

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Cuphea spp.: perfil fitoquímico, estudos *in vitro* da inibição da enzima conversora de angiotensina e da atividade antiquimiotáxica, otimização da extração, desenvolvimento e validação de método analítico

MARÍ CASTRO SANTOS

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cuphea spp.: perfil fitoquímico, estudos *in vitro* da inibição da enzima conversora de angiotensina e da atividade antiquimiotáxica, otimização da extração, desenvolvimento e validação de método analítico

Tese apresentada por **Marí Castro Santos**,
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Amélia Teresinha Henriques

Coorientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Porto Alegre, 2020

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia
Universidade de Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Edna Sayuri Suyenaga
Universidade Feevale

Dr. Roger Remy Dresch
Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Mari Castro

Cuphea spp.: perfil fitoquímico, estudos in vitro da inibição da enzima conversora de angiotensina e da atividade antiquimiotáxica, otimização da extração, desenvolvimento e validação de método analítico / Mari Castro Santos. -- 2020.

139 f.

Orientador: Amélia Teresinha Henriques.

Coorientador: Andreas Sebastian Loureiro Mendez.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Cuphea. 2. Inibição da enzima conversora de angiotensina. 3. Atividade antiquimiotáxica. 4. Fitoquímica. 5. Otimização e Validação de métodos. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. Mendez, Andreas Sebastian Loureiro, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob orientação da professora Dr^a Amélia T. Henriques e coorientação do professor Dr. Andreas S.L. Mendez, com financiamento da CAPES. O autor recebeu bolsa da CAPES.

Dedico este trabalho ao meu avô materno, Matheus Bilhalva Castro, *in memoriam*, que mesmo sem entender direito o quanto eu ainda estudava, sempre me deu apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar pelo melhor caminho, não me deixando perder a fé, e mantendo-me persistente para seguir adiante.

À prof^a. Dr^a. Amélia Henriques pela orientação, oportunidade, conhecimento transmitido e confiança em meu trabalho.

Ao prof. Dr. Andreas Mendez pela coorientação, confiança e pelas palavras de incentivo e motivação, sempre disposto a ajudar.

À prof. Dr^a Maria do Carmo Pimentel, por me acompanhar no início dessa trajetória, pelos seus ensinamentos em uma área totalmente nova para mim, por sua disposição, motivação e pelo seu jeito alegre de ser.

Ao prof. Dr. Sérgio Bordignon pelas coletas de materiais e conhecimento transmitido.

Ao prof. Dr. Alexandre Ferraz que plantou a sementinha da curiosidade na primeira aula de Farmacognosia e me mostrou o “maravilhoso mundo das plantinhas”.

À minha mãe Nelma, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e paciência, e por estar comigo em todos os momentos. Obrigada por sempre acreditar em mim, entender minha ausência e ser minha parceira até nas coletas de *Cuphea*.

Ao meu pai, *in memoriam*, que sei que és meu anjo de luz e guia.

Ao meu noivo Juliano, por todo amor, carinho, amizade e principalmente pela paciência e companheirismo. És meu parceiro e cúmplice de todos os momentos, e foste fundamental na trajetória final desse doutorado.

À minha sogra Margarida Antônia, pela amizade, apoio e ajuda na coleta de materiais.

À minha família e amigos, pelo apoio e amizade.

À minha amiga Lidiane, pela amizade, apoio, incentivo, carinho e principalmente por ter compartilhado comigo o início do projeto com a *Cuphea*, na época na UNIPAMPA.

