crônica; COX-2: ciclooxigenase 2; IL 1, 6: interleucina 1 e 6; M1: macrófago M1; NSAIDs: drogas anti-inflamatórias não esteroidais; PGE2: prostaglandina E2; RA: artrite reumatoide; RANKL: receptor ativador de fator nuclear kappa-β ligante; TNF: fator de necrose tumoral.

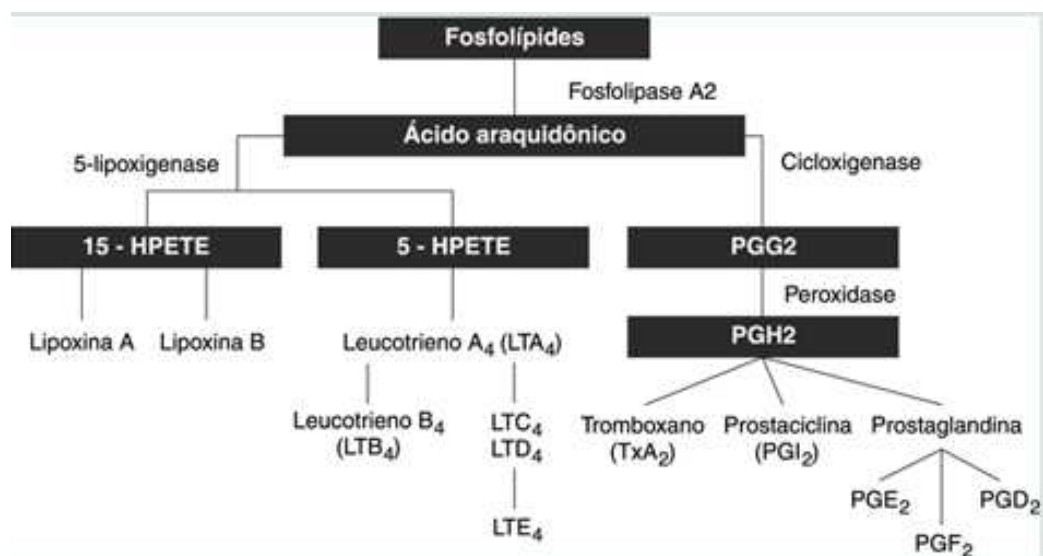
Nas situações de inflamação sistêmica crônica como artrites reumatóides, doença pulmonar obstrutiva, diabetes mellitus e lúpus eritematoso sistêmico, são caracterizados pela perda da massa óssea, pois com o excesso de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF), o balanço entre formação e reabsorção óssea é desequilibrado e ocorre processo de osteoclastogênese, pois as células imunes, tanto inatas quanto adaptativas, são ativadas e podem aumentar a reabsorção óssea por aumento de diferenciação para osteoclastos. Doenças específicas também podem alterar a homeostasia óssea. Artrite reumatoide, osteoartrite e diabetes mellitus, junto com tecido adiposo circundante, contribuem para inflamação e desequilíbrio da homeostasia. Além disso, a idade também contribui no estado inflamatório crônico, pois as células como macrófagos aumentam responsividade e sensibilidade aos sinais inflamatórios (Gibon et al., 2017).

O processo inflamatório consiste de uma série de eventos que podem ser desencadeados a partir de inúmeros estímulos: agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo e traumas físicos. Cada tipo de estímulo provoca um padrão característico de resposta, porém com

pequenas variações. Os aspectos fisiopatogênicos da inflamação são observados em três fases distintas, cada uma delas mediada por mecanismos diferentes:

- 1) Fase aguda, transitória, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular;
- 2) Fase tardia, subaguda, caracterizada pela infiltração de leucócitos e células fagocíticas;
- 3) Fase crônica, proliferativa, na qual ocorrem degeneração tecidual e fibrose.

Os mecanismos que levam a essas diferentes fases são diversos. A capacidade do ser humano produzir uma resposta inflamatória é essencial para a sua sobrevivência, em face de patógenos ambientais e injúrias as mais diversas, embora em algumas situações e doenças a resposta inflamatória se torna exagerada e mantida (Giorgi, 2005).



Fonte: Giorgi,

2005

Figura 8: cascata do ácido araquidônico.

A cicloxigenase (COX) é encontrada em duas isoformas, COX₁ e COX₂. A primeira ocorre constitutivamente na maioria das células. A COX₂ é induzida por estímulos inflamatórios. Os fármacos AINEs inibem a cicloxigenase e, portanto, previnem a formação dos endoperóxidos e, conseqüentemente, diminuem a formação dos produtos finais. A segunda importante via biossintética do ácido araquidônico é iniciada com uma oxigenação catalisada pela lipoxigenase. Essa via leva à formação de hidroperóxidos intermediários instáveis: HPETE e, subseqüentemente, a outros compostos como leucotrienos (DeLucia et al., 2016).

As prostaglandinas, entre outras funções, modulam o fluxo sanguíneo renal. Agem como vasodilatadoras e são liberadas em quantidades crescentes, quando há redução no fluxo

sanguíneo renal. Há também interação entre prostaglandinas e o sistema renina-angiotensina. A infusão de angiotensina II aumenta a concentração de PGE_2 . Quando a liberação de prostaglandinas é inibida, pelo tratamento com indometacina, os efeitos antidiuréticos e vasoconstritores renais da angiotensina II são potencializados (DeLucia et al., 2016).

A histamina é uma amina básica armazenada em grânulos no interior de mastócitos e basófilos, sendo liberada por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas mais especificamente, em resposta a uma elevação do teor de Ca^{2+} citosólico. A histamina exerce sua ação através de um efeito sobre receptores histamínicos específicos (H_1 , H_2 e H_3) nas células alvo tendo como principais ações nos seres humanos: estimulação da secreção gástrica (H_2); contração da maioria dos músculos lisos (H_1); estimulação cardíaca (H_2); vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e formação de edema (H_1) (Rang et al., 2016).

O principal papel fisiopatológico da histamina endógena consiste em atuar como mediador de alguns tipos de vômitos, através de uma ação no SNC e como estimulante da secreção gástrica, através de uma ação sobre os receptores H_2 . Além disso, desempenha uma função fisiológica como inibidor de neurotransmissores, particularmente no SNC e trato gastrointestinal (Rang et al., 2016).

Os Eicosanóides são produzidos a partir de fosfolipídeos e controlam muitos processos fisiológicos, incluindo mediadores e moduladores da resposta inflamatória. Estes são derivados do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos. Ele é liberado dos fosfolipídios de membrana pela enzima fosfolipase A_2 (PLA_2) depois de estímulos mecânicos, físicos ou químicos. Há duas formas de PLA_2 , encontrada intracelularmente e outra presente nos líquidos extracelulares. É principalmente a forma intracelular que age no AA e na lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF), que é o precursor de outro mediador da inflamação – o fator de ativação de plaquetas (PAF). Uma vez liberado, o AA é metabolizado através de diversas vias – da enzima **ciclooxigenase** (COX), que dá origem às *prostaglandinas* e *tromboxanos*; e por várias **lipoxigenases**, que originam os *leucotrienos* e *lipoxinas* (Silverthorn, 2017).

A COX-1 é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos e desempenha um papel de manutenção no corpo relacionado com a homeostasia tecidual e integridade da mucosa gastrointestinal. A COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando estas são ativadas, além de ser responsável pela produção dos mediadores prostanóides da inflamação. Existem evidências de que a COX-2 esteja envolvida no desenvolvimento de neoplasia, visto que ocorre um aumento na expressão dessa enzima em tumores como câncer de mama e cólon (Silverthorn, 2017).

As prostaglandinas são sintetizadas com o auxílio das cicloxigenases. Interessantemente, a COX-2 é induzida por determinados fatores séricos, por citocinas e por fatores de crescimento, cujo efeito é inibido com o tratamento de glicocorticoides, como dexametasona (Hardman et al, 2012).

A atividade da enzima ciclooxygenase, como dito anteriormente, originam as prostaglandinas (PG) no endotélio vascular e macrófagos e tromboxanos (TX) nas plaquetas. As prostaglandinas PGI₂ e PGE₂ são potentes vasodilatadores que também potencializam o aumento da permeabilidade vascular e inibição da agregação plaquetária, o que resulta na formação de edema, comprimindo as fibras nervosas e potencializando a atividade álgica da bradicinina; estimulam a produção de esteroides na adrenal, liberando corticóides que participam do processo inflamatório. Além disso, possuem ação citoprotetora gástrica, reduzindo a secreção ácida, aumentando a secreção de muco e bicarbonato e produzindo vasodilatação na mucosa gástrica respectivamente (Hardman et al, 2012).

A outra via de metabolização do AA se dá pela ação das enzimas **lipoxigenases** responsáveis pela biossíntese dos *leucotrienos* e *lipoxinas*. Os *leucotrienos* são derivados lipídicos formados pela oxidação do AA no Carbono 5, por intermédio da enzima 5-lipoxigenase, levando a formação do eicosanoide 5-hidroxiperoxieicosatetraenóicos (5-HpETE), que é por fim metabolizado em leucotrienos. O LTA₄ é transformado em LTB₄ através da LTA₄ hidrolase que catalisa a adição de água no LTA₄. O LTB₄ é precursor de uma importante classe de leucotrienos contendo cisteinil: LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (cisteinil-leucotrienos). Estes cisteinil leucotrienos conhecidos como “substância de reação lenta da anafilaxia” (SRS-A), que gerada no pulmão, está envolvido na asma e outras reações de hipersensibilidade imediata, sendo liberada por mastócitos, basófilos e macrófagos, causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. A inibição da enzima COX por AINEs pode aumentar a quantidade de AA disponível para ser metabolizado pela lipoxigenase, com consequente aumento da síntese de LTs (Hardman et al, 2012).

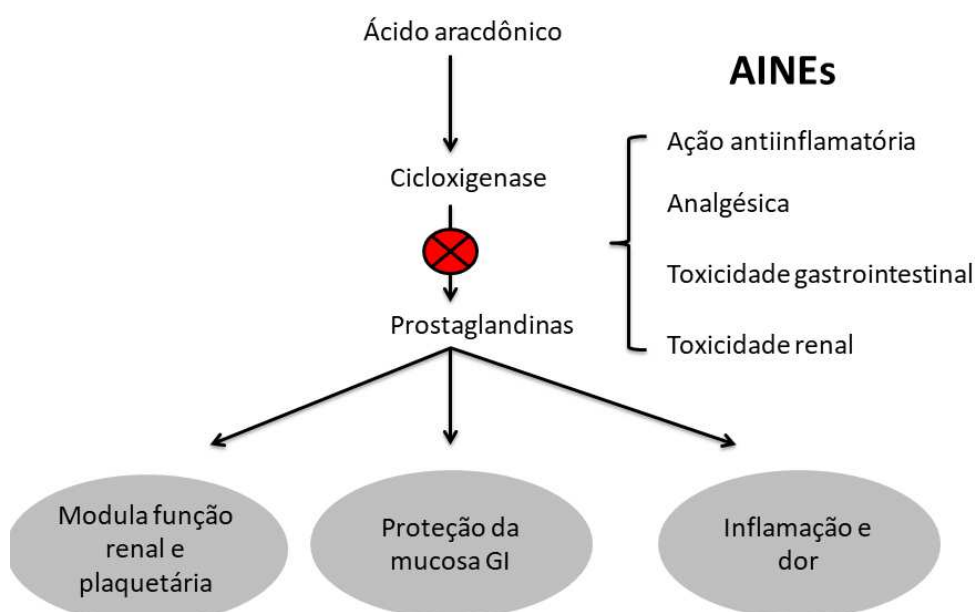
As lipoxinas são produtos da 15-lipoxigenase que atuam sobre receptores específicos em leucócitos polimorfonucleares opondo-se a ação do LTB₄ (Rang et al., 2016).

Os principais agentes antiinflamatórios são **glicocorticoides** e **agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)**. Os glicocorticoides são os imunossuppressores, reduzindo a inflamação aguda (redução do influxo e atividade dos leucócitos), crônica (diminuição

da atividade das células mononucleares, proliferação diminuída dos vasos sanguíneos e menos fibrose, além da diminuição da expansão clonal dos linfócitos T e B) (Rang et al., 2016).

Os AINEs possuem tanto ação anti-inflamatória (redução de edema a partir da redução de prostaglandinas vasodilatadoras), quanto à ação analgésica e antipirética. Entretanto, os AINEs são também conhecidos por seus efeitos adversos que incluem danos ao trato gastrointestinal e à circulação renal. A inibição da COX-1 causada por estes fármacos bloqueia síntese das prostaglandinas (PGE_2 e PGI_2), responsáveis por controlar a secreção ácida gástrica e secreção de muco e bicarbonato. Além disso, a diminuição na produção de prostaglandinas aumenta a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular devido ao aumento na síntese de leucotrienos, promovendo obstrução do fluo sanguíneo. No estômago torna a mucosa susceptível ao ataque de radicais livres gerados por neutrófilos ativados (Silverthorn, 2017).

Alguns AINEs causam ainda danos à mucosa gástrica através de um efeito local. Drogas ácidas como a aspirina tornam-se lipossolúveis em baixo pH. Administradas oralmente podem atravessar a barreira lipídica de células da mucosa gástrica. No pH intracelular perdem a lipossolubilidade e ficam retidas, desorganizando a função celular provavelmente por inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial. As células tornam-se então sensíveis ao ataque ácido (Hardman et al, 2012).



Fonte: Giorgi, R. D. N., 2005

Figura 9: Síntese de prostaglandinas e mecanismo de ação dos AINES.

A maioria dos hormônios e neurotransmissores que atuam no sistema digestivo e processo inflamatório também possuem outras funções no organismo e, portanto, drogas que interagem com alguma dessas substâncias podem também exercer outras funções no organismo. Dessa forma, modelos experimentais envolvendo o sistema digestório, ou partes dele, e modelos de inflamação induzida, podem ser de grande utilidade para a descoberta de novas drogas.

Os modelos experimentais de úlcera gástrica e de edema de pata por carragenina foram utilizados, pois são modelos em que a duração do experimento é curto, fluxograma simples e resultados imediatos e diretos.

2 - Justificativa

a) Com a autorização de fabricação dos fitoterápicos de origem da MTC aliado à facilidade de acesso desses produtos no mercado para população, surge a demanda de estabelecer parâmetros de eficácia, segurança e controle de qualidade desses produtos visando à saúde pública do Brasil.

b) Partindo do conhecimento etnofarmacológico em relação a MTC, sabe-se que Rim é o responsável pelo fornecimento da energia vital humana e é responsável pela manutenção da homeostasia do corpo, foram utilizados, como triagem farmacológica para investigar mecanismos de ação das plantas, modelos experimentais envolvendo testes anti-inflamatórios e antiulcerogênicos, dando início aos estudos clínicos no Brasil.

c) Estas espécies, *R. glutinosa* e *E. ulmoides* são muito utilizadas nas formulação chinesas, pois de acordo com o levantamento bibliográfico de Zhang et al., existem 33 formulações para o tratamento de disfunção óssea e a maioria tonificam meridiano do Rim. Entre 33 formulações, 5 delas pertencem às fórmulas clássicas, que estão descritas na farmacopeia Chinesa e estão autorizadas a fabricação de acordo com a RDC 21/2014 da ANVISA. 23 pertencem às fórmulas empíricas, que são utilizadas pela população sem comprovação científica e 5 aos patentes chineses. Entre as fórmulas clássicas, 2 delas utilizam *E. ulmoides* e 3 *R. glutinosa*. Entre as fórmulas pertencentes aos patentes chineses, 1 delas *E. ulmoides* e 4 *R. glutinosa* (Zhang, 2016).

d) Existem 3 maneiras de uso terapêutico da raiz da espécie *R. glutinosa*: raiz fresca, raiz seca e raiz cozida (Zhang, 2008) e o seu marcador de controle de qualidade é diferente entre os pesquisadores: 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) na Farmacopeia Coreana (2008), pois este composto é produzido de acordo com o tempo de processamento da espécie; Verbascoside na Farmacopeia Chinesa para todas as formas de uso; e Catalpol, pois é considerado composto responsável pela ação terapêutica atualmente.

e) Laudos de análise das matérias primas fornecidos pelo fabricante (anexo III e anexo IV), assim como o fluxograma de obtenção dos extratos brutos, apresentado a seguir, são simples e muitas informações faltantes:

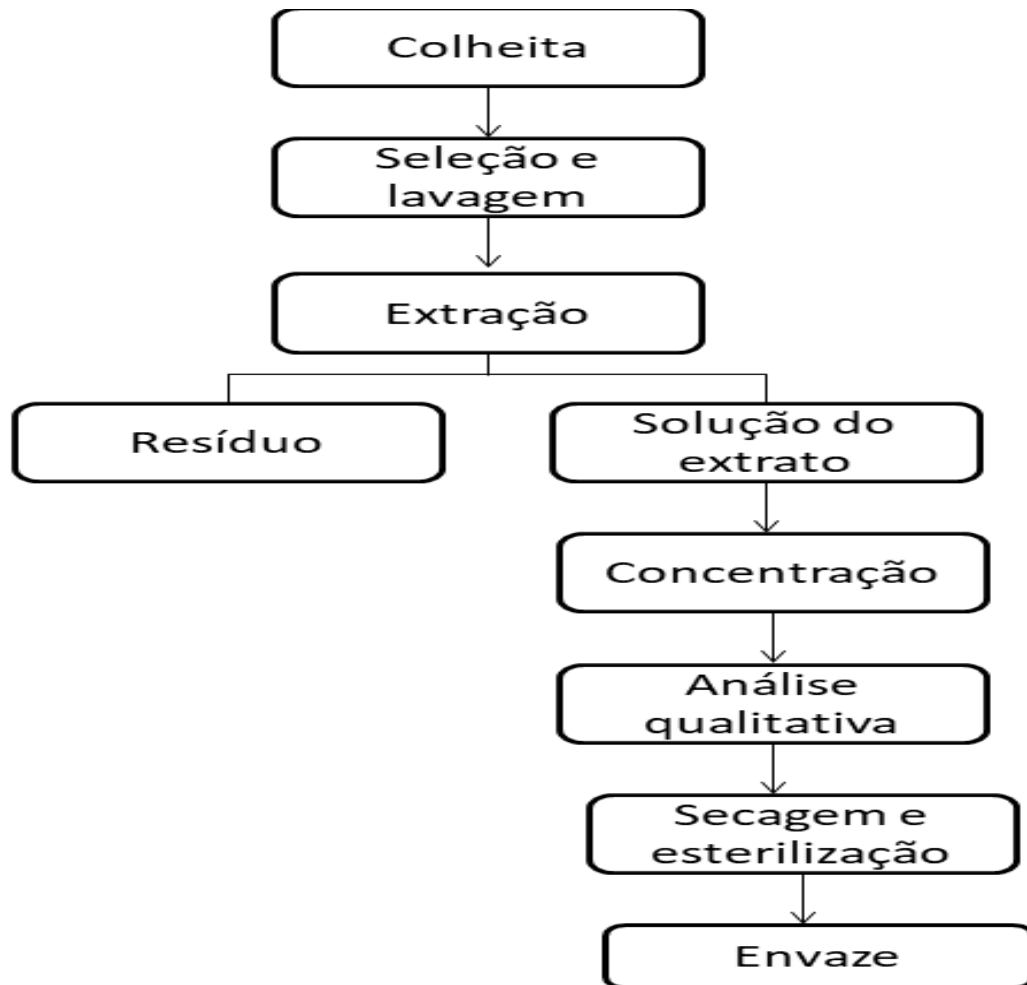


Figura 10: Fluxograma de obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das espécies *R. glutinosa* e *E. ulmoides*. Líquido extrator 70:30 (etanol/água).

3 - Objetivo Geral

Investigar o potencial farmacológico relacionado a dados de eficácia e qualidade dos extratos brutos hidroalcoolicos (EBH) adquiridos do fabricante chinês das espécies *E. ulmoides* e *R. glutinosa*, visando estabelecer parâmetros para posterior validação do uso dessas espécies atendendo a RDC 21 e 26/2014 da ANVISA.

3 – 1. Objetivos Específicos

a) Investigar a toxicidade aguda e o efeito farmacológico dos EBH de *E. ulmoides* e *R. glutinosa* em modelos experimentais de triagem de úlcera, nocicepção e inflamação;

b) Avaliar o perfil químico dos extratos adquiridos através de métodos cromatográficos e espectrometria de massas para os marcadores de cada espécie vegetal.