Aos colegas e professores do laboratório de Farmacognosia, pela troca de conhecimento, palavras de incentivo e momentos de descontração. Obrigada Bruno, Dejaní, Elen, Juliana Andrade, Letícia Danielli, Letícia Zmuda, Luciana, Maíra, Maria Helena, Maria Júlia, Marina, Melissa, Paula, Thamires e Vanessa. Em especial, à minha amiga e colega Mariana Koetz que esteve comigo desde o início desse trabalho, por todo apoio, amizade, companheirismo e troca de conhecimento, sempre disposta a ouvir e ajudar. À minha amiga Angelica Signor que também acompanhou o início desse trabalho, obrigada pela parceria de sempre, amizade, conversas e companhia nos experimentos aos finais de semana. Às minhas “colegas” Krissie e

Betina que se tornaram grandes amigas ao longo dessa caminhada, obrigada pela amizade, apoio e parceria nos últimos experimentos. À amiga Natally Toson, pela amizade, colaboração e ajuda nos ensaios enzimáticos na Bioquímica, obrigada pelo apoio, incentivo e companhia nas lutas por uma educação pública de qualidade.

Ao PPGCF pela infraestrutura e empenho em manter a excelência no ensino, em especial às secretárias Liane e Valência pela prestatividade e dedicação contínua.

À Capes, pela bolsa de estudos durante o período do doutorado.

Às políticas de inclusão, as quais faço parte desde a graduação, como bolsista pelo PROUNI. Eu não estaria onde estou hoje se a primeira porta não fosse aberta.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Cuphea* (Lythraceae) compreende aproximadamente 108 espécies identificadas no Brasil. Vários estudos mostraram que *Cuphea* spp. têm potencial para atuar principalmente como antimicrobiano, anti-inflamatório, diurético, anti-hipertensivo e antitumoral. Investigações fitoquímicas indicaram a presença majoritária de compostos polifenólicos. O presente trabalho teve como objetivo investigar a composição química de quatro espécies de *Cuphea* encontradas no Rio Grande do Sul, avaliar a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), *in vitro*, otimizar o método extrativo e validar o método para quantificação da miquelianina em *C. glutinosa*. Por fim, avaliar a atividade anti-inflamatória, *in vitro*, com a atividade antiquimiotóxica das espécies de *Cuphea*, e investigar o potencial anti-inflamatório da miquelianina, *in vivo*, em modelo *zebrafish*. As análises químicas dos compostos foram realizadas por UHPLC-MS usando ESI-Q-TOF. Os ensaios de inibição da ECA foram determinados com base no método descrito por Tabatabei com algumas modificações, na concentração de 100 ng/mL e os valores foram determinados por experimentos em triplicata. As condições ótimas para a extração de miquelianina das folhas de *C. glutinosa* foram determinadas utilizando um planejamento fatorial fracionário (PFF) e um planejamento composto central (PCC). O método por UPLC-PDA foi validado, seguindo as diretrizes atuais. A atividade anti-inflamatória, *in vitro*, foi avaliada pela capacidade de *C. calophylla*, *C. carthagenensis*, *C. glutinosa*, *C. racemosa*, e dos compostos isolados: miquelianina, miricitrina, além do controle positivo indometacina (em concentrações de 0,1 a 10 µg/mL) em inibir a migração de leucócitos pelo método de Boyden. Para atividade anti-inflamatória, *in vivo*, o indutor inflamatório (LPS) foi injetado no *zebrafish* por via intraperitoneal e após seis horas, nos grupos controle (PBS-negativo e dexametasona-positiva) e miquelianina foram injetadas as concentrações de 2,5, 7,5 e 15 mg/kg. Os grupos foram mantidos em aquários separados e após 24 horas, os animais foram sacrificados, dissecados e o cérebro congelado (-80°C). Utilizando o homogenato cerebral, a modulação neuro-inflamatória foi avaliada (kits ELISA IL-1β e TNF-α). Os resultados mostraram 26 compostos polifenólicos, principalmente derivados de quercetina, miricetina e canferol. Desses compostos, dez são descritos no gênero pela primeira vez. A inibição da atividade da ECA apresentou como principais resultados: miquelianina 32,41%, *C. glutinosa* (31,66%), *C. carthagenensis* (26,12%) e *C.*