4 – Material

Os EBH foram adquiridos de fabricante chinesa Qingdao BNP BioScience Co., Ltd.. Partes utilizadas foram: raiz da *R. glutinosa* preparata e casca da *E. ulmoides*.

O etanol utilizado foi adquirido em Labsynth Produtos para Laboratório. Os padrões Catalpol e Pinoresinol diglucosídeo foram adquiridos em Sigma Aldrich com 99% de pureza.

As análises foram realizadas por um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) da série Shimadzu equipado com uma bomba quaternária (LC-10AT), amostrador automático (SIL 20A HT), forno de colunas (CTO 10AS Vp) e detector de arranjo de diodo (DAD) (SPD-M10Vp) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O controle de instrumentos e a análise de dados foram realizados utilizando o *software Classe VP 6.13*; A coluna utilizada foi C18 (5 µm, 4,6 × 250 mm, Gemini®, Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

Nos anexo III e IV encontram-se os certificados de qualidade dos EBH das espécies *R. glutinosa* e *E. ulmoides* fornecidos pelo fabricante.

O presente estudo está isento de registro devido à lei de Biodiversidade 13.123/2015.

Os animais utilizados neste estudo foram adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação biológica (CEMIB) da UNICAMP, que foram mantidos no biotério da Divisão da Farmacologia e Toxicologia do CPQBA sob condições de temperatura controlada (temperatura 23 ± 1 °C, umidade 60-65% e ciclo regular claro/escuro com iluminação artificial entre 07:00 e 19:00h). Todos os animais receberam dieta comercial do fabricante QUIMTIA e água *ad libitum* do laboratório.

Todos os experimentos que envolveram o uso de animais de laboratório neste projeto foram previamente submetidos ao comitê de ética de experimentação animal desta Universidade com aprovação concedidos através de Comitê de Ética No. 4148-1 (Anexo II). Os protocolos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5 – Metodologias

5 – 1. Análise Qualitativa por Espectrometria de Massas (MS)

Os EBH da raiz preparada da *R. glutinosa* e casca de *E. ulmoides* foram pesadas separadamente, 10 mg para cada extrato, dissolvidas em 1 mL de MeOH e 10 µL da solução de cada amostra foi diluída em 990 µL de uma mistura de metanol/água (1:1, v/v) com 0,1 % de ácido fórmico (99 %) para ionização no modo positivo e outra aliquota (10 µL) diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/água (1:1, v/v) com 0,1 % de hidróxido de amônio (28 %) para ionização no modo negativo. As amostras foram injetadas por inserção direta via bomba seringa no espectrômetro de massas de configuração ESI-Orbitrap (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Alemanha), tanto no modo positivo quanto negativo de ionização. O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS (*full scan*) foram adquiridos na faixa de m/z 150 a 1800 e os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos a partir de m/z 50 até um valor pouco acima do m/z do íon em estudo e com energia de colisão de 10 - 40 eV. A resolução é 140.000 em m/z 200, aplicável em faixa de 50 a 6.000 m/z conforme a especificação do equipamento (Q ExactiveTM Hybrid Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometer, Thermo ScientificTM). As condições gerais de operação do equipamento foram: voltagem do *spray* de 3500 V, temperatura do capilar de 320°C, pressão do *sheat gas* de 10 psi e nível de RF da *S-Lens* de 50 V. Os espectros foram tratados com o software Xcalibur[®] (Thermo Scientific, Alemanha), específico do espectrômetro de massas.

5 – 2. Análise Quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

Filtrou-se a fase móvel em sistema de filtração Millipore usando membrana PVDF de 0,45µm e 47 mm de diâmetro utilizando vácuo e sonificação simultaneamente. Sendo denominando fase móvel B Acetonitrila grau cromatográfico. Acidificou-se água com ácido fórmico 0,1%. Essa fase móvel denominou-se fase móvel A.

Foram pesados 22,2 mg de EBH da *R. glutinosa* e 20,3 mg da *E. ulmoides*. As amostras foram diluídas separadamente com 30% metanol e 70% água no ultrassom até completa dissolução. Em seguida, foram adicionadas 2 mL de ácido fórmico 0,1% e 1 mL de acetonitrila e completar até 5 mL com metanol e água (30:70 v/v).

As análises foram realizadas por HPLC (Shimadzu) acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos (Shimadzu). As condições cromatográficas e a gradiente fase móvel utilizado estão descritas nas tabelas seguintes.

Equipamentos e acessórios	Especificação
Bomba Shimadzu	LC 10atm
Coluna	C18 Gemine- Phenomenex 5µm 110A° (250mm x 4,6 mm x 5µm)
Volume de injeção	10µL
Vazão de fluxo	1 mL/min
Detector Shimadzu	UV-DAD
M10AVP	
Fase móvel	H ₂ O acidificada com Ác. Fórmico 0,1%/ Acetonitrila (gradiente)
Comprimento de onda	208nm / 278nm
Forno CTO-10ASVP	30°C
Software	Class VP -5
Injetor automático	Injetor automático sil-20AT HT

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas

Tempo (min)	Solvente ácido fórmico 0,1 % %A	Solvente Acetonitrila %B
0 - 5,0	95	5
5 - 15	55	45
15 - 20	40	60
20 - 30	95	5

Tabela 2: Programa de gradiente fase móvel para análises por HPLC-DAD

5 – 3. Teste de Toxicidade Aguda

Foram então colocados em uma caixa para avaliar efeitos gerais produzidos pelos extratos durante 4 horas. (Carlini, 2003)

SINAIS CLÍNICOS		
Estímulo	Sedação	Autônomo
<ul style="list-style-type: none"> • Agressividade • Ambulação aumentada • Andar em círculos • Auto-limpeza • Contorções Abdominais • Convulsões • Saltos ou Tremores • Vocalização 	<ul style="list-style-type: none"> • Ambulação diminuída • Analgesia • Sedação • Ptose palpebral • Cauda em Straub • Diminuição do reflexo auditivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Constipação • Cianose • Força de agarrar • Lacrimejamento • Micção • Piloereção • Salivação

Figura 12: Sinais clínicos avaliados no teste de Toxicidade Aguda.

Após período de jejum de 12 horas, grupos de 3 animais foram tratados por via oral gavagem, a saber: grupo controle negativo (veículo), tratado com solução salina 0,9% (volume 10 mL/Kg), grupo *E. ulmoides* (2000 mg/Kg; 10 mL/Kg) e grupo *R. glutinosa* (2000 mg/Kg; 10 mL/Kg). Imediatamente após a administração oral, todos os animais experimentais foram mantidos em observação pelo período de 4 horas a fim de identificar possíveis sinais clínicos de toxicidade (Figura 12), tais como alterações do aspecto geral da pelagem (piloereção), presença de secreções, comportamentos anormais (agressividade / letargia), entre outros. Durante o referido período de observação (*screening* hipocrático), cada animal foi colocado para avaliação de atividade geral em caixa plástica medindo 45 cm x 45 cm x 20 cm com fundo dividido em nove áreas iguais (15 cm x 15 cm) pelo período de cinco minutos. O número de áreas cruzadas pelas quatro patas dos camundongos foi contado em sessão de 5 minutos e contado como índice comportamental.

Após o período de observação, os animais foram mantidos nas suas gaiolas por todo o período experimental (14 dias), ao longo do qual foram registrados peso corporal e avaliação clínica. Ao término do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia (aprofundamento de anestesia – quetamina 300 mg/Kg, via intraperitoneal (i.p.) associada a xilazina 30 mg/Kg, via i.p.)

- seguida de deslocamento cervical). Foi realizada análise macroscópica e pesagem dos seguintes órgãos: fígado, baço, coração, rins e pulmão para cálculo de peso relativo:

$$PESO\ RELATIVO\ (\%) = \frac{PESO\ DO\ ÓRGÃO}{PESO\ DO\ ANIMAL} \times 100$$

5 – 4. Teste de Formalina

O teste da formalina foi realizado como descrito por Dubuisson & Dennis (DUBBUISSON, 1995). Grupos de camundongos Balb, isogênicos, machos, n=5, peso de 25 a 28 g, jejum, foram tratados, pela via oral gavage, com veículo (solução salina 0,9% 10 mL/Kg, controle negativo), sulfato de morfina (40 mg/kg diluído em solução salina 0,9%, controle positivo) e EBH de *E. ulmoides* e *R. glutinosa* nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg (diluído em solução salina 0,9%). Após 60 minutos do tratamento, os animais receberam injeção sub-plantar (pata posterior direita) de 20 µL de solução de formalina a 2% (formaldeído 1,2% em salina). O tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata lesionada, durante um período de 40 minutos, foi indicativo de nocicepção. Os primeiros cinco minutos determinaram a resposta à dor de origem neurogênica; e 20-40 minutos subseqüentes determinou resposta à dor de origem inflamatória.

Os resultados foram expressos de acordo com a fase da resposta: média da fase de cada grupo experimental \pm desvio padrão de 5 animais por grupo experimental. E porcentagem de comparação com o grupo de controle negativo: diminuição do tempo de lambedura da pata em relação ao grupo de controle negativo, obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do tempo de lambedura da pata do grupo}}{\text{média do tempo de lambedura da pata do controle negativo}} * 100$$

5 – 5 Teste de Atividade Antiulcerogênica

Ratos machos da linhagem Wistar (210 g - 260 g) foram mantidos em jejum de 12 horas, com acesso livre à água. Os animais foram divididos em 8 grupos (n=5) e cada grupo recebeu, via oral gavagem, tratamento correspondente, ou seja, solução salina 0,9% (controle negativo), carbenoxolona 200 mg/kg (diluído em solução salina 0,9%, controle positivo), *R. glutinosa* 100 mg/kg, *R. glutinosa* 300 mg/kg, *R. glutinosa* 1000 mg/kg, *E. ulmoides* 100 mg/kg, *E. ulmoides* 300 mg/kg e *E. ulmoides* 1000 mg/kg (diluído em solução salina 0,9%). Depois de 1 hora de tratamento, foram administrados oralmente, em todos os animais, 4 mL de etanol absoluto. Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com solução anestésica de quetamina 300mg/Kg, via i.p. associada a xilazina 30 mg/Kg, via i.p.) uma hora depois e os estômagos retirados, abertos ao longo da curvatura maior e lavados em solução salina 0,9% para posterior filmagem e avaliação da área ulcerada por programa ImageJ[®].

Os resultados foram apresentados de acordo com o grupo experimental: média da área ulcerada dos animais de cada grupo \pm desvio padrão do grupo. E porcentagem de comparação com o grupo controle negativo calculado através da fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média da área ulcerada do grupo}}{\text{média da área ulcerada do controle negativo}} * 100$$

5 – 6 Teste de inflamação por carragenina

O experimento foi realizado utilizando oito grupos (n=6) *Wistar* fêmeas (150 g -200 g, jejum de 12h). Inicialmente, foi medido o volume das patas esquerdas traseiras de cada animal através de hidropletismômetro (Ugo basile 37140 Plethysmometer), sendo registrado como leitura basal. As patas foram submergidas até o maléolo lateral, em um recipiente contendo solução específica para transmissão de impulso. Este dispositivo foi conectado por um sistema de vasos comunicantes a outro, menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. Após a leitura basal, os grupos foram tratados via oral, solução salina NaCl 0,9% (grupo controle negativo), Indometacina (grupo controle positivo, 20 mg/kg diluído em solução salina 0,9%), *R.glutinosa* 100 mg/kg, *R.glutinosa* 300 mg/kg, *R.glutinosa* 1000 mg/kg, *E. ulmoides* 100 mg/kg, *E. ulmoides* 300 mg/kg e *E. ulmoides* 1000 mg/kg (diluído em solução salina 0,9%). Após 60 min de administração das amostras, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 ml de carragenina 1% em solução fisiológica na pata traseira esquerda.

Após a injeção de carragenina (agente edematogênico) e em intervalos pré-estabelecidos (1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h), o volume da pata de cada animal foi aferido novamente. As variações de volume foram numericamente registradas a cada 1 hora, totalizando seis medições.

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média para cada grupo de tratamento ou expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle.

6 - Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se $p < 0,05$ para que seja considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de Tukey one-way, software GraphPad Prism 6[®].

7 - Resultados e Discussão

A estratégia de trabalho contemplou avaliar os requisitos que a ANVISA preconiza para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Desse modo, o material vegetal adquirido foi submetido à investigação de seu perfil químico e efeitos farmacológicos para melhor compreensão da eficiência do mesmo frente à alegação do seu uso na MTC.

De acordo com a RDC 21 de 25 de Abril de 2014, que autoriza a fabricação e comercialização de produtos da MTC de origem vegetal, mineral e cogumelos de acordo com as técnicas da MTC e integrantes da Farmacopeia Chinesa. Entretanto, a Farmacopeia Chinesa não é aceita tradicionalmente no Brasil, as edições são de difícil acesso devido à falta de tradução para a língua inglesa ou portuguesa. Apesar das formulações consideradas seguras de uso humano ao longo dos séculos, as espécies têm cultivo diferenciado atualmente. Além disso, as matérias-primas adquiridas para fabricação, como os extratos brutos ou partes das plantas, podem sofrer adulterações, contaminações por metais pesados, microorganismos, micotoxinas e pesticidas, alterando a qualidade, eficácia e segurança do uso. E as informações fornecidas pelos fabricantes, tais como laudo técnico e fluxograma de produção dos extratos, na maioria das vezes, são incompletas, o que pode trazer sérios efeitos indesejados para o consumidor final.

7 – 1 Testes Fitoquímicos

Primeiramente, os extratos das duas espécies foram identificados através da Espectrometria de Massas (MS) obtendo um perfil químico (*fingerprinting*). A espectrometria de massas (MS) é uma técnica instrumental muito abrangente dentro da ciência moderna, com amplas aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Isto se deve a recentes avanços em instrumentação e ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização que a revitalizaram. O *fingerprinting* ou perfil metabólico é a análise de amostras de forma rápida onde um grande e diferente número de metabólitos é avaliado, sem a intenção de identificar cada metabólito detectado, mas sim comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que podem variar em resposta a uma doença, exposição a uma toxina, perturbações genéticas ou ambientais (Dettmer et. al., 2007), podendo ainda identificar metabólitos discriminantes ou biomarcadores. Para a espécie *R. glutinosa* as moléculas consideradas marcadores foram catalpol e verbascosídio enquanto para a espécie *E. ulmoides* foi pinoresinol diglucosídio.

Os dados foram gerados da análise de espectrometria de massas dos EBH das espécies, configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific – Bremen, Alemanha), ionização no modo positivo e negativo.

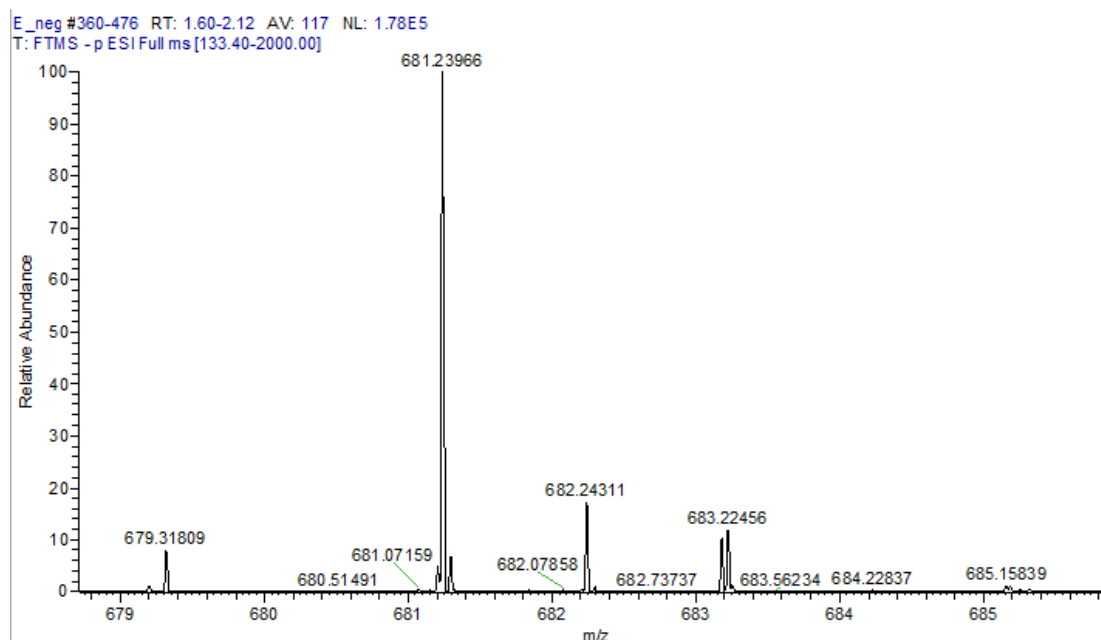


Figura 13: Espectro de massas gerado em espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Alemanha) do extrato bruto *E. ulmoide* e condições de análise. Setas indicam possibilidades de identificação de molécula pinoresinol diglucosídio.

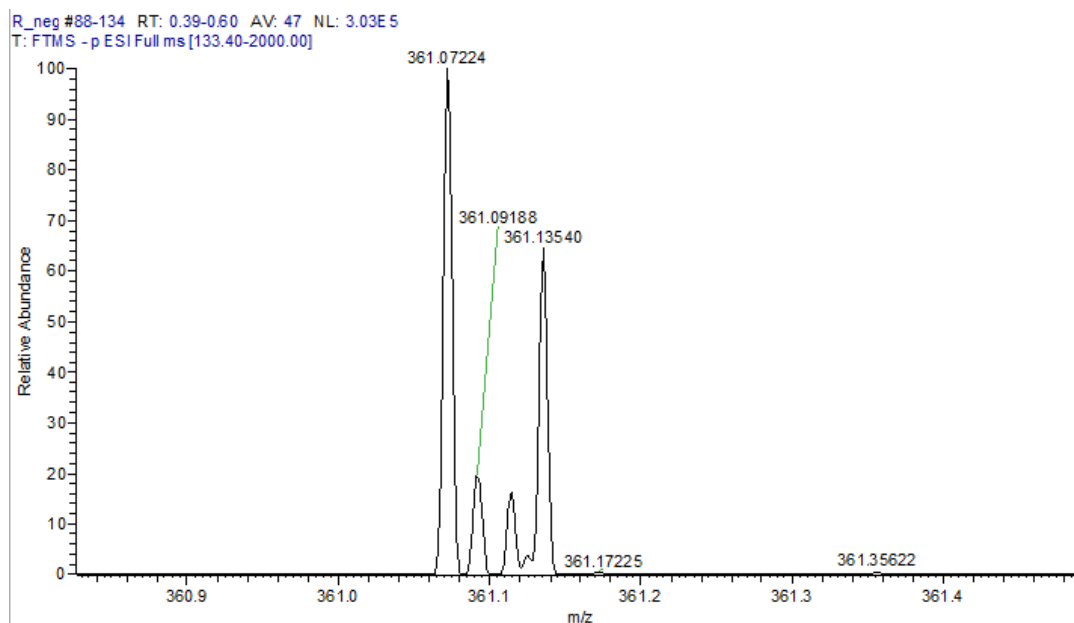


Figura 14: Espectro de massas gerado em espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Alemanha) do extrato bruto *R. glutinosa* e condições de análise. Seta indica possibilidade de identificação de molécula catalpol.