calophylla (23,81%). Os resultados indicaram *C. glutinosa* como a espécie mais promissora. Assim sendo, a espécie teve a obtenção do seu extrato otimizado com os seguintes parâmetros: planta:solvente 1:60 (m/v), porcentagem de solvente etanol 38%, tempo de 60 minutos, cinco extrações e tamanho de partícula $\leq 180 \mu\text{m}$. O método apresentou excelente seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária abaixo de 2,18 e 1,40%, respectivamente) e acurácia (recuperação média de 90,6%). O conteúdo médio de miquelianina em *C. glutinosa* foi de 1,03%. A capacidade dos extratos hidroalcoólicos das espécies de *Cuphea*, miquelianina e miricitrina, de inibir a migração de leucócitos, foi estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). A inibição percentual variou de 23,5 a 100% para as amostras, enquanto a indometacina (controle positivo) inibiu 81,17%, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Para todas as amostras, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, o efeito antiqumiotáxico foi significativamente maior ($p < 0,001$), com porcentagens de inibição de 61,2, 62,3, 70,0, 76,0, 100 e 100% para *C. carthagenensis*, *C. racemosa*, *C. glutinosa*, miricitrina, *C. calophylla* e miquelianina, respectivamente. Em resposta ao modelo de neuro-inflamação, a miquelianina apresentou comportamento semelhante ao grupo controle (PBS), não demonstrando diferença significativa nas concentrações testadas. Resumidamente, os resultados obtidos sugerem que o potencial inibidor da ECA seja aumentado pela presença da miquelianina, além das interações entre os diferentes fitoconstituintes presentes no extrato. Além disso, observou-se que a otimização do método extrativo nas folhas de *C. glutinosa* aumentou a concentração de miquelianina no extrato bruto e o método foi validado de acordo com a legislação vigente. Com relação à inibição da inflamação, as amostras apresentaram efeito significativamente antiqumiotáxico, porém a miquelianina não inibiu a neuro-inflamação, *in vivo*, no modelo *zebrafish*, nas doses testadas. Portanto, o gênero *Cuphea* apresentou importância como agente anti-hipertensivo, corroborando com o uso popular, contudo novos ensaios com diferentes concentrações devem ser realizados em modelos experimentais, *in vivo*.

Palavras-chave: *Cuphea*, compostos fenólicos, fitoquímica, enzima conversora de angiotensina, miquelianina, ultrassom, otimização de extratos, validação por UPLC, anti-inflamatório, *zebrafish*.

ABSTRACT

Cuphea genus (Lythraceae) comprises approximately 108 identified species in Brazil. Several studies have shown that *Cuphea* spp. have the potential to act mainly as antimicrobial, anti-inflammatory, diuretic, anti-hypertensive and antitumor. Phytochemical investigations indicated the majority presence of polyphenolic compounds. Present work aimed to investigate the chemical composition of four *Cuphea* species found in Rio Grande do Sul, to assess the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition, *in vitro*, besides optimize the extractive method and validate method for the quantification of the miquelianin in *C. glutinosa*. Lastly to evaluate the anti-inflammatory activity, *in vitro*, with the antichemotactic activity of the *Cuphea* species, and investigate the anti-inflammatory potential of the miquelianin, *in vivo*, in *zebrafish* model. The chemical analyses of the compounds were performed by UHPLC-MS using ESI-Q-TOF. The ACE inhibition assays were determined based on the method described by Tabatabei with some modifications, at concentration of 100 ng/mL and values were determined by triplicate experiments. The optimum conditions for the extraction of miquelianin from leaves of *C. glutinosa* were determined using a fractional factorial design (FFD) and a central composite design (CCD). An UPLC-PDA was validated method, following the guidelines current. The anti-inflammatory activity, *in vitro*, was assessed by ability of *C. calophylla*, *C. carthagenensis*, *C. glutinosa*, *C. racemosa*, and isolated compounds: miquelianin, myricitrin, besides the positive control indomethacin (at concentrations from 0.1 to 10 µg/mL) to inhibit leukocyte migration was assessed by the Boyden method. For anti-inflammatory activity, *in vivo*, inflammatory inducer (LPS) was injected in *zebrafish* intraperitoneally and after six hours, the control groups (PBS-negative and dexamethasone-positive) and miquelianin samples were injected at concentrations of 2.5, 7.5 and 15 mg/kg. The groups were kept in separate aquariums and after 24 hours, the animals were euthanized, dissected and the brains were freezed (at -80°C). Using brain homogenate, the neuroinflammatory modulation was evaluated (IL-1 β and TNF- α ELISA kits). The results showed twenty-six polyphenolic compounds, mostly derived from quercetin, myricetin and kaempferol. Of these compounds, ten are described in the genus for the first time. The inhibition of ACE activity presented as main results: miquelianin 32.41%, *C. glutinosa* (31.66%), *C. carthagenensis* (26.12%) and *C. calophylla* (23.81%). The results indicated *C. glutinosa* as the most promising species.