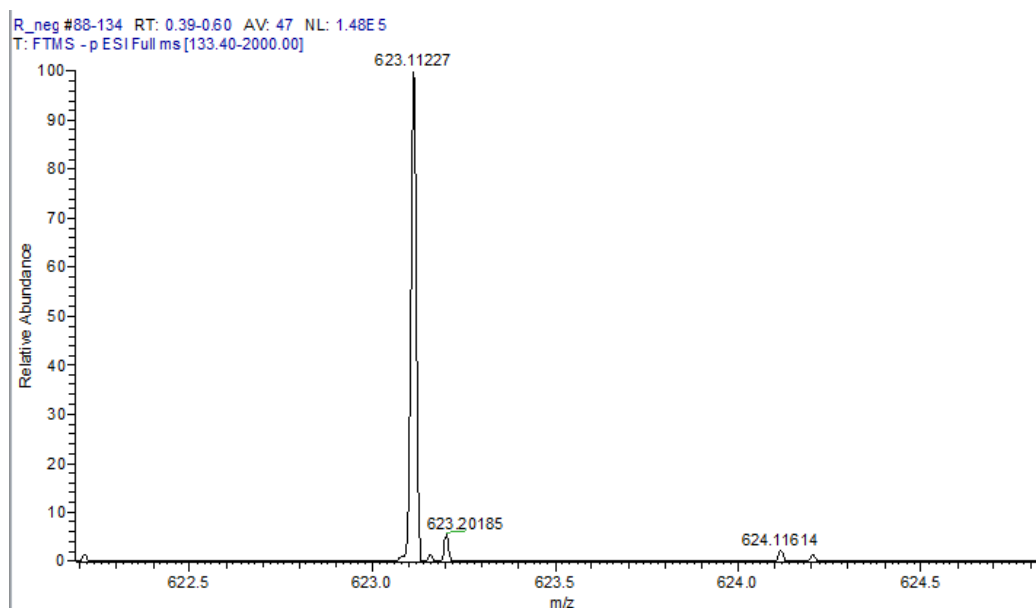


Figura 15: Espectro de massas gerado em espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Alemanha) do extrato bruto *R. glutinosa* e condições de análise. Seta indica possibilidade de identificação de molécula verbascosídeo.

A quantificação dos marcadores em cada espécie vegetal foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector UV-Vis de arranjo de diodos. O sistema de detecção baseado na absorção de radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta/visível (UV-Vis) é ainda hoje o mais empregado no Brasil em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Esse detector óptico apresenta boa sensibilidade, ampla faixa linear, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças na

composição da fase móvel. Para a sua utilização, entretanto, é necessário que os analitos tenham cromóforos que absorvam na região do UV-Vis (Gonzalez et al., 2011).

A quantificação pinoresinol diglucosídeo, marcador de *E. ulmoides* no seu extrato bruto foi de acordo a método descrito Farmacopeia Europeia 8.0, utilizando curva de calibração com padrão autentico para determinação da concentração do mesmo no extrato.

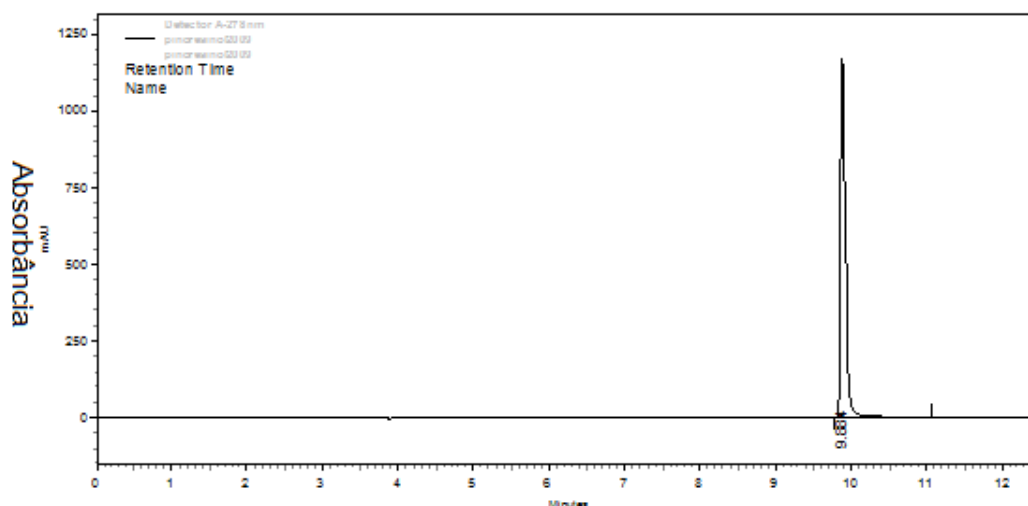


Figura 16: Perfil cromatográfico do padrão de referência Pinoresinol diglucosídeo obtido em equipamento Shimadzu acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos.

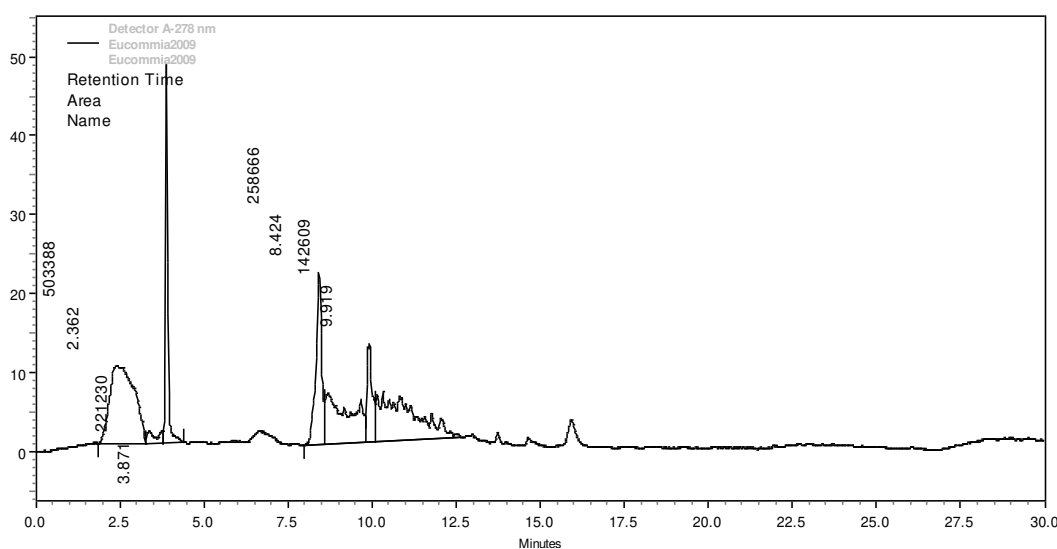


Figura 17: Perfil cromatográfico do extrato bruto *E. ulmoide* obtido em equipamento Shimadzu acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos.

Depois de obter os espectros com picos separados, foi feito curva de calibração com as seguintes concentrações:

CONCENTRAÇÃO Pinoresinol diglucosídeo (ug/mL)	ÁREA
406.7	1899946
203.4	961774
101.7	501024
50.8	243751
25.4	128686
12.7	62988
6.35	34398

Figura 18: Concentração de padrão de referência Pinoresinol diglucosídeo (ug/mL) e área do pico seguindo mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente.

De acordo com a equação da reta determinada para a amostra do extrato bruto de *E. ulmoides* determinou-se um teor de Pinoresinol diglucosídeo de aproximadamente 0,5%, conforme preconizado na Farmacopeia Europeia.

A quantificação do catalpol do EBH da *R. glutinosa* não foi satisfatória com as condições cromatográficas descritas anteriormente, com picos não separados:

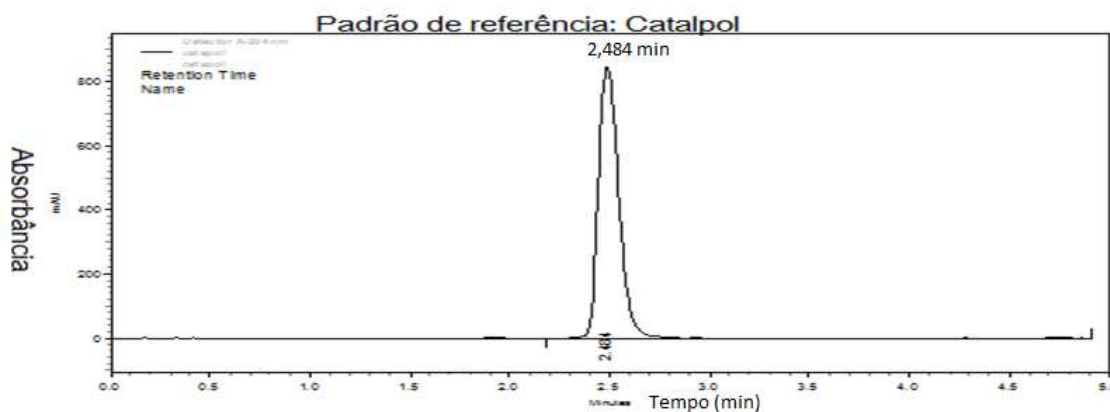


Figura 19: Perfil cromatográfico do padrão de referência Catalpol obtido em equipamento Shimadzu acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos.

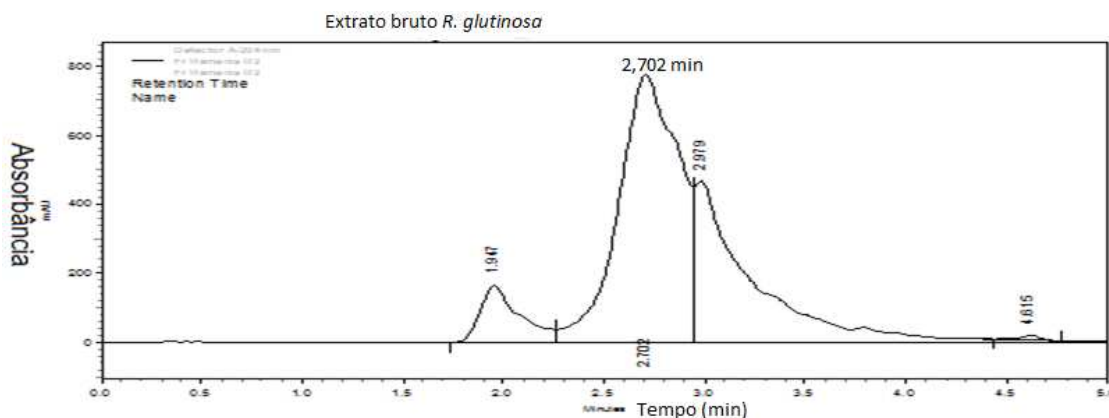


Figura 20: Perfil cromatográfico do extrato bruto *R. glutinosa* obtido em equipamento Shimadzu acoplado ao detector de UV com arranjo de diodos.

Foi possível determinar e identificar o teor do marcador da espécie *E. ulmoides* seguindo monografia descrita na Farmacopeia Europeia. Porém, para espécie *R. glutinosa*, o espectro apresentou bastante interferência, impossibilitando cálculo do teor do catalpol. Além disso, a molécula considerada marcador encontra-se divergente entre as farmacopeias asiáticas e literatura. De acordo com os registros etnofarmacológicos e Farmacopeia Chinesa, esta última espécie possui três formas de uso com efeitos diferentes: raiz fresca, seca e cozida. Como a composição dos produtos naturais altera-se conforme o processamento e, para mesma espécie, os sintomas tratados são diferentes de acordo com o processamento da planta, que é o caso de *R. glutinosa*, a raiz da planta seca é tradicionalmente utilizado no tratamento de hemorragia espontânea, distúrbios menstruais, diabetes e reumatismo, enquanto a raiz da planta cozida é usada frequentemente no tratamento de debilidade lombar, hemorragia uterina e regulação menstrual (Liu et. al., 2017). É necessário, portanto, determinar o método de controle de qualidade e de identificação das plantas utilizadas nas formulações da MTC devido à recente legalização da fabricação dos produtos fitoterápicos asiáticos e ao aumento de uso consequente.

Com a identificação e quantificação dos marcadores, deu-se prosseguimento com a avaliação farmacológica em modelos de toxicidade aguda, nocicepção, inflamação e de citoproteção *in vivo*.

7 – 2 Testes *in vivo*

7-2.1 Teste de Toxicidade aguda

Com a finalidade de avaliar toxicidade e dose segura das duas espécies, foi feito teste de toxicidade aguda, seguindo protocolo OECD. O método baseia-se na avaliação biométrica sob ação de doses fixas, com a possibilidade de classificação do perigo.

Durante as primeiras 4 horas após a administração aguda do veículo e dos extratos testados, foi observado maior atividade geral (agitação) dos animais pertencentes ao grupo *R. glutinosa* (2000 mg/Kg), imediatamente grupo de *R. glutinosa* 1000 mg/Kg foi avaliado e este último apresentou comportamento normal comparado com o grupo controle. Durante os cinco minutos de observação em caixa de campo aberto, os mesmos animais apresentaram maior número de cruzamentos (33% comparando com o grupo controle), porém não significativo.

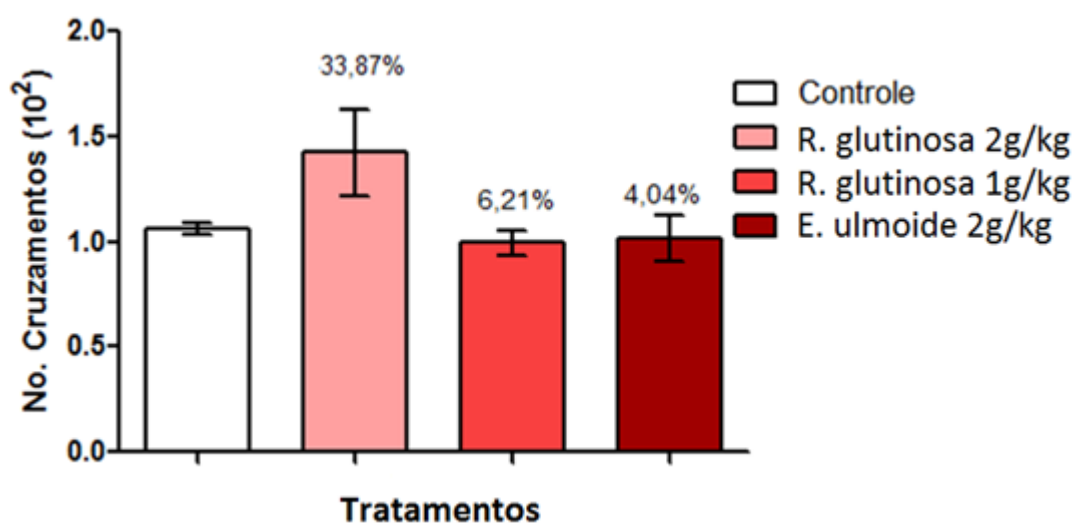


Figura 21: Teste hipocrático para refinar o teste de toxicidade aguda. Controle: grupo salina, controle negativo; R2g: *R. glutinosa* dose 2000 mg/kg; R1g: *R. glutinosa* dose 1000 mg/kg; E2g: *E. ulmoides* dose 2000 mg/kg. Resultado não significativo, com $p > 0,05$.

Ao longo do período experimental não foram observadas alterações de comportamento de todos os grupos avaliados (*R. glutinosa* 2000 mg/Kg, *R. glutinosa* 1000 mg/Kg, *E. ulmoides* 2000 mg/Kg.)

No 15º dia de teste, todos os animais foram eutanasiados seguindo métodos descritos anteriormente e os pesos relativos ao peso de cada animais dos órgãos (coração, fígado, baço, rins e pulmão) tiveram variação não significativa comparando com o grupo controle.

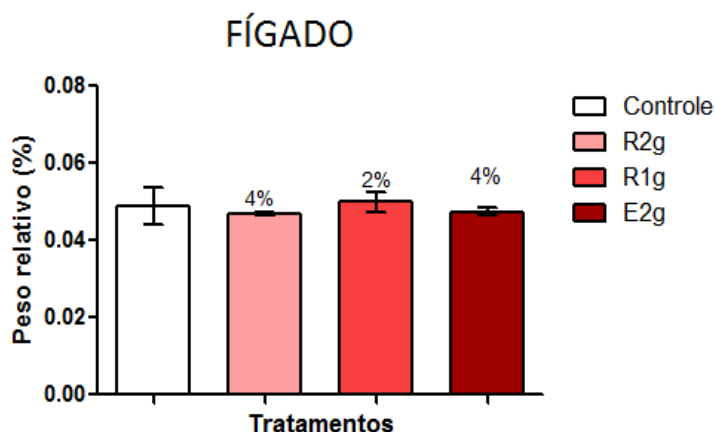


Figura 22: Comparação do peso do fígado. Controle: grupo salina, controle negativo; R2g: *R. glutinosa* dose 2000 mg/kg; R1g: *R. glutinosa* dose 1000 mg/kg; E2g: *E. ulmoides* dose 2000 mg/kg. Resultado não significativo, com $p > 0,05$.

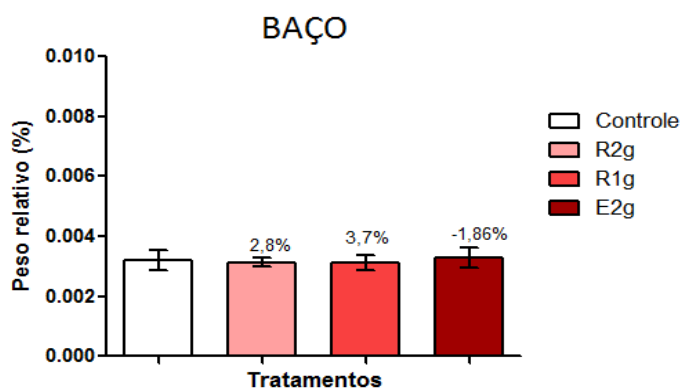


Figura 23: Comparação do peso do baço. do grupo controle. Controle: grupo salina, controle negativo; R2g: *R. glutinosa* dose 2000 mg/kg; R1g: *R. glutinosa* dose 1000 mg/kg; E2g: *E. ulmoides* dose 2000 mg/kg. Resultado não significativo, com $p > 0,05$.

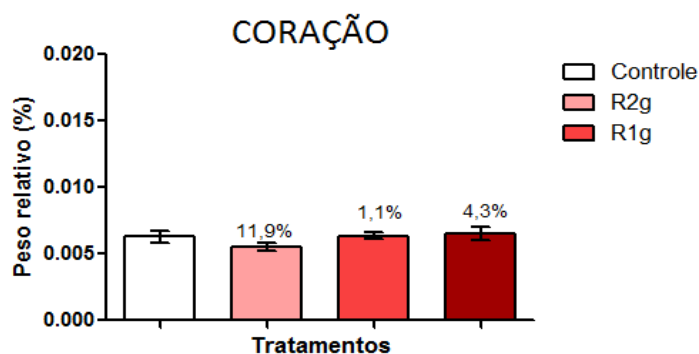


Figura 24: Comparação do peso do coração. Controle: grupo salina, controle negativo; R2g: *R. glutinosa* dose 2000 mg/kg; R1g: *R. glutinosa* dose 1000 mg/kg; E2g: *E. ulmoides* dose 2000 mg/kg. Resultado não significativo, com $p > 0,05$.

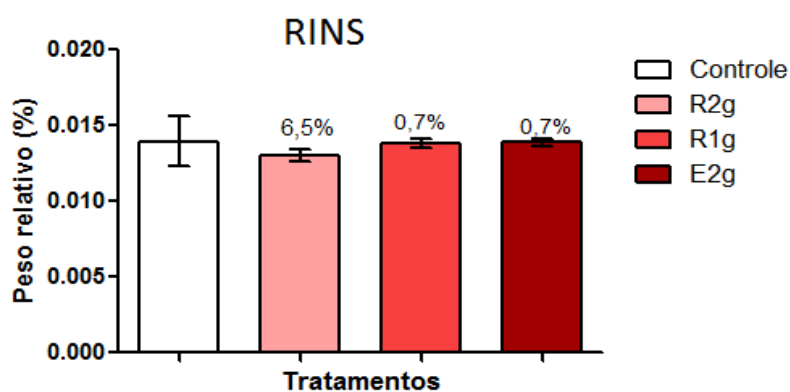


Figura 25: Comparação do peso dos rins. Controle: grupo salina, controle negativo; R2g: *R. glutinosa* dose 2000 mg/kg; R1g: *R. glutinosa* dose 1000 mg/kg; E2g: *E. ulmoides* dose 2000 mg/kg. Resultado não significativo, com $p > 0,05$.

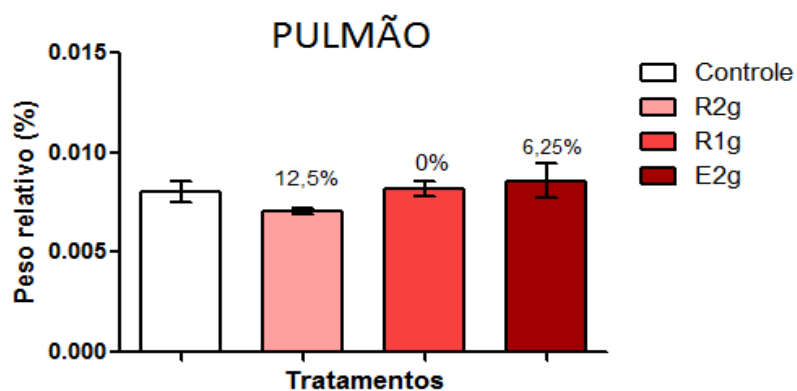


Figura 26: Comparação do peso do pulmão. Controle: grupo salina, controle negativo; R2g: *R. glutinosa* dose 2000 mg/kg; R1g: *R. glutinosa* dose 1000 mg/kg; E2g: *E. ulmoides* dose 2000 mg/kg. Resultado não significativo, com $p > 0,05$.

7-2.2 Teste de Formalina

Dentre os modelos de nociceção avaliados iniciamos com o teste da formalina.

O teste de formalina foi realizado como descrito por Woolfe e Macdonald (1944), com algumas modificações do protocolo (Spindola et al., 2012). A injeção intraplantar de formalina (3% em salina, 20 uL) na pata posterior de camundongos produziu intensa resposta nociceptiva em duas fases distintas: a primeira de 0 a 5 minutos (dor neurogênica) e a segunda de 20 a 40 minutos (dor inflamatória). Nos animais previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), a reatividade na primeira fase de nociceção foi de $60,69 \pm 20,77$ segundos e na segunda fase $182,20 \pm 99,89$ segundos. A morfina (10 mg/kg), controle positivo, apresentou redução de 100% ($0,00 \pm 0,00$) e 100% ($0,00 \pm 0,00$) nas fases I e II respectivamente. Os resultados estão demonstrados nos gráficos.

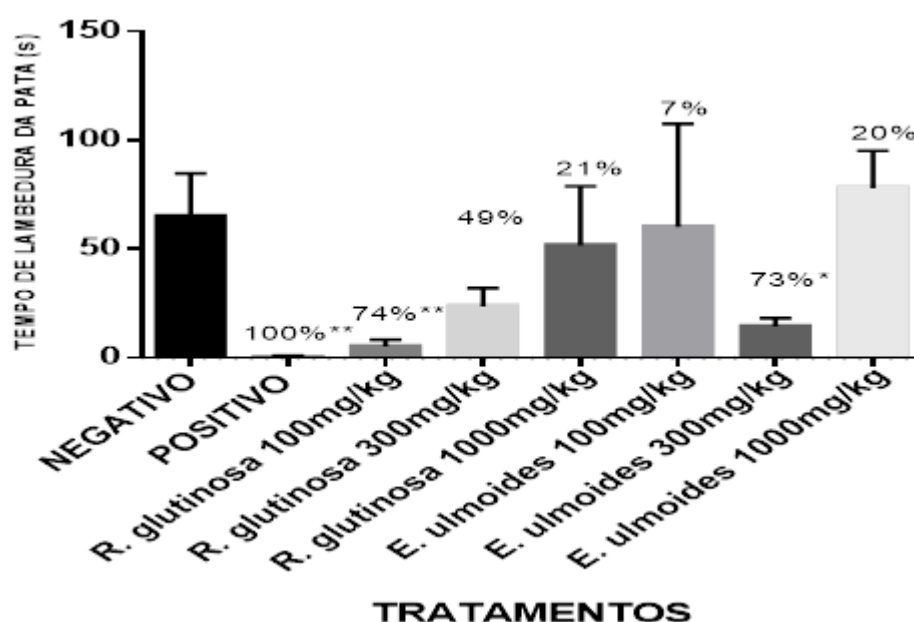


Figura 27: Fase neurogênica - Reatividade a aplicação intraplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), morfina (20mg/kg) e com extratos brutos da *R. glutinosa* e *E. ulmoides* nas doses 1000mg/kg, 300mg/kg e 100mg/kg. As colunas indicam as médias da fase I (0 a 5 minutos – dor neurogênica) \pm desvio padrão de 5 animais por grupo experimental. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição do tempo de lambedura da pata em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, com $p < 0,05$; ** significativo, com $p < 0,005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do tempo de lambedura da pata do grupo}}{\text{média do tempo de lambedura da pata do controle negativo}} * 100$$

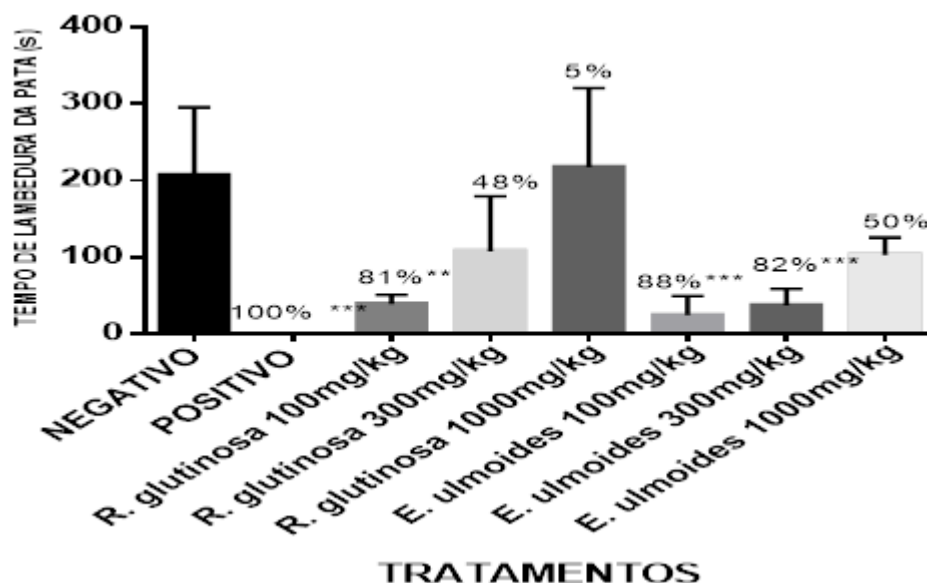


Figura 28: Fase inflamatória - Reatividade a aplicação intraplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), morfina (20 mg/kg) e com extrato bruto da *R. glutinosa* e *E. ulmoides* nas doses 1000mg/kg, 300mg/kg e 100mg/kg. As colunas indicam as médias da fase II (20 a 40 minutos – dor inflamatória) \pm desvio padrão de 5 animais por grupo experimental. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição do tempo de lambedura da pata em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, com $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula: $\% = 100 - \frac{\text{média do tempo de lambedura da pata do grupo}}{\text{média do tempo de lambedura da pata do controle negativo}} \times 100$

A injeção subcutânea de formalina nos animais induz o aparecimento de diferentes respostas motoras bem caracterizadas, a sua quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva. Por meio deste teste é possível analisar duas fases: aguda e tardia. As duas fases do teste têm propriedades diferenciais, sendo úteis tanto para avaliar as substâncias analgésicas, como para elucidar o mecanismo de analgesia. A fase inicial é denominada dor não-inflamatória (neurogênica) e é o resultado da estimulação direta de nociceptores e reflete a dor central. A segunda fase é denominada dor inflamatória e, é caracterizada pela inflamação local com liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgesia (Cecília et. al., 2014).

A primeira fase é sensível a drogas que interagem com o sistema opióide, como a morfina, e a segunda fase é inibida por anti-inflamatórios não esteróideais (AINES). Sendo assim, drogas de ação central (opióides) são capazes de inibir ambas as fases, enquanto que drogas que atuam periféricamente agem somente inibindo a segunda fase (Cecília et. al., 2014).

De acordo com os resultados de teste de Formalina, os extratos apresentam atividade anti-inflamatória significativa comparada com grupo controle negativo, aproximadamente 80% de inibição de tempo de lambedura da pata nas doses baixas: 100 mg/kg do extrato *R. glutinosa* e 100 mg/kg e 300 mg/kg no extrato *E. ulmoides*, doses dependentes.

A resposta da fase neurogênica segue relação de dose x resposta apenas para extrato *R. glutinosa*, com 74% de inibição do tempo de lambertura da pata na dose mais baixa testada, 100 mg/kg. O mesmo não acontece para extrato *E. ulmoides*, que apresenta resposta significativa apenas na dose 300 mg/kg.

Os resultados mostram resposta inversamente proporcional para ambos os extratos principalmente na fase inflamatória, possíveis explicações são: 1) o critério de contagem do tempo de lambertura da pata é diferente entre os pesquisadores, pois o teste foi realizado no mesmo dia para diminuir as variações dos animais e foi necessário aumentar número de participantes para finalizar o teste. Porém não foi estabelecido critérios de contagem no início do teste; 2) ação dos extratos, que aumenta atividade com a diminuição da dose, porém mais testes serão necessários para confirmar e explicar resultados observados; 3) os extratos não foram amplamente distribuídos e totalmente biotransformados depois de serem administrados nos animais.

Os dados do teste de formalina mostraram possível atividade anti-inflamatória dos extratos brutos hidroalcoolicos, iniciou-se, portanto, próximo teste para confirmar os resultados.

7-2.3 Teste de Atividade antiulcerogênica

Com os resultados do teste de Formalina, foi realizado teste antiulcerogênico com úlcera induzida por Etanol e os resultados são apresentados a seguir:

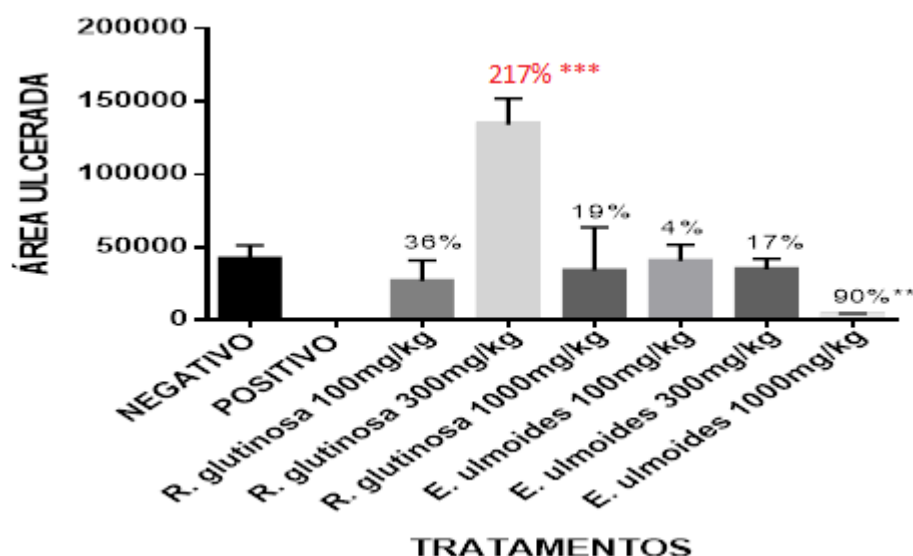


Figura 29: Efeito anti-úlceras da administração oral dos extratos brutos de *R. glutinosa* e *E. ulmoides* nas doses de 100 mg/kg, 300 mg/kg e 1000 mg/kg, comparando-se com os grupos de controle negativo. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição ou aumento da área ulcerada em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0001$. Porcentagem indicado em vermelho corresponde ao grupo que apresentou aumento da área ulcerada. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média da área ulcerada do grupo}}{\text{média da área ulcerada do controle negativo}} * 100$$

Verificou-se que *R. glutinosa* aumentou excessivamente a área ulcerada comparando com o grupo controle negativo, ao contrário da *E. ulmoides* Oliv., que apresentou área significativamente diminuída (90% comparando com grupo negativo).

O teste de atividade antiulcerogênico possui como objetivo avaliar ação dos fármacos sobre úlcera provocada pelo etanol absoluto.

O extrato da espécie *R. glutinosa* agravou a resposta inflamatória com área ulcerada excessivamente aumentada, mais de 200% comparado com grupo controle negativo. Ao contrário do extrato da *E. ulmoides*, que inibiu 90% da área ulcerada. Esta resposta provavelmente ocorreu devido à diminuição de produção de prostaglandina da espécie *R. glutinosa* e consequentemente, aumento de produção dos fatores pró-inflamatórios e migração das células inflamatórias.

Baseando nos conceitos de “*Network Pharmacology*” e da Teoria de Formulação da MTC, é possível entender que a associação frequente destas duas espécies possui ação protetora e

complementar, com o objetivo de diminuir efeito colateral da espécie *R. glutinosa*. Assim como a maioria dos AINEs, a espécie *R. glutinosa* lesa a mucosa gástrica através do mecanismo de diminuição de produção de prostaglandina e, com o uso concomitante de *E. ulmoides* na forma de associação, variando suas concentrações numa formulação da MTC, é possível atingir o alvo do tratamento com efeito colateral minimizado.

7-2.4 Teste de edema de pata induzida por carragenina

Com a finalidade de confirmar ação anti-inflamatória e inferir o mecanismo de ação das plantas, foi realizado teste anti-inflamatório por edema de pata induzida por carragenina.

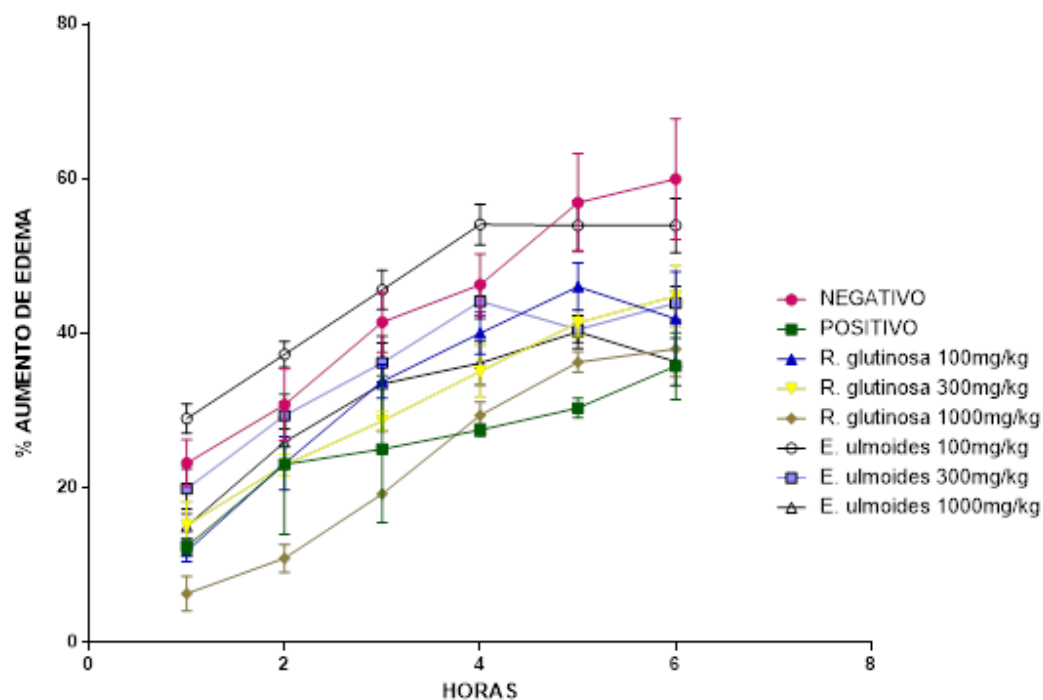


Figura 30: Evolução da porcentagem de aumento de edema ao longo de 6 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação.

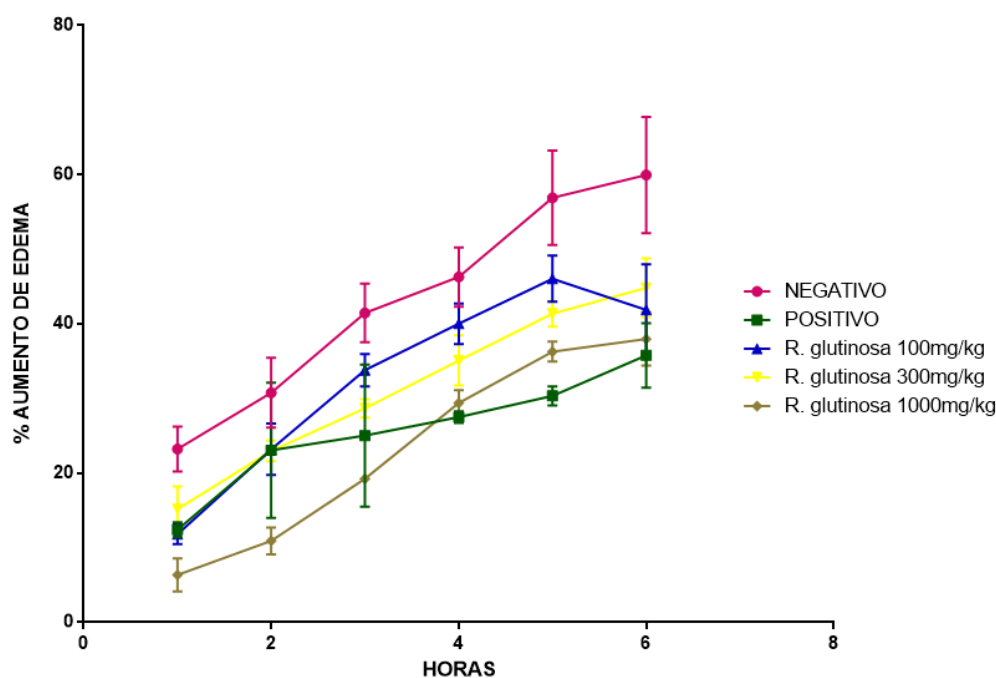


Figura 31: Evolução da porcentagem de aumento de edema ao longo de 6 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação dos grupos da *R. glutinosa* e os controles.

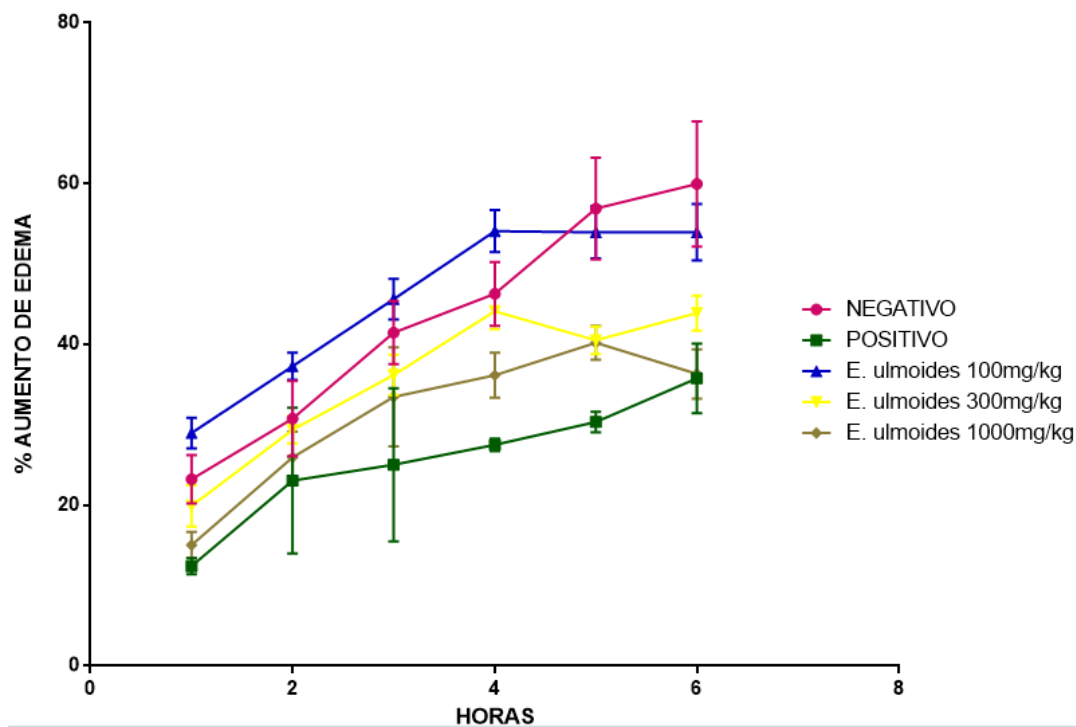


Figura 32: Evolução da porcentagem de aumento de edema ao longo de 6 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação dos grupos da *E. ulmoides* e os controles.