Therefore, the species had the obtaining of the your optimized extract, with the following parameters: plant:solvent 1:60 (w/v), percentage solvent 38% ethanol, 60 min time, five extractions and particle size $\leq 180 \mu\text{m}$. The method showed excellent selectivity, linearity, precision (repeatability and intermediate precision were below 2.18 and 1.40%, respectively) and accuracy (mean recovery 90.6%). The average content of miquelianin in the *C. glutinosa* was 1.03%. The ability of the hydroalcoholic extracts of *Cuphea* species, miquelianin and myricitrin to inhibit leukocyte migration, exerted statistically significant in relation to the negative control ($p < 0.05$). Percentage inhibition varied from 23.5 to 100% for the samples, whereas indomethacin (positive control) inhibited 81.17%, at the concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$. In the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ all samples showed a significantly higher antichemotactic effect ($p < 0.001$), with inhibition percentages of 61.2, 62.3, 70.0, 76.0, 100 and 100% for *C. carthagenensis*, *C. racemosa*, *C. glutinosa*, myricitrin, *C. calophylla* and miquelianin, respectively. In response to neuroinflammation model the miquelianin presented similar behavior to the control group (PBS), showing no significant difference in the tested concentrations. Briefly, the achieved results suggest that the ACE inhibitor potential may be increased by the miquelianin presence, besides the interactions between the different phytoconstituent present in the crude extract. Moreover, was observed that the optimization of the extractive method in the leaves of *C. glutinosa* increased the concentration of miquelianin in the crude extract and the method was validated according to the current legislation. Regarding the inhibition of inflammation, the samples showed a significantly antichemotactic effect, however the miquelianin, did not inhibit the neuroinflammation in *zebrafish* model, at the doses tested. Therefore, the *Cuphea* genus presented importance as antihypertensive agent, corroborating with popular usage, and new assays with different concentrations should be performed in experimental models, *in vivo*.

Keywords: *Cuphea*, phenolic compounds, phytochemistry, angiotensin-converting enzyme, miquelianin, ultrasound-assisted, extract optimization, UPLC-validation, anti-inflammatory, zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

7 DISCUSSÃO GERAL

Figura 7.1 Perfis cromatográficos por CLAE e o composto majoritário de cada espécie. (a) *C. calophylla* e a estrutura da miricitrina. (b) *C. carthagenensis* e a estrutura da quercetina-3-sulfato. (c) *C. glutinosa* e a estrutura da miquelianina. (d) *C. racemosa* e a estrutura do kaempferol-3-glicuronídeo 125

Figura 7.2 Gráfico com as respostas das interações dos efeitos analisados para a otimização do método extrativo 126

Figura 7.3 Gráfico com a resposta otimizada fornecida pelo software estatístico Minitab®17 127