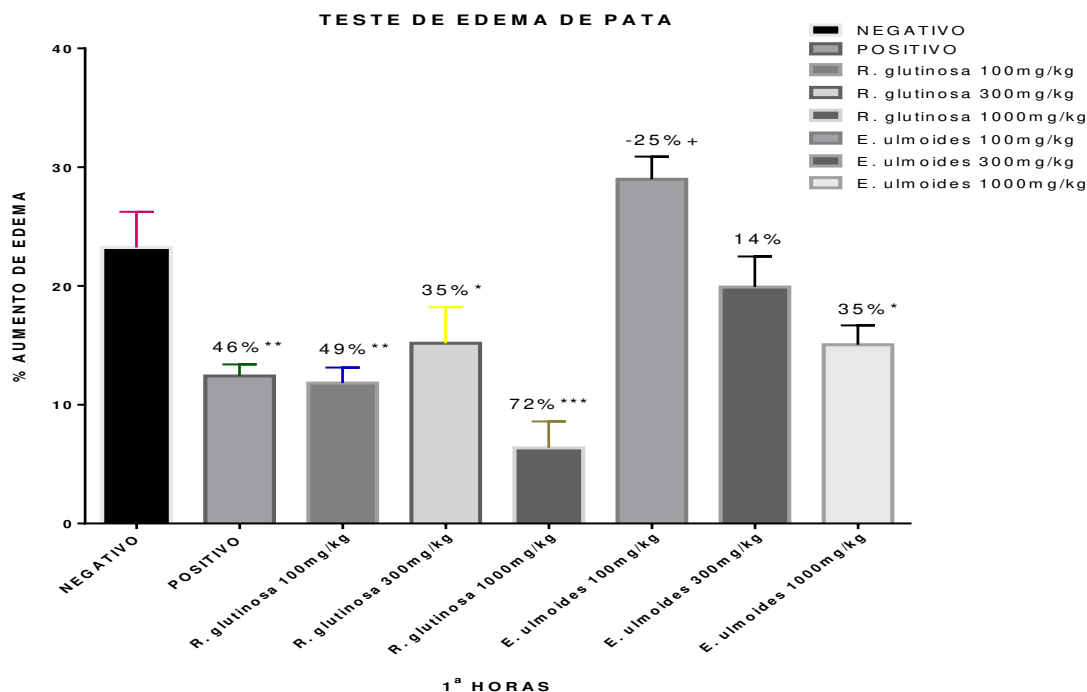


Figura 33: Porcentagem de aumento de edema depois de 1 hora de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição (+) ou aumento (-) do edema em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do edema de pata do grupo}}{\text{média do edema de pata do grupo controle negativo}} * 100$$

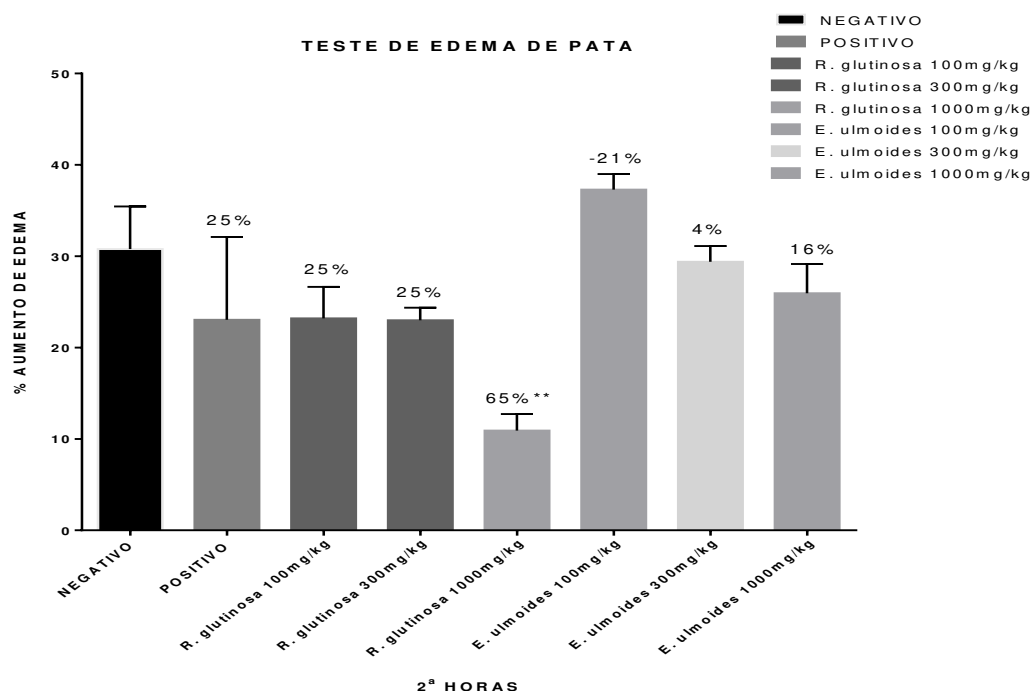


Figura 34: Porcentagem de aumento de edema depois de 2 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição (+) ou aumento (-) do edema em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do edema de pata do grupo}}{\text{média do edema de pata do grupo controle negativo}} * 100$$

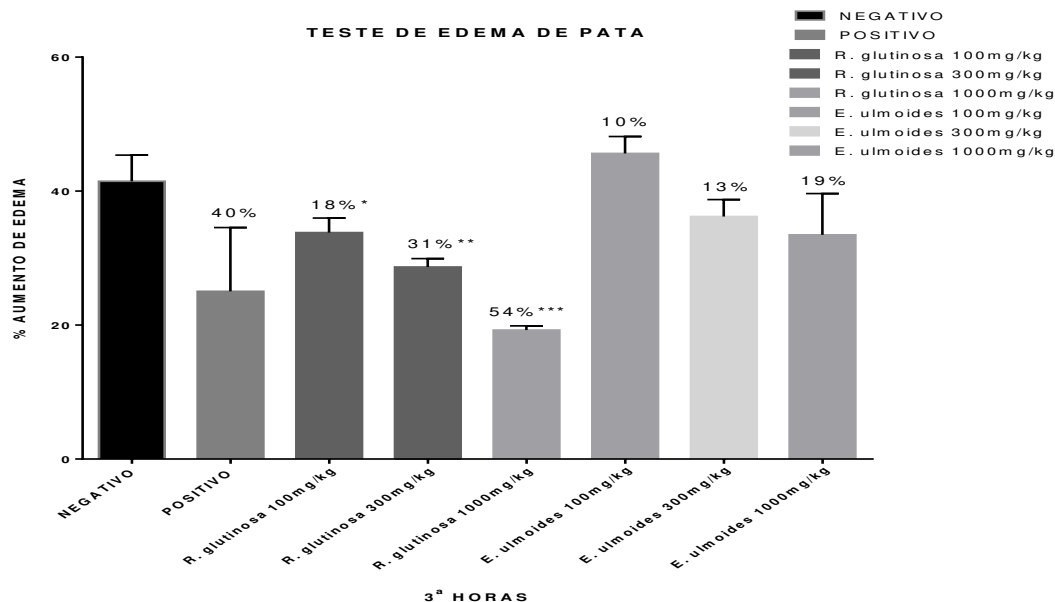


Figura 35: Porcentagem de aumento de edema depois de 3 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição (+) ou aumento (-) do edema em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do edema de pata do grupo}}{\text{média do edema de pata do grupo controle negativo}} * 100$$

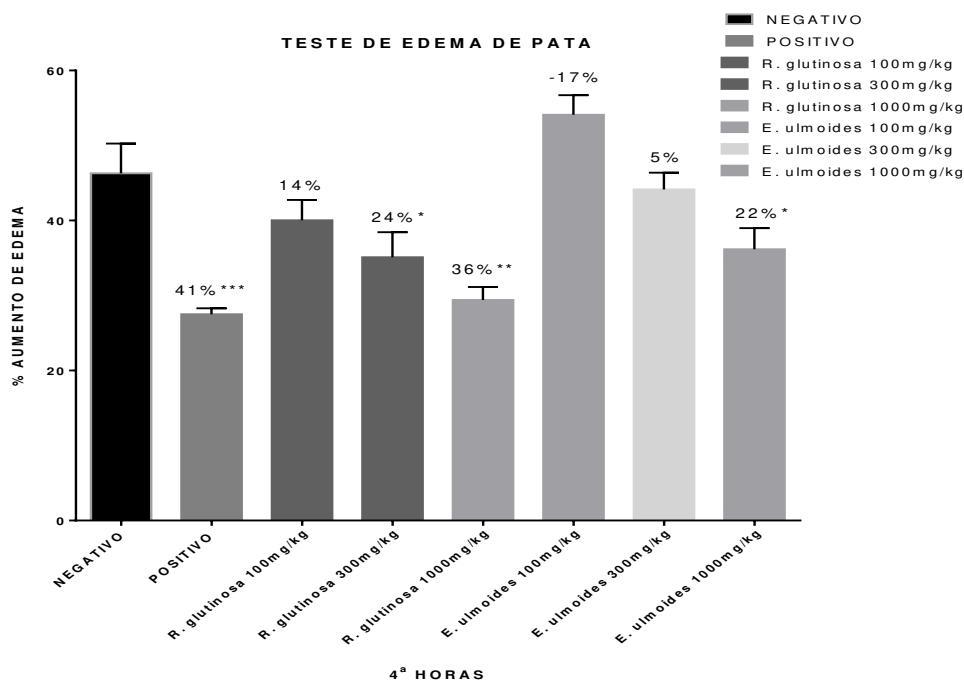


Figura 36: Porcentagem de aumento de edema depois de 4 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição (+) ou aumento (-) do edema em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do edema de pata do grupo}}{\text{média do edema de pata do grupo controle negativo}} * 100$$

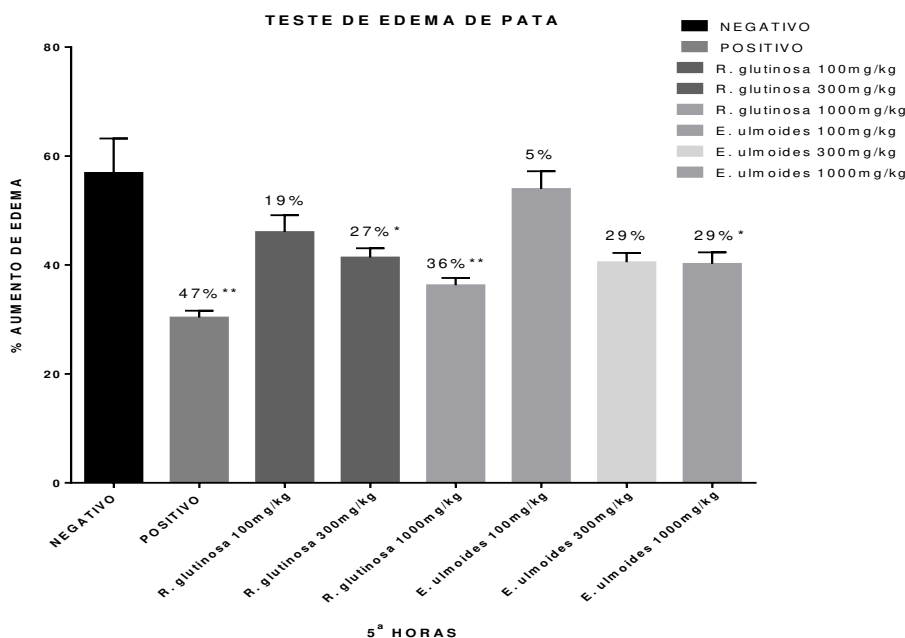


Figura 37: Porcentagem de aumento de edema depois de 5 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição (+) ou aumento (-) do edema em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do edema de pata do grupo}}{\text{média do edema de pata do grupo controle negativo}} * 100$$

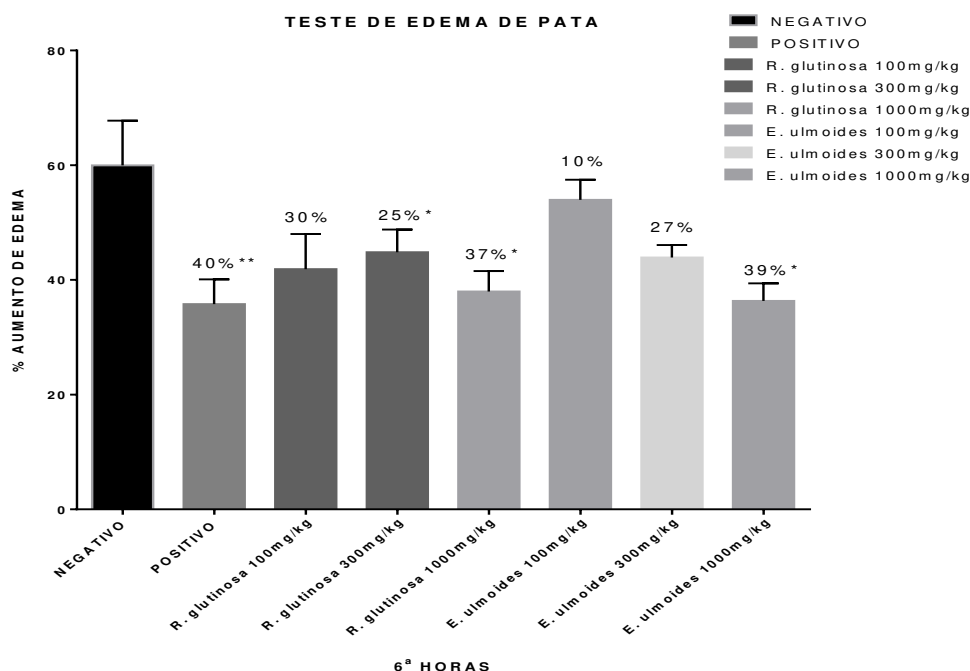


Figura 38: Porcentagem de aumento de edema depois de 6 horas de tratamento com injeção subplantar de carragenina como indutor de inflamação. As porcentagens indicam a comparação com o grupo controle negativo: diminuição (+) ou aumento (-) do edema em relação ao grupo controle negativo. * indica significância do resultado: * pouco significativo, $p < 0,05$; ** significativo, $p < 0,005$; *** muito significativo, $p < 0,0005$. Os resultados de porcentagem foram calculados seguindo a fórmula:

$$\% = 100 - \frac{\text{média do edema de pata do grupo}}{\text{média do edema de pata do grupo controle negativo}} \times 100$$

Foi observado que a espécie *R. glutinosa* apresentou atividade anti-inflamatória logo nas primeiras horas mantendo ao longo de 6 horas ao comparar-se com grupo de controle negativo e o efeito foi dose dependente, enquanto *E. ulmoides* Oliv. apresentou tal atividade, porém pouco significativa somente na dose mais alta, 1000 mg/kg.

Segundo Ogonowski et al., 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 à produção excessiva de prostaglandina (Ogonowski et al., 1997).

A atividade anti-inflamatória do extrato bruto *R. glutinosa* parece seguir o mecanismo de inibição de cicloxigenase, diminuindo produção de PG_2 , trazendo como resultado, aumento de área ulcerada no estômago dos ratos em doses dependentes, assim como a maioria dos AINEs. Segundo Liu et al. (2012), produção excessiva dos mediadores inflamatórios geram doenças como artrite reumatoide e câncer. Entre as moléculas pro-inflamatórias, óxido nítrico (NO), em altas quantidades, produz indutor de óxido nítrico sintase (iNOS), que está intimamente associada ao dano celular e tecidual, além de patogênese de várias enfermidades. De maneira semelhante, a expressão de alto nível de prostaglandina E_2 (PGE_2), convertida a partir de ácido araquidônico por cicloxigenase-2 (COX_2) tem sido associada à inflamação em artrites. No seu estudo, tem

demonstrado que o extrato da raiz da *R. glutinosa*, especialmente fração contendo molécula rehmapicrogenin, possui atividade inibitória de NO, COX₂ e IL-6 (Liu et al., 2012).

Entretanto, o extrato da espécie *E. ulmoides*, apesar de apresentar área ulcerada diminuída e aumento do volume de pata nas primeiras horas do teste de inflamação por carragenina, o edema foi significativamente diminuída (39% comparado com o grupo controle negativo na sexta hora) nas horas tardias do tratamento, ou seja, o mecanismo de ação da planta pode ser outro além da inibição de ciclooxigenase, já que a PG₂ é aumentada nas primeiras horas, o que provoca aumento da inflamação e diminuição da área ulcerada.

Com os conceitos de “*Network Pharmacology*” e as teorias da formulação da fitoterapia da MTC, podemos observar que ambas as plantas possuem ações complementares e não anuláveis, ou seja, a ideia de associar as duas plantas numa formulação pode ter objetivo de diminuir inflamação por tempo maior, já que *E. ulmoide* iniciou sua atividade anti-inflamatória nas horas tardias do tratamento, além de minimizar efeitos adversos trazidos pelos medicamentos anti-inflamatórios.

Como explicado anteriormente, as prostaglandinas agem modulando o fluxo sanguíneo renal e o uso prolongado dos AINEs no tratamento das doenças degenerativas como artrite reumatoide causa, como efeito adverso principalmente a médio e longo prazo, sérios transtornos gástricos e intestinais, além nos rins necrose papilar, hipertensão arterial e, finalmente, insuficiência renal (Monteiro et. al., 2005).

A COX₂ é expressa constitutivamente em certas áreas renais e cerebrais. No estômago, apenas a COX₁ é expressa constitutivamente (DeLucia et. al., 2016). Esta consideração explica a resposta observada no teste antiulcerogênico do presente estudo, especialmente inibição da área ulcerada da espécie *E. ulmoides* na dose mais alta testada, 1000mg/kg. Coincidentemente, esta espécie é tradicionalmente utilizada pela MTC como tonificante renal, metabolismo ósseo e regulação imunológica, além de proteção vascular, que está intimamente relacionada às funções de COX₂, porém o mecanismo de ação desta espécie deve ser aprofundado e estudado.

8 - Conclusão

Este estudo avaliou apenas duas espécies muito utilizadas na MTC com o objetivo de contribuir com os dados para atender a RDC 21/2014, visando à saúde pública que utiliza esses produtos com isenção de registro, permitindo o aumento de uso dos produtos da Fitoterapia Chinesa.

Através dos laudos fornecidos pela fabricante, foi possível observar a simplicidade com a falta das informações como teor dos princípios ativos envolvidos, descrição dos valores máximos e mínimos dos componentes tóxicos e da época da colheita. Além disso, o esquema de extração fornecido não indica como as espécies foram processadas, visto que para *R. glutinosa*, existem três formas de obtenção e o presente estudo partiu do extrato bruto hidroalcoólico de raiz preparada da *R. glutinosa*.

O método analítico para a espécie *R. glutinosa* ainda necessita ser desenvolvido para viabilizar a quantificação da molécula catalpol e marcador da espécie.

Em relação à toxicidade, os EBH de ambas as espécies não apresentaram sinais tóxicos agudos. Apesar de apresentar hipersensibilidade na dose mais alta testada de *R. glutinosa* na observação hipocrática e primeiros 20 minutos depois de administração oral nos animais, os resultados não foram significativos e acredita-se que seja uma das ações farmacológicas da espécie, porém mais testes devem ser realizados, assim como teste de toxicidade crônica de doses repetidas.

O presente estudo avaliou a atividade farmacológica das espécies *R. glutinosa* e *E. ulmoides*, além de identificar e quantificar os respectivos marcadores com o objetivo de contribuir com dados de eficácia e qualidade destas espécies vegetais, atendendo a RDC 21 e 26/2014 da ANVISA. Os resultados demonstraram que a espécie *R. glutinosa*, em altas doses, 2000mg/kg, apresenta leve aumento de locomoção nos camundongos e sem sinais tóxicos relevantes para a espécie *E. ulmoide*. E, através do teste de Toxicidade Aguda, foi comprovado que ambas as plantas, isoladamente, não apresentam toxidade nas doses baixas (até 1000 mg/kg). Entretanto, muitos produtos dessa linha são de uso prolongado, com atividade preventiva ou tratamento de doenças crônicas ou diminuição de avanço das doenças degenerativas, que requer uso prolongado de maneira associada. Além disso, as culturas das plantas medicinais da China são diversificadas, com qualidades variadas e uso de defensivos agrícolas com resíduos químicos difíceis de serem eliminados. Portanto, teste de toxicidade em doses repetidas é recomendado para avaliar a segurança dessas espécies de forma continua.

Paralelamente, foi observado que as espécies possuem atividades farmacológicas complementares e protetores no organismo vivo, o que justifica sua associação de uso nas formulações da MTC, confirmando a teoria clássica de formulações dos fitoterápicos da MTC, em que as plantas possuem seus papéis como Rei, Ministro, Auxiliar e Mensageiro nas formulações e muitas vezes a associação não tem o objetivo de potencializar a ação principal, mas diminuir os efeitos adversos.

9 - Perspectivas futuras

Como as plantas são de uso prolongado e frequentemente associado nas formulações, é necessário, como perspectivas futuras, realizar testes de toxicidade crônica em doses repetidas e toxicidade de associação dos extratos.

Além disso, deverão ser realizados estudos de controle de qualidade físico-químico, microbiológicos e estudos de estabilidade dos extratos adquiridos, garantindo a saúde pública devido ao uso crescente e fácil acesso dos produtos fitoterápicos da MTC.

10 - Referências Bibliográficas

- Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook, RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*. 1995; 60 (1): 91-102.
- Allen A, Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2005; 288(1): C1-19
- An J, Yang H, Zhang Q, Liu C, Zhao J, Zhang L, Chen B. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. *Life Sciences*. 2016; 147: 46-58.
- ANVISA, RDC 21, de 25 de Abril de 2014
- Bai G, Hou Y Y, Jiang M, Gao J. Integrated systems biology and chemical biology approach to exploring mechanisms of traditional chinese medicines. *Chinese Herbal Medicines*. 2016; 8(2): 99-106
- Balbino E E, Dias M F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010; 20 (6): 992-1000
- Auteroche B, Navailh P. O diagnóstico na medicina chinesa. São Paulo: Editora Andrei; 1992
- Bighetti A E, Antonio M A, Carvalho J E. Regulation and modulation of gastric secretion. *Revista de Ciências Médicas*. 2002; 11(1):55-600.
- Brzozowska I, Targosz A, Sliwowski Z, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Konturek P C, Brzozowski T, Pawlik M, Konturek S J, Pawlik W W, Hahn E G. Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (no)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (cox)-2 inhibitor. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004; 55 (4): 773-790
- Carlini E A. Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2003; 75: 501-512.
- Cecília F V S, Murgas L D S. Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de produtos naturais. *Boletim Técnico, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária*. 2014; 97: 1-35.
- Chan K. Progress in traditional Chinese medicine. *Tips*. 1995; 16

Chen J, Zhu H, Chu V M, Jang Y S, Son J Y, Kim Y H, Son C G, Seol I C, Kang J S. Quality control of a herbal medicinal preparation using high-performance liquid chromatographic and capillary electrophoretic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011; 55: 206-210.

DeLucia R, Filho R M O. *Farmacologia Integrada*. 5ª ed. São Paulo: Editora Revinter; 2016.

Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D. Mass spectrometry- based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007; 26(1): 51-78

Donatini R S, Ishikawa T, Barros S B M, Bacchi E M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009; 19:1

Dubbuissou D, Dennis S G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1995; 4 (2): 161-174

Eichenseher J. Peptic Ulcer Disease, In *Integrative Medicine*. 4ª ed. New Mexico: Elsevier; 2018.

Elisabetsky E, Simões CMO et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª. Ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; 2010.

Feng H, Fan J, Song Z, Du X, Chen Y, Wang J, Song G. Characterization and immunoenhancement activities of *Eucommia ulmoides* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 2016; 136: 803-811.

Forstner J F, Forstner G G. Gastrointestinal mucus. In: Johnson, L. R., editor. *Physiology of the Gastrointestinal tract*. 3rd ed. New York: Raven Press; 1994

Gibon E, Lu L Y, Nathan K, Goodman S B. Inflammation, ageing, and bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*; 2017; 10: 28-35.

Giorgi R D N. Atualização de fármacos utilizados em Reumatologia - Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) – 1ª parte. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Moreira JR. 2005.

Gonzalez M H, Bianchi S R, Pereira C D, Cassiano N M, Cass Q B. Detector evaporativo com espalhamento de luz: princípios de operação e aplicações em cromatografia líquida de alta eficiência. *Scientia Chromatographica*. 2011; 3(4): 315-325.

Guha S, Kaunitz J D. Gastroduodenal mucosal defence: na integrated protective response. *Current Opinial in Gastroenterology*. 2002; 18 (6): 650-657.

Hardman J G, Limbird L E, Gilman A G. As bases farmacológicas da terapêutica. 12^a. Ed. Rio de Janeiro: Editora Mc Graw Hill. 2012

Hawkins C, Hanks GW. The Gastroduodenal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. A Review of the Literature. J. Pain Symptom Management. 2000; 20: 140-151.

He K. Traditional Chinese and Thai medicine in a comparative perspective. Complementary Therapies in Medicine. 2015; 23: 821-826.

He X, Wang J, Li M, Hao D, Yang Y, Zhang C, He R, Tao R. *Eucommia ulmoides* Oliv.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. Journal of Ethnopharmacology. 2014; 151: 78-92.

He Y, Yao J, Shen S, Su X, Wang Y, Li L, Wang W, Shi J. Effect of Zibushenjing Fang on skeletal development and brain tissue antioxidation in mice with kidney essence insufficiency: a mechanistic study. Journal of Traditional Chinese Medicine. 2013; 33 (3): 394-398.

Holzer P. Gastroduodenal mucosal defense. Current Opinion in Gastroenterology. 2000 16 (6): 469-478.

Hu R F, Sun X B. Design of new traditional Chinese medicine herbal formulae for treatment of type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology. Chinese Journal of Natural Medicines. 2017; 15(6): 0436-0441.

Lappa A J, Souccar C, Lima-landman M T R, CASTRO M S A, De Lima T C M. Plantas Medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. 2008.

Lee I S, Kim K S, Kim K H, Park J, Jeong H S, Kim Y, Na Y C, Lee S G, Ahn K S, Lee J H, Jang H J. Anti-diabetic and anti-obesitic effects of aqueous extracts of Yangkyuksanhwa-tang and its two major compositions on db/db mice. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016; 83: 431-438.

Li Q, Feng Y, Wang L, Wang R, Dong L, Wang C. Post-screening characterization and *in vivo* evaluation of an anti-inflammatory polysaccharide fraction from *Eucommia ulmoides*. Carbohydrate Polymers. 2017; 169: 304-314

Liu C L, Cheng L, Ko C H, Wong C W, Cheng W H, Cheung D W S, Leung P C, Fung K P, Lau C B S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory components from the root of *Rehmannia*

glutinosa and its underlying mechanism via inhibition of iNOS pathway. Journal of Ethnopharmacology. 2012; 143: 867-875.

Liu C, Ma R, Wang L, Zhu R, Liu H, Guo Y, Zhao B, Zhao S, Tang J, Li Y, Niu J, Fu M, Zhang D, Gao S. *Rehmanniae Radix* in osteoporosis: A review of traditional Chinese medicinal uses, phytochemistry, pharmacokinetics and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 2017; 198: 351-362.

Liu P. TCM Treatment of ankylosing spondylitis by tonifying kidney and strengthening the governor vessel. Journal of Traditional Chinese Medicine. 2008; 28 (1): 44-45

Lu H, Jiang J, Xie G, Liu W, Yan G. Effects of an aqueous extract of *Eucommia* on articular cartilage in a rat model of osteoarthritis of the knee. Experimental and Therapeutic Medicine. 2013; 6: 684-688.

Mack M. Inflammation and fibrosis. Matrix Biol. 2017

Martin G R, Wallace J L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. Experimental Biology & Medicine. 2006; 231 (2): 130-137.

Monteiro E C A, Trindade J M F, Duarte A L B P, Chahade W H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). O reumatologista revista. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Moreira JR. 2005

Monteiro K M. Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Complemento nutricional “TK3”, Dissertação do Mestrado. 2006.

Niu H S, Liu I M, Niu C S, Ku P M, Hsu C T, Cheng J T. *Eucommia* bark (Du-Zhong) improves diabetic nephropathy without altering blood glucose in type I-like diabetic rats. Drug Design, Development and Therapy. 2016; 10: 971-978.

Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. Scientific World Journal. 2007; 7: 1359-74.

O'Donnell V B, Maskrey B, Taylor G W. Eicosanoids: generation and detection in mammalian cells. J. Lipid Res. 2009; 50: 423-8.

Ogonowski A A et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1997; 280: 846-853.

Peters-Golden M. Expanding roles for leukotrienes in airway inflammation. *Curr Allergy Asthma*. 2008; 8(4):367-73.

Qiao W L, Wang L, Zang J F, Zang Y M. Effects of gastric ischemia-reperfusion on gastric mucosal cellular apoptosis and proliferation in rats. *Acta Physiologica Sinica*. , 2006; 58 (3): 237-243.

Rang H P, Ritter J M, Flower R J, Henderson G. Rang & Dale Farmacologia. 8ed. São Paulo: Elsevier. 2016.

Sauer J M, Merchant H A. Comprehensive toxicology. 3ª ed. South San Francisco, USA: Elsevier. 2018.

Schubert M L. Gastric secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2000; 16: 463-468.

Shi C J, Gao H F, Liu Z H, Xu X K, Li L F, Shen T, Xiao C J. Steamed root of *Rehmannia glutinosa* Libosch (Plantaginaceae) alleviates methotrexate-induced intestinal muositis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016 183: 143-150.

Shi J, Cao B, Wang X W, Aa J Y, Duan J A, Zhu X X, Wang G J, Liu C X. Metabolomics and its application to the evaluation of the efficacy and toxicity of traditional Chinese herb medicines. *Journal of Chromatography B*. 2016; 1026: 204-216.

Silveira P F, Bandeira M A M, Arrais P S D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18 (4): 618-626.

Silverthorn D U. Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada, 7ª Edição. Porto Alegre: Artmed. 2017

Siqueira J F, Dantas C J S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. In: *Inflamação aguda: mediadores químicos*. São Paulo: Ed MEDSI Ltda. 2000.

Spindola H M, Costa D B, Rodrigues M T, Foglio M A, Pilli R A, Carvalho J E. The antinociceptive activity of harmicine on chemical-induced neurogenic and inflammatory pain models in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012; 102 (1): 133-138.

Sun Y, Zhao Y, Xue S A, Chen J. The Theory development of traditional chinese medicine constitution: A review. *Journal of Traditional Chinese Medical Science*. 2018; 1-13

Valli M, Pivatto M, Danuello A, Castro-Gambia I, Silva D H S, Cavaleiro A J, Araujo A R, Furlan M, Lopes M N, Bolzani V S. Tropical Biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? *Quim. Nova.* 2012; 35 (11): 2278-2287.

Vieira M L T, Huang S M. Botanical-drug interactions: A Scientific Perspective. *Planta Med.* 2012; 78 (13): 1400-1415.

Wallace J L. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. *Inflammation & Allergy Drugs Targets.* 2006; 5(2): 133-137.

Waller D G, Sampson A P. Dyspepsia and peptic ulcer disease, In *Medical Pharmacology and Therapeutics*. 5^a ed. Southampton, UK: Elsevier. 2018.

Wang H, Li M C, Yang J, Yang D, Su Y F, Fan G W, Zhu Y, Gao X M, Paoletti R. Estrogenic properties of six compounds derived from *Eucommia ulmoides* Oliv. and their differing biological activity through estrogen receptors α and β . *Food Chemistry.* 2011; 129: 408-416.

Wang J Y, Yuan Y, Chen X J, Fu S G, Zhang L, Hong Y L, You S F, Yang Y Q. Extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation, synovocyte proliferation and osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2016; 194: 609-616.

Wang L, Zhou G B, Liu P, Song J H, Liang Y, Yan X J, Xu F, Wang B S, Mao J H, Shen Z X, Chen S J, Chen Z. Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008; 105 (12).

Whelton A. Renal Aspects of Treatment with Conventional Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Versus Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitors. *Am J Med.* 2001; 110 (3A): 33-42.

Woolfe G, Macdonald A D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1944; 80 (3): 300-307.

Wu J, Chen H, Li H, Tang Y, Yang L, Cao S, Qin D. Antidepressant potential of chlorogenic acid-enriched extract from *Eucommia ulmoides* Oliver bark with neuron protection and promotion of serotonin release through enhancing synapsin I expression. *Molecules.* 2016; 21:260.

Wu Q, Liang X. Food therapy and medical diet therapy of Traditional Chinese Medicine. *Clinical Nutrition Experimental.* 2018; 18: 1-5.

Xie G P, Jiang N, Wang S N, Qi R Z, Wang L, Zhao P R, Liang L, Yu B. *Eucommia ulmoides* Oliv. bark aqueous extract inhibits osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 162: 148-154.

Xu J K, Li M F, Sun R C. Identifying the impact of ultrasound-assisted extraction on polysaccharides and natural antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Process Biochemistry*. 2015; 50: 473-481.

Xu J, Wu J, Zhu L Y, Shen H, Xu J D, Jensen S R, Jia X B, Zhang Q W, Li S L. Simultaneous determination of iridoid glycosides, phenethylalcohol glycosides and furfural derivatives in *Rehmanniae Radix* by high performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2012; 135: 2277-2286.

Xu W, Larbi A. Review: Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. *Experimental Gerontology*. 2017

Xu Q, Qu F, Pelkonen O. Chapter 12: Network Pharmacology and Traditional Chinese Medicine. *Alternative Medicine*. 2012.

Ye B, Wu D, Wu X, Zhang X, Zhou Y, Shen Y, Shao K, Yu Q. Effect of kidney-reinforcing, blood-activating and stasis-removing recipes on adhesion molecule expression of bone marrow mesenchymal stem cells from chronic aplastic anemia patients. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 2012; 32 (4): 596-603.

Zhang G H. História dos Três Imperadores Antigos. *Journal of Fuyang Teachers College (Social Science)*. 2005; 6: 1004-4310.

Zhang J, Wider B, Shang H, Li X, Ernst E. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. *Complementary Therapies in Medicine*. 2012; 20: 100-106.

Zhang N D, Han T, Huang B K, Rahman K, Jiang Y P, Xu H T, Qin L P, Xin H L, Zhang Q Y, Li Y M. Traditional Chinese medicine formulas for the treatment of osteoporosis: Implication for antiosteoporotic drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 189: 61-80.

Zhao R H, Liu Y, Tan Y, Hao Z P, Meng Q W, Wang R, Long D, Ding Y F, Yang Y H, Wang A M. Chinese medicine improves postoperative quality of life in endometriosis patients: a randomized controlled trial. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2013; 19 (1): 15-21.

Zhang R X, Li M X, Jia Z P. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 2008 117: 199-214.

Zhang Q, Fong C C, Yu W K, Chen Y, Wei F, Koon C M, Lau K M, Leung P C, Lau C B S, Fung K P, Yang M. Herbal formula Astragali Radix and Rehmanniae Radix exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF- β) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition. Phytomedicine. 2012; 20: 9-16.

Zhou J, Xu G, Yan J, Li K, Bai Z, Cheng W, Huang K. *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) DC. polysaccharide ameliorates hyperglycemia, hyperlipemia and vascular inflammation in streptozotocin-induced diabetic mice. Journal of Ethnopharmacology. 2015; 164: 229-238.

Zhu M Q, Wen J L, Zhu Y H, Su Y Q, Sun R C. Isolation and analysis of four constituents from barks and leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver by a multi-step process. Industrial Crops and Products . 2016; 83: 124-132.

11 – Anexos

Anexo 1 - Certificado de Participação do Congresso Internacional



The Brazilian Chemistry Society (SBQ) and the IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry certify that

MARY ANN FOGLIO; YANG MIN YA; HUMBERTO MOREIRA SPINDOLA; ILZA MARIA OLIVEIRA SOUSA; ROSANNA TARKANY BASTING; VANESSA HELENA DA SILVA SOUZA; NUBIA DE CASSIA ALMEIDA QUEIROZ

presented the POSTER EUCOMMIA ULMOIDES AND REHMANNIA GLUTINOSA: TRADITIONAL CHINESE PLANT MEDICINE EVALUATED ON NOCICEPTIVE EXPERIMENTAL MODEL in the 46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49th General Assembly held from July 7th to 14th, 2017 in São Paulo - Brazil.



São Paulo, July 14th, 2017.



Adriano D. Andricopulo
Adriano D. Andricopulo
 Organizing Committee
 Chairman

Aldo José Gorgatti Zarbin
Aldo José Gorgatti Zarbin
 SBQ - Brazilian Chemical Society
 Chairman

Anexo 2 - Certificado de aprovação do uso dos animais



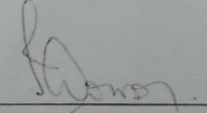
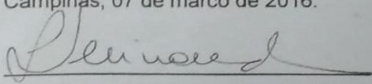
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Produtos Naturais Bioativos: avaliação de parâmetros farmacológicos de *Rehmannia glutinosa* Libosch e *Eucommia ulmoides* Oliver oriundos do Oriente", protocolo nº 4148-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Ann Foglio, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, tendo sido aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 18 de março de 2016.

Vigência do projeto: 05/2016-03/2018
Espécie/Linhagem: Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais: 35
Idade/Peso: 04 semanas / 20g
Sexo: fêmeas
Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais: 96
Idade/Peso: 04 semanas / 200g
Sexo: fêmeas
Espécie/Linhagem: Camundongo isogênico / Balb/cJ
No. de animais: 93
Idade/Peso: 04 semanas / 20g
Sexo: machos
Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 07 de março de 2016.



Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo 3 - Certificado de qualidade dos extratos brutos fornecidos pelo fabricante da espécie *R. glutinosa*

Certificate of Analysis

Product and Batch Information			
Product Name:	Radix Rehmannia Prepared Extract	Country of Origin:	P.R. China
Botanic Name:	<i>Rehmannia Glutinosa</i> Libosch	Active Ingredient:	/
Batch:	BNPRRPE150307	Manufacture Date	Mar. 7, 2015
Analysis Date	Mar. 7, 2015	Report Date	Mar. 10, 2015
Expiry Date	Mar. 6, 2017		
Item	Specification	Result	Test Method
Extract Ratio	10:1	Complies	/
Physical Control			
Appearance	Fine Powder	Complies	Visual
Color	Brown Yellow	Complies	Visual
Taste	Characteristic	Complies	Organoleptic
Odor	Characteristic	Complies	Organoleptic
Identification	Positive	Complies	TLC
Sieve Analysis	100% pass 80 mesh	Complies	80 Mesh Screen
Ash	5% Max	3.15%	2 g/525°C/ 5 hrs
Loss on Drying	5% Max	2.18%	5 g/105°C/ 2 hrs
Part of Plant Used	Root	Complies	/
Method of Extraction	Water & Ethanol	Conform	/
Chemical Control			
Heavy metals	NMT10ppm	Conforms	Atomic Absorption
Arsenic (As)	NMT 2ppm	Conforms	Atomic Absorption
Mercury(Hg)	NMT 1ppm	Conforms	Atomic Absorption
Lead (Pb)	NMT 2ppm	Conforms	Atomic Absorption
GMO Status	GMO Free	Conforms	/
Pesticides Residues	Meet USP Standard	Conforms	Gas Chromatography
Microbiological Control			
Total Plate Count	10000cfu/g Max	Conforms	AOAC
Yeast & Mold	300cfu/g Max	Conforms	AOAC
S. aureus	Negative	Negative	AOAC
E.Coli	Negative	Negative	AOAC
Salmonella	Negative	Negative	AOAC
Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative	USP
Packing and Storage			
Packing	Pack in paper-drums and two plastic-bags inside.25Kg/Drum		
Storage	Store in a well-closed container away from moisture and direct sunlight.		
Shelf Life	2 years if sealed and stored properly.		