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 OBJETIVOS.....	25
OBJETIVO GERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1.....	29
The genus <i>Cuphea</i> - A review on its polyphenols and pre-clinical studies	29
4 CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2.....	83
Polyphenols composition from leaves of <i>Cuphea</i> spp. and inhibitor potential, <i>in vitro</i> , of angiotensin i-converting enzyme (ACE).....	83
5 CAPÍTULO 3 – MANUSCRITO 3.....	95
Ultrasound-assisted extraction optimization and validation of ultra-performance liquid chromatographic method for the quantification of miquelianin in leaf extracts from <i>Cuphea glutinosa</i>	95
6 CAPÍTULO 4– MANUSCRITO 4.....	109
Atividade anti-quimiotóxica <i>in vitro</i> de <i>Cuphea</i> spp. e atividade anti-inflamatória em modelo experimental Zebrafish	109
7 DISCUSSÃO GERAL	121
8 CONCLUSÕES	129
9 REFERÊNCIAS	133

A utilização de produtos naturais como alternativa terapêutica foi descrita ao longo da história como forma de poções, remédios e medicamentos tradicionais com muitos desses produtos naturais bioativos ainda não identificados (Dias, Urban, Roessner, 2012; Atanasov et al., 2015). Os produtos naturais foram a fonte mais promissora de obtenção de possíveis fármacos e retratam uma diversidade estrutural única em comparação com os padrões químicos, apresentando potencialidade para a descoberta de novos compostos. (Dias, Urban, Roessner, 2012; Bauer, Brönstrup, 2014; Atanasov et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). Além disso, estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são derivados de fontes naturais (Dutra et al., 2016).

Presume-se que apenas uma pequena parcela da biodiversidade mundial (5–10%), tenha sido explorada para a bioatividade até o momento (Braga et al., 2013). O Brasil, contempla a maior biodiversidade do planeta, com números que ultrapassam 55.000 espécies, correspondendo a 22% das espécies existentes no mundo (Carvalho et al., 2014). As plantas medicinais e seus derivados representam os principais recursos terapêuticos para a medicina tradicional e complementar, utilizadas há anos pela população brasileira nas práticas populares, medicina tradicional e programas públicos de fitoterapia (Gonçalves, Gonçalves, Buffon, 2017).

Segundo Booi, Punt e Hoen (2003), a família Lythraceae contempla em torno de 22 gêneros, com destaque para *Cuphea*, além deste ter uma ampla distribuição geográfica e abundante, presente principalmente na região das Américas. Há relatos de que o gênero contempla aproximadamente 260 espécies de plantas herbáceas perenes e pequenos arbustos (Graham et al., 2016). As espécies ocorrem em todo o continente americano, sendo frequentemente encontradas em terrenos degradados (Graham, Freudenstein, Luker, 2006; Zago et al., 2009). No Brasil são listadas 104 espécies, 3 subespécies e 10 variedades nativas e, 13 espécies distribuídas no Rio Grande do Sul (Cavalcanti, Graham, 2015).

O gênero *Cuphea* apresenta componentes químicos pertencentes às classes de flavonoides, terpenos, taninos e ácidos graxos (González et al., 1994; Santos, Salatino, Salatino, 1995; Chen et al., 1999; Krepsky et al., 2012). Entre os flavonoides, prevalentemente ocorrem derivados de quercetina (Santos et al., 2018). Lusa e Biasi (2011) relatam para as partes floridas de *C. carthagenensis* a presença de taninos condensados, proantocianidinas, esteroides e flavonoides, em suas partes aéreas triterpenos, esteroides, ácidos graxos, carboidratos e quercetina-S-sulfato. Para a

espécie *C. wrightii* triterpenos e flavonoides glicosídeos (Lusa, Biasi, 2011). Na espécie *C. hyssopifolia*, diterpenos e flavonoides foram isolados a partir de extrato metanólico e frações de acetato de etila (Serna et al., 2011). Além de relatos da presença de taninos hidrolisáveis, incluindo elagitaninos (Chen et al., 1999; Braga et al., 2000; Krepsky et al., 2010).