Anexo 4 - Certificado de qualidade dos extratos brutos fornecidos pelo fabricante da espécie *E. ulmoides*



Qingdao BNP BioScience Co., Ltd

Tel: (86-532) 8099 1061

Fax: (86-532) 8099 1060

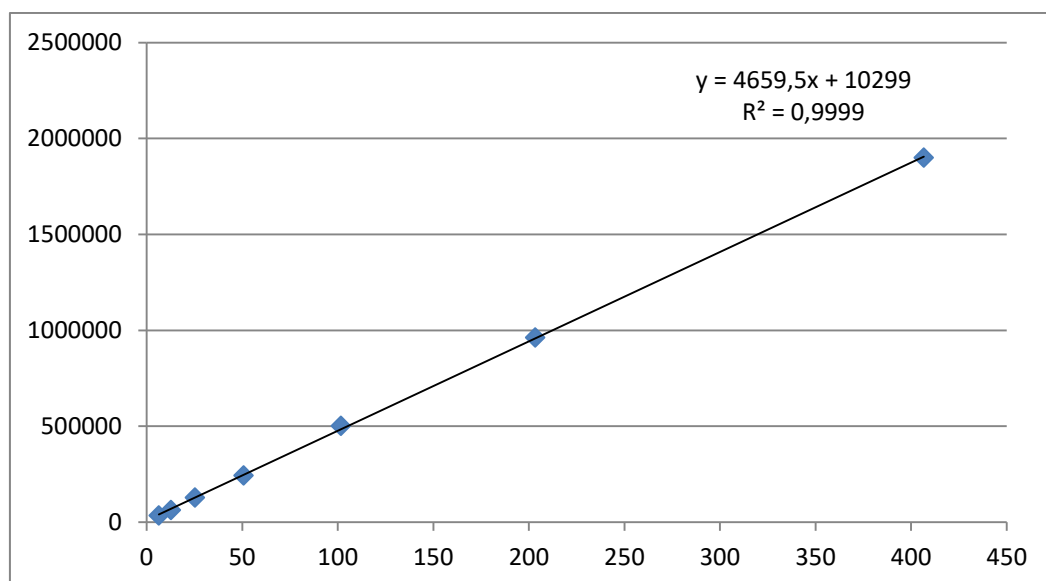
E-mail: info@sinobnp.com

Certificate of Analysis

Product and Batch Information			
Product Name:	Cortex Eucommiae Extract	Country of Origin:	P.R. China
Botanic Name:	<i>Eucommia ulmoides Oliv</i>	Batch:	BNPCEE150317
Manufacture Date	Mar. 17, 2015	Analysis Date	Mar. 17, 2015
Report Date	Mar. 20, 2015	Expiry Date	Mar. 16, 2017
Item	Specification	Result	Test Method
Extract Ratio	10:1	Complies	/
Physical Control			
Appearance	Fine Powder	Complies	Visual
Color	Brownish Yellow	Complies	Visual
Taste	Characteristic	Complies	Organoleptic
Odor	Characteristic	Complies	Organoleptic
Identification	Positive	Complies	TLC
Sieve Analysis	100% pass 80 mesh	Complies	80 Mesh Screen
Ash	5% Max	3.82%	2 g/525°C/ 5 hrs
Loss on Drying	5% Max	2.88%	5 g/105°C/ 2 hrs
Part of Plant Used	Bark	Complies	/
Method of Extraction	Water & Ethanol	Complies	/
Carriers Used	None	Complies	/
Chemical Control			
Heavy metals	NMT10ppm	Conforms	Atomic Absorption
Arsenic (As)	NMT 2ppm	Conforms	Atomic Absorption
Mercury(Hg)	NMT 1ppm	Conforms	Atomic Absorption
Lead (Pb)	NMT 2ppm	Conforms	Atomic Absorption
GMO Status	GMO Free	Conforms	/
Pesticides Residues	Meet USP Standard	Conforms	Gas Chromatography
Microbiological Control			
Total Plate Count	10000cfu/g Max	Conforms	AOAC
Yeast & Mold	300cfu/g Max	Conforms	AOAC
S. aureus	Negative	Negative	AOAC
E.Coli	Negative	Negative	AOAC
Salmonella	Negative	Negative	AOAC
Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative	USP
Packing and Storage			
Packing	Pack in paper-drums and two plastic-bags inside. 25Kg/Drum		
Storage	Store in a well-closed container away from moisture and direct sunlight.		
Shelf Life	2 years if sealed and stored properly.		



Anexo 5 - Curva de calibração de padrão de referência Pinoresinol diglucoside área x concentração ($\mu\text{g/mL}$)



Anexo 6 - Submissão de artigo

3/12/2018

ScholarOne Manuscripts



Planta Medica

[Home](#)
[Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Planta Medica

Manuscript ID

PLAMED-2018-06-0472-OP

Title

Bioactive Natural Products: Evaluation of pharmacological parameters of *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Eucommia ulmoides* Oliver from Asia

Authors

Yang, Min

Foglio, Mary

De Oliveira Sousa, Ilza

Monteiro, Karin

Spindola, Humberto

Eberlin, Marcos N.

Date Submitted

12-Jun-2018

[Author Dashboard](#)

Anexo 7 - Artigo submetido para publicação

Manuscript submitted to editorial office



Bioactive Natural Products: Evaluation of pharmacological parameters of *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Eucommia ulmoides* Oliver from Asia

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Yang, Min; Universidade Estadual de Campinas, Foglio, Mary ; Universidade Estadual de Campinas De Oliveira Sousa, Ilza; Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Ciencias Medicas Monteiro, Karin; Universidade Estadual de Campinas Spindola, Humberto; University of Campinas, Pharmacology and Toxicology - CPQBA Eberlin, Marcos N.; Universidade Estadual de Campinas
Keywords:	anti-inflammatory, <i>Rehmannia glutinosa</i> , <i>Eucommia ulmoides</i> , prostaglandin

SCHOLARONE™
Manuscripts

Sample Manuscript Version May. 2018

Bioactive Natural Products: Evaluation of pharmacological parameters of *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Eucommia ulmoides* Oliver from Asia

Min Ya Yang¹, Ilza Maria de Oliveira Sousa^{1,2}, Karin Maia Monteiro⁴, Marcos Nogueira Eberlin³, Humberto Moreira Spindola², Mary Ann Foglio^{1,2*}

Affiliation

¹Faculty of Medical Science, ²Faculty of Pharmaceutical Science, ³Chemical Institute, ⁴Chemical, Biological and Agricultural Research Center, University of Campinas
University of Campinas, Brazil

*Correspondence

Mary Ann Foglio, Institute of Pharmaceutical Science and Biochemistry, University of Campinas. Rua Candido Portinari, 200, Campinas São Paulo Brasil. E-mail: maryann.foglio@fcf.unicamp.br Phone: +55 19 35218132

Sample Manuscript Version May, 2018

Abstract

Traditional Chinese Medicine (TCM) is an ancient medical practice system that emphasizes regulation of the integrity of the human body and the relationship with the environment. Typically, these formulations are composed of various kinds of medicinal plants, part of animals or minerals, in which only one substance represents the major component and the remainder exerts synergistic effect or reduces toxicity of this main substance. Due to the increase of Chinese herbal medicines use and the lack of studies of these products in Brazil, a pharmacological screening of two traditionally used species, *Rehmannia glutinosa* and *Eucommia ulmoides*, was investigated to contribute with data for future validation of Brazilian RDC 21 and 26/2014 Sanitary Vigilance (ANVISA) requirements. The markers described for the species were monitored by Mass Spectrometry and HPLC-DAD. The anti-inflammatory effect of the species was evaluated in Paw Edema experimental models by Carrageenan and ethanol-induced ulcer. The results showed complementary actions, that is, *E. ulmoides* inhibited 90% ulcer at the highest dose tested, 1000mg / kg, and *R. glutinosa* presented an ulcerated area increased by 217% at 300mg / kg dose. In the Paw edema model, *R. glutinosa* showed activity up to 70% and *E. ulmoides* did not present significant data. The results suggest that the anti-inflammatory mechanism of the *R. glutinosa* species may be involved with the inhibition of cyclooxygenase with decreased production of prostaglandins (PGs).

Key words: anti-inflammatory; *Rehmannia glutinosa*; *Eucommia ulmoides*; prostaglandin.

Sample Manuscript Version May. 2018

Introduction

Traditional Chinese Medicine (TCM) is an ancient medical practice system that emphasizes regulation of the integrity of the human body and the relationship with the environment. Following the principles of compatibility of King (Jun), Minister (Chen), Assistant (Zuo), Messenger (Shi), TCM creates combinations of medicinal plants that interact with each other to treat the disease. Typically, these formulations are composed of various kinds of medicinal plants, part of animals or minerals, in which only one substance represents the major component and the remainder exerts synergistic effect or reduces toxicity of this main substance [1].

Any substance with therapeutic potential, including substances from natural products, to be registered and commercialized as a herbal medicinal product or even to be investigated in clinical screening, necessarily needs to comply with minimum non-clinical research criteria capable of suggesting the toxicological potential and their real health risks. In Brazil, ANVISA is responsible for product's sanitary control, regulating from production to distribution, advertising, consumption and disposal. After obtaining authorization to manufacture and commercialize TCM herbal medicines in the country, the access of these products for the population becomes a possible consequence. Therefore, establishing parameters of efficacy, safety and quality control of these products is necessary to safeguard public health [2].

Eucommia ulmoides Oliv (Eucommiaceae) is a species native from China, with approximately 15 to 20 m in height. The leaves, stem and bark are traditionally used as an antirheumatic supplement for over 2000 years according to literature reports. The plant is also incorporated into TCM formulations for the treatment of impotence, spermatorrhea, osteoporosis, menopause syndromes, hypertension, rheumatoid arthritis and low back pain [3].

Rehmannia glutinosa Libosch (Scrophulariaceae) is used therapeutically through three processing methods according to TCM theories: fresh, dried and prepared root. Folk use believes that the processing of the plant has the effect of reducing heat and activation of blood circulation, nourishing Yin and tonifying Kidney. Research has

Sample Manuscript Version May. 2018

demonstrated pharmacological activities on the immune system, circulatory system, endocrine system, and nervous system [4].

Prostaglandins are synthesized with cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) and are found in high concentrations in the gastrointestinal tract. They are able to increase blood flow, to stimulate synthesis of mucus and bicarbonate, to promote maintenance of sulfhydryl groups and involve in inflammation process, causing vasodilation, inhibition of aggregation of blood platelets, etc [5].

The experimental models of gastric ulcer and carrageenan inflammation in paw edema were used in this project, since they are models in which the duration of the experiment are short, simple flowchart, immediate and direct results.

Material and Methods

The hydroalcoholic extracts were purchased from Chinese manufacturer Qingdao BNP BioScience Co., Ltd., with batch number BNPRPE150307 for *Rehmannia glutinosa* Libosch (radix Rehmannia prepared extract), manufacture date Mar. 7, 2015, extract ratio 10:1. Batch number of *Eucommia ulmoides* Oliv. (cortex Eucommiae Extract) is BNPCEE150317, manufacture date Mar. 17, 2015, extract ratio 10:1. The analytical standards Catalpol (purity > 99%) and Pinoresinol diglucoside (purity > 99%) was purchased from Sigma Aldrich.

All animals were purchased from Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) of University of Campinas (UNICAMP) and performed according to protocols approved by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) of the university, Ethics Committee No. 4148-1. Animals were housed in a specific animal room in the condition of a 12 h light- dark cycle at moderate temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity levels (60-65%). All animals were adapted for 2 weeks before the experiments. During that period, all animals were fed with commercial diet from the manufacturer QUIMTIA[®] and water *ad libitum*.

High Liquid Pressure Chromatography (HPLC) analyzes were performed with a Shimadzu series high pressure liquid chromatography (HPLC) system equipped with a

Sample Manuscript Version May. 2018

quaternary pump (LC-10AT), automatic sampler (SIL 20A HT), column oven (CTO 10AS Vp) and diode arrangement detector (DAD) (SPD-M10Vp) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Instrument control and data analysis were performed using Class VI software 6.13. The column used was C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Gemini®, Phenomenex, Torrance, CA, USA), 10 μ L injection volume, 1 mL / min flow rate, sil-20AT HT automatic injector. The mobile phase was filtered through a Millipore® filtration system using 0.45 μ m and 47 mm diameter PVDF membrane with vacuum and sonification simultaneously. The mobile phase B was Acetonitrile of chromatographic grade. H₂O was acidified with 0.1% formic acid (mobile phase A). The chromatographic conditions and the mobile phase gradient used were 0-5 min: 95% A and 5% B; 5-15 min: 55% A and 45% B; 15-20 min: 40% A and 60% B; 20-30 min: 95% A and 5% B.

For mass analyses (Mass Spectrometry), the samples were dissolved in 1 mL of methanol (MeOH) and 10 μ L of the sample was diluted in 990 μ L of a methanol / water (1: 1, v / v) mixture with 0.1% formic acid (99%) for ionization in the positive mode and another aliquot (10 μ L) diluted in 990 μ L of a methanol / water mixture (1: 1, v / v) with 0.1% ammonium hydroxide (28%) for negative ionization. The samples were injected by direct insertion via a syringe pump into the ESI-Obitrap configuration mass spectrometer (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Germany), both in positive and negative ionization mode. The total acquisition time for each spectrum was set at 1 minute. ESI-MS (full scan) spectra were acquired in the range of m / z 150 to 1800 and the ESI-MS / MS spectra were acquired from m / z 50 to a value just above the m / z of the ion in study and with collision energy of 10 - 40 eV. The general conditions of operation of the equipment were: 3500 V puff voltage, 320° capillary temperature, 10 psi sheat gas pressure and 50 V S-Lens RF level. The spectra were treated with Xcalibur software® (Thermo Scientific, Germany) specific to the mass spectrometer.

Pharmacology

Animals were kept at 25 \pm 2 °C in 12 h light–dark cycles (light phase started at 7:00 am) maintained (5 animals per cage) in the animal care facility with water and food ad libitum, for at least 7 days prior to assays. Separate groups of animals were used for each test, and were used only once in the experiments. Studies were carried out in

Sample Manuscript Version May. 2018

accordance with the Current Guidelines for the Veterinary Care of Laboratory Animals—Joint Working Group on Veterinary Care, Finland (Voipio et al., 2008) and were performed after the approval and under the consent and surveillance of the Institute of Biology Ethics Committee for Animal Research (No. 4148-1), University of Campinas.

Acute toxicity test

Female heterogenic Swiss (25-35 g) mice were used. The experiments were conducted during the light cycle phases, between 08:00 and 12:00. After 12 hours fasting period, animals were separated according to treatment: control group, treated with saline solution 0.9% (volume 10mL / kg), *E. ulmoides* group (2000mg / kg, 10mL / kg) and *R. glutinosa* group (2000mg / kg, 10mL / kg). After oral administration, all animals were kept under observation during 4 hours in order to identify possible clinical signs of toxicity. During the observation period (hipocratic screening), each animal was placed for evaluation of general activity in a plastic box measuring 45 cm x 45 cm x 20 cm with a bottom divided into nine equal areas (15 cm x 15 cm) during five minutes. The number of areas crossed by the four paws of the mice was counted. After the observation period, the animals were kept in their cages throughout the experimental period (14 days), body weight and clinical evaluation were recorded daily. At the end of the experiment, all animals were submitted to euthanasia. Macroscopic analysis and weighing of the following organs were performed: liver, spleen, heart, kidneys and lung for relative weight calculation:

$$\text{Relative weight (\%)} = \frac{\text{Organs weight}}{\text{Body weight}} \times 100$$

Ulcer induced by ethanol test

Male Wistar rats were fasted for 12 hours and separated into 8 groups (n = 5) according to treatment received by gavage: 0.9% saline (negative control), carbenoxolone 200mg / kg (positive control), *R. glutinosa* 100mg / kg, *R. glutinosa* 300mg / kg, *R. glutinosa* 1000mg / kg, *E. ulmoides* 100mg / kg, *E. ulmoides* 300mg / kg, *E. ulmoides* 1000mg / kg. After 1 hour of treatment, 4mL of ethanol were administered by gavage into all animals. After an hour, the animals were euthanized and removed

Sample Manuscript Version May, 2018

stomachs, opened along the greater curvature and washed in 0.9% saline solution for further filming and evaluation of the ulcerated area by ImageJ® program.

Paw edema induced by carrageenan test

The experiment was performed using female (n = 6) Wistar rats groups (150-200g, 12h fast). Initially, the volume of the hind paws of each animal was measured through a hydroplethysmometer (Ugo basile 37140 Plethysmometer) and recorded as a baseline reading. The legs were submerged to the lateral malleolus in a vessel containing specific solution for impulse transmission. After baseline measurements, the groups were treated orally, NaCl 0.9% (negative control group), Indomethacin (positive control group, 20 mg / kg diluted in 0.9% saline solution), *R. glutinosa* 100 mg / kg, *R. glutinosa* 300mg / kg, *R. glutinosa* 1000mg / kg, *E. ulmoides* 100mg / kg, *E. ulmoides* 300mg / kg and *E. ulmoides* 1000mg / kg (diluted in 0.9% saline solution). After 1 hour of sample administration, the animals were submitted to a sub-plantar injection of 0.1 ml carrageenan 1% in physiological solution in the left hind paw. After the injection of carrageenan and at intervals of 1h, 2h, 3h, 4h, 5h and 6h, the paw volume of each animal was measured again. The edematogenic responses were expressed as paw volume increase (mL), calculated by subtraction of the basal volume. Results were presented as mean \pm standard error of the mean for each treatment group or expressed as percentage of variation (increase or inhibition) of the total volume of edema compared to the control group.

Results and Discussion

The strategy of the present work was to evaluate requirements that ANVISA advocates for the development of herbal medicines. Thus, the acquired extracts were evaluated to verify the chemical profile and pharmacological effects for a better understanding of the relationship with the TCM claim.

ANVISA, in 2014, authorized to manufacture and commercialize traditional prescription of TCM products. However, the Chinese Pharmacopoeia is not accepted

Sample Manuscript Version May. 2018

traditionally in Brazil and their editions are difficult to access due to language barrier. Although these formulations have been used during centuries, the species are currently cultivated under different conditions. Furthermore, materials purchased for manufacturing, such as raw extracts or plant parts, may be subject to adulteration, contamination by heavy metals, microorganisms, mycotoxins and pesticides, which change product's quality, efficacy and safety parameters.

Initially a chemical analysis of the extracts of the two species monitored their fingerprint profile by Mass Spectrometry (MS). The molecular markers for *R. glutinosa* were catalpol and verbascoside whereas for *E. ulmoides* was pinoresinol diglucoside. (Figure 1 - 6)

Compound Pinoresinol diglucoside, marker of *E. ulmoides*, was detected and quantified by HPLC-DAD according to method described by European Pharmacopoeia 8.0. Calibration curve was used to determine the compound's content in the extract. (Figure 7 - 8)

Based on calibration curve equation, the concentration of Pinoresinol diglucoside was determined as approximately 0.5% in *E. ulmoides* extract according to European Pharmacopoeia. (Figure 9)

However, the method to determine markers concentration of *R. glutinosa* was unsatisfactory. The spectra presented too much interference and the molecule considered marker was divergent between the Asian pharmacopoeias and literature. According to ethnopharmacological records and Chinese Pharmacopoeia, this species has three forms of use with different effects: fresh, dry and cooked root. As the composition of the natural products changes according to the processing, the treated symptoms are different according to the cooking time of the plant. In the case of *R. glutinosa*, the root of the dry plant is traditionally used in the treatment of spontaneous hemorrhage, menstrual disorders, diabetes and rheumatism, whereas the root of the cooked plant is often used in the treatment of lumbar weakness, uterine bleeding, and menstrual regulation [6]. Therefore, determination of a standard method of quality control and identification of plants used in TCM formulations is

Sample Manuscript Version May. 2018

necessary due to recent legalization of the manufacture of Asian herbal products and easier access to the population.

After the chemical screening of molecular markers, *in vivo* tests to investigate the pharmacological action of the plants were studied.

The pharmacological screening of the species began with an acute toxicological experiment. During the first 4 hours after administration of vehicle and extracts, a greater general activity (agitation) of *R. glutinosa* group (2000mg / kg) was observed. Therefore group *R. glutinosa* 1000mg / kg was evaluated and presented normal behavior compared to the control group. During the five minutes of observation in the hippocratic screening box, the same animals (group of *R. glutinosa* 2000mg/kg) presented a greater number of crosses (33% compared to the control group), confirming a possible stimulating activity.

Thereafter, the animals were housed on the same conditions and during the experimental period (14 days), no behavioral changes were observed in all groups evaluated (*R. glutinosa* 2000mg / kg, *R. glutinosa* 1000mg / kg and *E. ulmoides* 2000mg / kg). On the 15th day of the test, all animals were euthanized and the relative weights of the organs (heart, liver, spleen, kidneys and lung) had no significant variation compared to the control group.

For the purpose of obtaining quicker and direct results, we used practical methods with short time of execution. Therefore, as a pharmacological screening of the species, ulcers induced by ethanol and paw edema induced by carrageenan tests were performed in an attempt to discover the mechanism of action of these plants.

According to results of ulcers induced by ethanol test, animals of group *R. glutinosa* 300mg /kg excessively increased the ulcerated area compared to the negative control group, unlike *E. ulmoides*, which presented a significantly decrease area (90% comparing with negative group). (Figure 10)

Those reactions probably occurred because of the decrease of prostaglandin production in *R. glutinosa* species and consequently increased production of pro-inflammatory factors and migration of inflammatory cells. Based on the concepts of

Sample Manuscript Version May. 2018

the TCM Formulation Theory, the frequent association of these two species has a protective and complementary action, aiming at reducing the collateral effect of the *R. glutinosa* species. Like most NSAIDs, *R. glutinosa* species damages the gastric mucosa through the mechanism of decreased prostaglandin production and, with the concomitant use of *E. ulmoides* and different concentrations in TCM prescriptions, the target of treatment with minimized side effects is reached.