Cuphea sp. é conhecido popularmente no Brasil como “sete-sangrias”, muito usada nos estados da região sul brasileira. Estas espécies têm chamado atenção da comunidade científica para o uso popular no tratamento da pressão arterial, aterosclerose e distúrbios circulatórios (Barboza et al., 2016). Dentre as diversas plantas utilizadas para fins terapêuticos, as espécies do gênero *Cuphea* são usadas popularmente principalmente como anti-hipertensivo, diurético, cardioprotetor, antimicrobiano, gastroprotetor e anti-inflamatório (Goleniowski et al., 2006; Bolson et al., 2015; Madureira, Pereira, Pintado, 2015; Yazbek, et al., 2019).

Estudos populacionais indicam que a hipertensão, um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, atinge 31,3 milhões de brasileiros com idade superior a 18 anos, o correspondente a 21,4% da população, proporção esta que se eleva com o avanço da idade média populacional (Oliveira, 2014). Outro levantamento mostra que cerca de 50% da população do Rio Grande do Sul possui pelo menos uma doença crônica não transmissível (DCNT), sendo que a hipertensão acomete 2,1 milhões de gaúchos acima de 18 anos, correspondendo a cerca de 24,9% da população (Oliveira, 2014).

A hipertensão pode ser tratada com vários tipos de medicamentos, incluindo diuréticos, bloqueadores β -adrenoreceptores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos canais de cálcio, bloqueadores dos receptores adrenérgicos R, vasodilatadores e agentes de ação central (Perez, Musini, 2008). Os inibidores da ECA bloqueiam a formação de angiotensina II, que normalmente faz com que os vasos sanguíneos se estreitem, aumentando assim a pressão sanguínea. Para pacientes com hipertensão grave ou moderada, é necessário usar fármacos para reduzir a pressão arterial a uma faixa saudável (Chen et al., 2009). Nesse contexto, as plantas medicinais seriam úteis como agentes terapêuticos complementares.

Na avaliação da atividade anti-hipertensiva desse gênero, apenas a espécie *C. carthagenensis* (concentrações de 0,33 mg/mL) apresentou 50% da taxa de inibição da ECA (Braga et al., 2000). Porém, em outro estudo Braga e colaboradores (2007), analisaram quarenta e quatro plantas utilizadas no Brasil como anti-hipertensivas e/ou

diuréticas. Nesse estudo, as partes aéreas de *C. carthagenensis* foram avaliadas em uma concentração de 0,1 mg/mL, e foi incapaz de inibir a ECA, apresentando apenas $9,6 \pm 8,5\%$ de inibição.

Em investigação de extratos e frações de *Cuphea carthagenensis*, Schuldt e colaboradores (2000) observaram que a fração obtida com butanol induziu o relaxamento da aorta torácica de rato por dois mecanismos: um componente de ação dependente do endotélio, que claramente depende da via óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclica (cGMP) e pode ser atribuído pelo menos em parte às propriedades de eliminação de radicais livres, e um componente de ação independente do endotélio que se torna evidente em doses mais altas ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$). Corroborando com este estudo Krepsky e colaboradores (2012) avaliaram o conteúdo fenólico total e atividade vasodilatadora *in vitro* de *C. carthagenensis* indicando que há a participação de flavonoides, proantocianidinas e taninos no efeito vasorrelaxante apontando efeitos sinérgicos entre esses constituintes no extrato etanólico.

Recentemente uma fração solúvel em etanol de *C. carthagenensis* foi avaliada quanto a possíveis efeitos cardioprotetores utilizando ratas hipertensas ovariectomizadas. A fração foi administrada por via oral nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, diariamente, por 28 dias e enalapril (15 mg/kg) foi utilizado como fármaco anti-hipertensivo padrão. Durante as duas primeiras semanas, os animais começaram a mostrar sinais de diminuição da excreção urinária. No entanto, de uma maneira diferente do que com o enalapril, a fração de *C. carthagenensis* induziu uma importante resposta protetora cardiorrenal, preservando a função renal e prevenindo a elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos ovariectomizados hipertensos. Além disso, o tratamento prolongado recuperou a reatividade vascular mesentérica em todas as doses utilizadas (Schaedler, et al., 2018).

Outro fato relevante é o amplo uso relacionado a efeitos anti-inflamatórios de espécies do gênero *Cuphea*. Atehortúa e colaboradores (2018) testaram efeitos antiinflamatórios e citoprotetores de extratos hidroalcoólicos de *C. calophylla*, *T. kingii* e *P. spiralis* os quais inibiram os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA). *C. calophylla*, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, reduziu em 26,20% os níveis de EROs e 16,55% de malondialdeído. Quanto a inibição da atividade da lipoxigenase, *C. calophylla*, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, inibiu 79,00 % e em relação a inibição da ciclo-oxigenase (COX), para COX-1 a inibição foi de

48,40 % e de 63,80 % para COX-2, sendo o mais potente dos extratos quanto a inibição da COX-2 (Atehortúa et al., 2018).

A obtenção de compostos pode ser feita de diversas maneiras e cada método possui variáveis de processo que podem influenciar na extração de determinados compostos ou grupo de compostos de interesse, principalmente quando se procura associar a atividades biológicas. Por isso, é importante estabelecer as condições experimentais que possibilitem uma extração seletiva e com boa recuperação dos compostos de interesse (Oliveira, 2014). Para isso, o uso de delineamento experimental para avaliar e otimizar processos de extração possibilita a obtenção de informações de máximo aproveitamento, com menor número de experimentos, minimizando assim os custos e maximizando as respostas desejadas.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica estatística útil para a construção de um modelo empírico, empregando as variáveis mais importantes e seus efeitos (Erbay, Icier, 2009; Yang et al., 2009). Contudo, além do delineamento experimental, o desenvolvimento e a validação de um método analítico são parte importante do controle de qualidade do material da planta, para garantir a eficácia e a segurança dos resultados (Landim, Feitoza, Costa, 2013). A validação de um procedimento bioanalítico demonstra sua adequação à finalidade pretendida, com recomendações de ensaios bioanalíticos para quantificação de medicamentos químicos e biológicos e sua aplicação no estudo de análise de amostras (ICH-M10, 2019).

Considerando o potencial pouco explorado de espécies pertencentes ao gênero *Cuphea* e, a importância do gênero como fonte de compostos biologicamente ativos, este trabalho teve como objetivo geral o estudo químico de quatro espécies de *Cuphea* encontradas no Estado do Rio Grande do Sul, determinar as atividades anti-hipertensiva e anti-inflamatória das espécies, bem como otimizar o método extrativo e validar da metodologia analítica da espécie mais abundante e promissora.

OBJETIVO GERAL

Estudar extratos obtidos das folhas de espécies de *Cuphea*, coletadas no Rio Grande do Sul, com relatos de atividade anti-hipertensiva, capazes de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina, identificar os compostos ativos, otimizar o método extrativo e validar a metodologia da espécie com maior relevância.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a literatura quanto ao perfil químico e farmacológico do gênero *Cuphea*;
- Avaliar a atividade anti-hipertensiva de extratos de folhas de espécies de *Cuphea* e compostos isolados pelo ensaio de inibição da ECA;
- Identificar através de metodologia por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de massas, os compostos encontrados nos extratos relacionados à atividade;
- Otimizar o método de extração da espécie mais abundante por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE), para padronizar a espécie mais abundante e promissora;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de espécies de *Cuphea* e compostos isolados pelo ensaio antiquimiotáxico;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da miquelianina em modelo *zebrafish*.

3 CAPÍTULO 1

REVISÃO DO TEMA – MANUSCRITO 1

Cuphea genus - A comprehensive review on its chemical composition and preclinical studies

O texto do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 33-82, foi suprimido por referir-se ao manuscrito submetido ao periódico *Journal of Natural Products*. Trata-se de uma revisão aprofundada sobre o gênero *Cuphea*, revisando pela primeira vez os compostos fenólicos presentes no gênero, métodos fitoquímicos e estudos pré-clínicos descritos na literatura.