To confirm anti-inflammatory action and to infer the mechanism of action of those plants, an anti-inflammatory test was performed for carrageenan induced paw edema. The *R. glutinosa* species presented anti-inflammatory activity in the first hours, maintaining a 6-hour period when compared to a negative control group, and the effect was dose dependent, whereas *E. ulmoides* presented such activity, with poor significance only at the highest dose, 1000mg / kg (Table 1).

The anti-inflammatory activity of extract *R. glutinosa* appears to follow a cyclooxygenase inhibition mechanism, decreasing PG_2 production, resulting in increased ulcerated area in rat's stomach dose dependent, as well as most NSAIDs.

However, *E. ulmoides* extract, despite having a decreased ulcerated area and increased paw volume in the first hours of the Carrageenan test, edema was significantly decreased (39% compared to the negative control group at the sixth hour) in the late hours of treatment. Therefore, the anti-inflammatory action of this specie could be by a different route than inhibition of cyclooxygenase.

Moreover, both plants have complementary and non-nullable actions, that is, the idea of associating the two plants in a formulation may have the objective of reducing inflammation for a longer time, since *E. ulmoides* showed anti-inflammatory activity in the later hours of the administration, further reducing adverse effect generated by another specie, *R. glutinosa*.

Prostaglandins act by modulating renal blood flow and the prolonged use of NSAIDs in the treatment of degenerative diseases such as rheumatoid arthritis causes, as an adverse effect in the medium and long term, serious gastric and intestinal disorders, in addition to papillary necrosis, hypertension and, finally, renal failure. [7]. Furthermore, COX_2 is constitutively expressed in certain renal and brain areas. In the stomach, only COX_1 is constitutively expressed [8]. These considerations explain the response observed in the ulcer test of the present study, especially inhibition of the

Sample Manuscript Version May. 2018

ulcerated area of *E. ulmoides* at the highest dose tested, 1000mg / kg. Coincidentally, this species is traditionally used by TCM as a renal toner, bone metabolism and immunological regulation, as well as vascular protection, which is closely related to COX₂ functions, but the mechanism of action of this species should be further studied.

As the plants are long term use by patients and frequently associated in formulations, as future prospects, to perform chronic toxicity tests in repeated doses and toxicity of association of the extracts is recommended. Furthermore studies of physic-chemical quality control, microbiological and stability studies of the extracts acquired, guaranteeing the public health are needed.

Acknowledgements

We thank for the financial supported by FAEPEX, CNPq and CAPES and our colleagues from Pharmaceutical Science Faculty, Medical Science Faculty, CPQBA and University of Campinas who provided insight and expertise that greatly assisted this present research.

Conflicts of interests of all authors

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bai G, Hou Y Y, Jiang M, Gao J. Integrated systems biology and chemical biology approach to exploring mechanisms of traditional chinese medicines. *Chinese Herbal Medicines*. 2016; 8(2): 99-106
2. ANVISA, RDC 21, de 25 de Abril de 2014
3. He X, Wang J, Li M, Hao D, Yang Y, Zhang C, He R, Tao R. *Eucommia ulmoides* Oliv.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 151: 78-92.

Sample Manuscript Version May. 2018

4. Zhang R X, Li M X, Jia Z P. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008 117: 199-214.
5. Sauer J M, Merchant H A. *Comprehensive toxicology*. 3^a ed. South San Francisco, USA: Elsevier. 2018.
6. Liu C, Ma R, Wang L, Zhu R, Liu H, Guo Y, Zhao B, Zhao S, Tang J, Li Y, Niu J, Fu M, Zhang D, Gao S. *Rehmanniae Radix* in osteoporosis: A review of traditional Chinese medicinal uses, phytochemistry, pharmacokinetics and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2017; 198: 351-362.
7. Monteiro E C A, Trindade J M F, Duarte A L B P, Chahade W H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). *O reumatologista revista*. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Moreira JR. 2005
8. DeLucia R, Filho R M O. *Farmacologia Integrada*. 5^a ed. São Paulo: Editora Revinter; 2016.
9. Zhou J, Xu G, Yan J, Li K, Bai Z, Cheng W, Huang K. *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) DC. polysaccharide ameliorates hyperglycemia, hyperlipemia and vascular inflammation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 164: 229-238.
10. Zhu M Q, Wen J L, Zhu Y H, Su Y Q, Sun R C. Isolation and analysis of four constituents from barks and leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver by a multi-step process. *Industrial Crops and Products*. 2016; 83: 124-132.
11. Zhang N D, Han T, Huang B K, Rahman K, Jiang Y P, Xu H T, Qin L P, Xin H L, Zhang Q Y, Li Y M. Traditional Chinese medicine formulas for the treatment of osteoporosis: Implication for antiosteoporotic drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 189: 61-80.
12. Xu J, Wu J, Zhu L Y, Shen H, Xu J D, Jensen S R, Jia X B, Zhang Q W, Li S L. Simultaneous determination of iridoid glycosides, phenethylalcohol glycosides and furfural derivatives in *Rehmanniae Radix* by high performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2012; 135: 2277-2286.
13. Xie G P, Jiang N, Wang S N, Qi R Z, Wang L, Zhao P R, Liang L, Yu B. *Eucommia ulmoides* Oliv. bark aqueous extract inhibits osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 162: 148-154.

Sample Manuscript Version May. 2018

14. Wang J Y, Yuan Y, Chen X J, Fu S G, Zhang L, Hong Y L, You S F, Yang Y Q. Extract from *Eucommia ulmoides* Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation, synoviocyte proliferation and osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016; 194: 609-616.
15. Vieira M L T, Huang S M. Botanical-drug interactions: A Scientific Perspective. *Planta Med*. 2012; 78 (13): 1400-1415.
16. Sun Y, Zhao Y, Xue S A, Chen J. The Theory development of traditional chinese medicine constitution: A review. *Journal of Traditional Chinese Medical Science*. 2018; 1-13
17. Shi C J, Gao H F, Liu Z H, Xu X K, Li L F, Shen T, Xiao C J. Steamed root of *Rehmannia glutinosa* Libosch (Plantaginaceae) alleviates methotrexate-induced intestinal muositis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2016 183: 143-150.
18. Liu C L, Cheng L, Ko C H, Wong C W, Cheng W H, Cheung D W S, Leung P C, Fung K P, Lau C B S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory components from the root of *Rehmannia glutinosa* and its underlying mechanism via inhibition of iNOS pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 143: 867-875.
19. Li Q, Feng Y, Wang L, Wang R, Dong L, Wang C. Post-screening characterization and *in vivo* evaluation of an anti-inflammatory polysaccharide fraction from *Eucommia ulmoides*. *Carbohydrate Polymers*. 2017; 169: 304-314

Supporting information

SPECTRUM - Pinorensinol diglucoside

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)		RDB equiv.
681.23972				
681.23891		1.19	12.5	C32 H41 O16
681.24242		-3.97	34.5	C50 H33 O3
681.23304		9.81	21.5	C39 H37 O11
681.24829		-12.59	25.5	C43 H37 O8
681.22717		18.43	30.5	C46 H33 O6
681.25417		-21.21	16.5	C36 H41 O13
681.22366		23.58	8.5	C28 H41 O19
681.26004		-29.83	7.5	C29 H45 O18
681.21778		32.20	17.5	C35 H37 O14
681.26355		-34.98	29.5	C47 H37 O5

Figure 1: Data of Mass Spectrometry analysis of *E. ulmoides* extract, molecular marker Pinorensinol diglucoside. ESI-Obitrap configuration (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Germany), positive and negative ionization

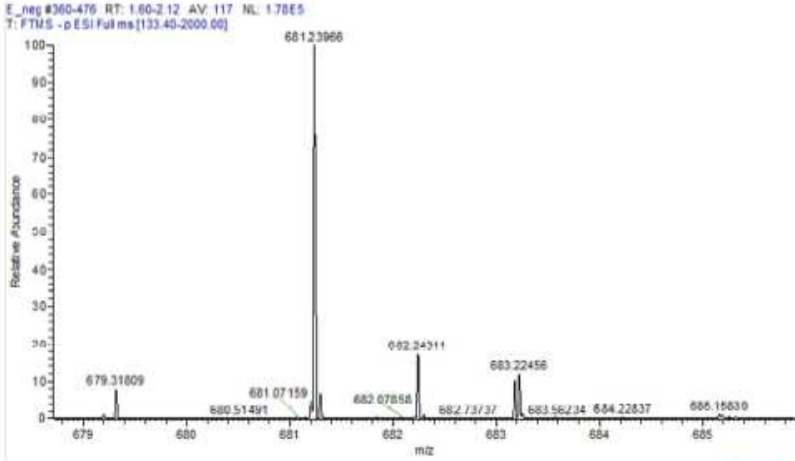


Figure 2: Fingerprint of *E. ulmoides* extract, Pinorensinol diglucoside indicated.

SPECTRUM - Catalpol

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)		ROB equiv.
361.13540				
361.13405		3.73	0.5	C12 H25 O12
361.12818		19.99	9.5	C19 H21 O7
361.14344		-22.25	13.5	C23 H21 O4
361.12231		36.26	18.5	C26 H17 O2
361.14931		-38.51	4.5	C16 H25 O9
361.11292		62.24	5.5	C15 H21 O10
361.15869		-64.50	17.5	C27 H21 O
361.10705		78.50	14.5	C22 H17 O5
361.16456		-80.76	8.5	C20 H25 O6
361.10118		94.77	23.5	C29 H13

Figure 3: Data of Mass Spectrometry analysis of *R. glutinosa* extract, molecular marker Catalpol, ESI-Obitrap configuration (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Germany), positive and negative ionization.

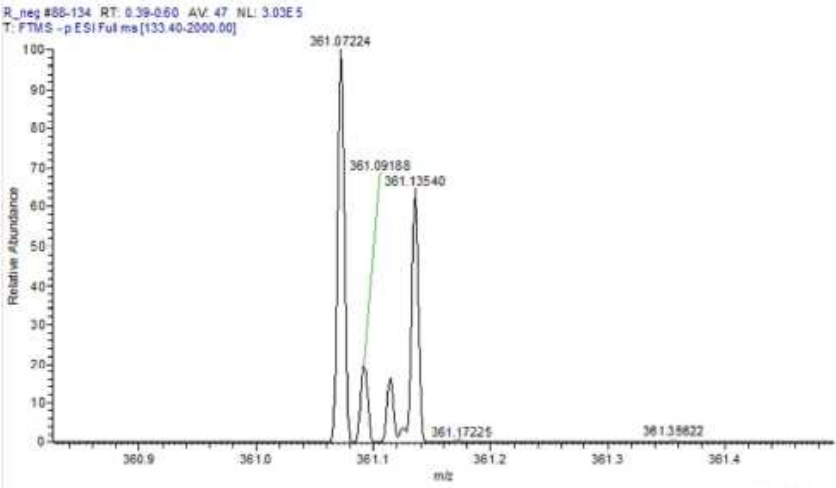


Figure 4: Fingerprint of *R. glutinosa* extract, catalpol indicated.

SPECTRUM · Verbascoside

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.
623.20185			
623.20292	-1.72	3.5	C22 H39 O20
623.20056	2.08	34.5	C47 H27 O2
623.20643	-7.35	25.5	C40 H31 O7
623.19705	7.71	12.5	C29 H35 O15
623.21230	-16.77	16.5	C38 H35 O12
623.19117	17.13	21.5	C36 H31 O10
623.21818	-26.20	7.5	C26 H39 O17
623.18530	26.56	30.5	C43 H27 O5
623.22169	-31.83	29.5	C44 H31 O4
623.18179	32.19	8.5	C25 H35 O18

Figure 5: Data of Mass Spectrometry analysis of *R. glutinosa* extract, molecular marker Verbascoside, ESI-Orbitrap configuration (Q Exactive, Thermo Scientific - Bremen, Germany), positive and negative ionization.

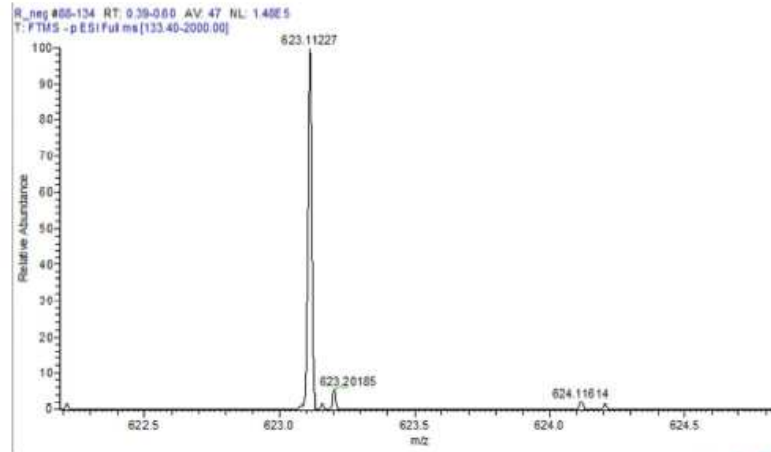


Figure 6: Fingerprint of *R. glutinosa* extract, verbascoside indicated.

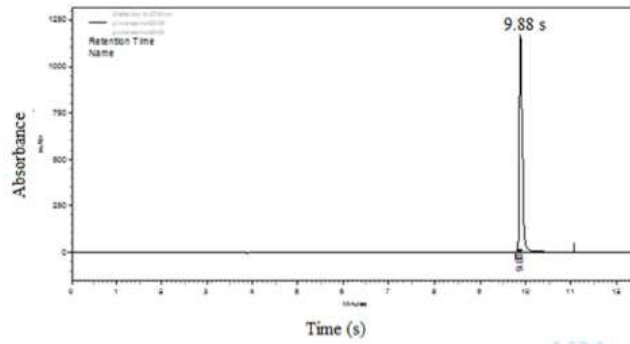


Figure 7: HPLC spectro of Pinoresinol diglucoside standard.

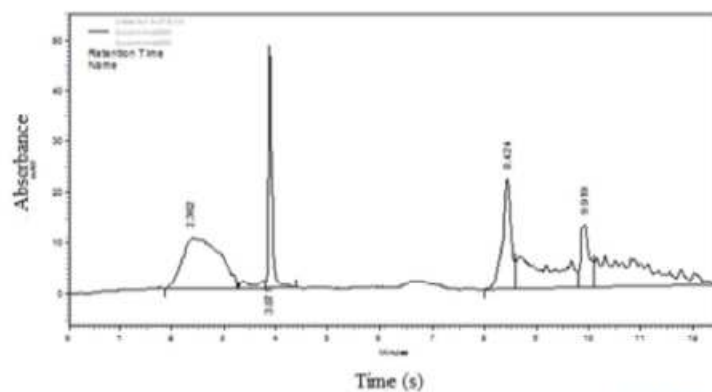


Figure 8: HPLC spectrum of *E. ulmoides* extract.

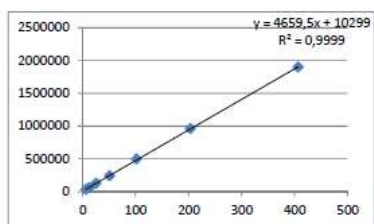


Figure 9: Calibration curve of Pinoretinol diglucoside area x concentration ($\mu\text{g/mL}$), standard purchased from Sigma Aldrich®.

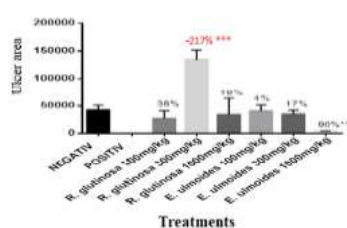


Figure 10: Anti-ulcer effect of oral administration of extracts of *R. glutinosa* and *E. ulmoides* at doses of 100mg/kg, 300mg/kg.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

/ kg and 1000mg / kg. compared to negative control groups.
The percentages indicate the comparison with the negative control group: decrease or increase of the ulcerated area in relation to the negative control group. * indicates significance of the result: ** significant; *** very significant, $p < 0.05$.
Percentage indicated in red corresponds to the group that presented increased ulcerated area. Percentage results were calculated following formula:
$$\% = 100 - \frac{\text{mean of ulcerated area in each group}}{\text{mean of ulcerated area in negative control group}} * 100$$

	Negative control	Positive control	<i>R. glutinosa</i> 100mg/kg		<i>R. glutinosa</i> 300mg/kg		<i>R. glutinosa</i> 1000mg/kg		<i>E. ulmoides</i> 100mg/kg		<i>E. ulmoides</i> 300mg/kg		<i>E. ulmoides</i> 1000mg/kg	
	Mean±s.d	Mean±s.d	Mean±s.d	Decrease compared with negative group (%)	Mean±s.d	Decrease compared with negative group (%)	Mean±s.d	Decrease compared with negative group (%)	Mean±s.d	Decrease compared with negative group (%)	Mean±s.d	Decrease compared with negative group (%)	Mean±s.d	Decrease compared with negative group (%)
14	23,23±2,74	12,44±0,89	11,83±1,19	49,07**	15,19±2,76	34,61*	6,37±2,02	72,58***	28,98±1,91	-24,75*	19,70±2,35	15,20	15,50±1,49	33,28*
15	30,78±4,26	23,06±8,28	23,20±3,14	24,63	22,98±1,26	25,34	10,91±1,65	64,55**	37,28±1,70	-21,12	29,34±1,57	4,68	25,62±2,92	16,76
16	41,46±3,58	25,03±8,70	33,82±1,98	18,43*	28,68±1,19	30,82**	19,24±0,56	53,59***	45,64±2,30	-10,08	37,12±2,32	10,47	33,12±5,62	20,12
17	46,30±3,62	27,50±0,71	40,03±2,48	13,54	35,10±3,05	24,19*	29,38±1,60	36,54**	54,10±2,38	-16,85	44,14±2,04	4,67	36,17±2,56	21,88*
18	56,91±5,77	30,35±1,16	46,07±2,82	19,05	41,37±1,57	27,31*	36,27±1,21	36,27**	53,95±2,97	5,20	40,52±1,54	28,80*	40,20±1,93	29,36*
19	59,98±7,11	35,78±3,94	41,88±5,60	30,18	44,83±3,61	25,26*	37,97±3,26	36,70*	53,94±3,20	10,07	43,92±1,99	26,78	36,33±2,82	39,43*

Table 1: carrageenan-induced paw edema results. *: significance of results, $p < 0.05$. Percent of decrease calculate with below formula: $\% = 100 - \frac{\text{média da área ulcerada do grupo}}{\text{média da área ulcerada do controle negativo}}$. Percent with negative result (-) represents increase of paw volume.

Dear Editor:

Herein data to contribute with future validation of Brazilian RDC 21 and 26/2014 Sanitary Vigilance (ANVISA) requirements of two traditionally used species, *Rehmannia glutinosa* and *Eucommia ulmoides* are reported. This was prompted due to the increase of Chinese herbal medicines use and the lack of studies of these products in Brazil.

Any substance with therapeutic potential, including substances from natural products, to be registered and commercialized as a herbal medicinal product or even to be investigated in clinical screening, necessarily needs to comply with minimum non-clinical research criteria capable of suggesting the toxicological potential and their real health risks. In Brazil, ANVISA is responsible for product's sanitary control, regulating from production to distribution, advertising, consumption and disposal. After obtaining authorization to manufacture and commercialize TCM herbal medicines in the country, the access of these products for the population becomes a possible consequence. Therefore, establishing parameters of efficacy, safety and quality control of these products is necessary to safeguard public health.

The Brazilian agency, ANVISA, in 2014, authorized the manufacturing and commercialization TMC traditional prescription products. However, the Chinese Pharmacopoeia is not accepted traditionally in Brazil and their editions are difficult to access due to language barrier. Although these formulations have been used during centuries, the species are currently cultivated under different conditions. Furthermore, materials purchased for manufacturing, such as raw extracts or plant parts, may be subject to adulteration, contamination by heavy metals, microorganisms, mycotoxins and pesticides, which change product's quality, efficacy and safety parameters.

Hoping the manuscript meets Planta Medica's high standards.

Sincerely,

The Authors