4 CAPÍTULO 2
MANUSCRITO 2

Polyphenols composition from leaves of *Cuphea* spp. and inhibitor potential, *in vitro*, of angiotensin i-converting enzyme (ACE)

Artigo publicado no periódico Journal of Ethnopharmacology

DOI: 10.1016/j.jep.2020.112781

O texto do capítulo 2, trata-se do artigo científico recentemente publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology*, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo entre as páginas 87-93.

Santos, Marí C.; Toson, Natally S.B.; Pimentel, Maria C.B.; Bordignon, Sérgio A.L.; Mendez, Andreas S.L.; Henriques, Amélia T. Polyphenols composition from leaves of *Cuphea* spp. and inhibitor potential, *in vitro*, of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 255, 2020. doi: 10.1016/j.jep.2020.112781

5 CAPÍTULO 3

MANUSCRITO 3

Ultrasound-assisted extraction optimization and validation of ultra-performance liquid chromatographic method for the quantification of miquelianin in *Cuphea glutinosa* leaves

Artigo publicado no periódico Talanta

DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120988

O texto do capítulo 3, trata-se do artigo científico recentemente publicado no periódico Talanta, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo entre as páginas 99-107.

Santos, Marí C.; Mariana Koetz; Mendez, Andreas S.L.; Henriques, Amélia T. Ultrasound-assisted extraction optimization and validation of ultra-performance liquid chromatographic method for the quantification of miquelianin in *Cuphea glutinosa* leaves. Talanta, v. 216, 2020. doi: 10.1016/j.talanta.2020.120988

O texto do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas entre 113-119, foi suprimido por tratar-se de parte do manuscrito que será escrito para publicação em periódico científico. Refere-se à investigação de espécies de *Cuphea* nativas do Rio Grande do Sul e compostos isolados, quanto a atividade anti-quimiotáxica, *in vitro*, pelo método da câmara de Boyden e potencial anti-inflamatório da miquelianina, *in vivo*, em modelo *zebrafish*.

Dentre os principais recursos terapêuticos da medicina tradicional e complementar, podem ser destacadas às plantas medicinais e seus derivados, utilizadas tanto nas práticas populares, quanto na medicina tradicional e nos programas públicos de fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2006, cerca de 85% da população mundial utilizava plantas para tratamento de saúde, embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo (Gonçalves, Gonçalves e Buffon, 2017).

A rica biodiversidade brasileira é acompanhada pela aceitação conjunta das plantas medicinais e do conhecimento tradicional da população brasileira. Conseqüentemente, o Brasil vem alterando seus padrões legais de fitoterápicos, com base na harmonização com as exigências praticadas internacionalmente e as características do mercado brasileiro, facilitando o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos à população brasileira (Carvalho et al., 2014). As plantas medicinais anti-hipertensivas tradicionalmente utilizadas, mediante a sua ação anti-hipertensiva pela inibição da ECA, que através de diferentes mecanismos inibe o aumento do volume circulante e da pressão arterial. Para que qualquer medicação seja bem sucedida, uma compreensão clara da eficácia, segurança a longo prazo, vias de uso, dosagem e modo de ação são essenciais (Rawat, Singh, Kumar, 2016).

O interesse reemergente em produtos naturais como fontes de descoberta de fármacos inovadores, pode se beneficiar das abordagens modernas da química e bioinformática. Embora as técnicas avançadas de síntese química em produtos naturais tenham se tornado prática comum, há um crescente interesse em métodos de projeto molecular computacional aplicados a fragmentos derivados de produtos naturais. Desta forma, os produtos naturais, embora frequentemente contenham grupos funcionais potencialmente reativos ou indesejáveis e fragmentos de subestrutura, podem, de fato, ser adequados para modulação seletiva de alvo (Rodrigues et al., 2016).

Portanto, uma pesquisa detalhada é necessária para estabelecer a segurança e a eficácia das práticas, bem como das plantas que são usadas em sistemas convencionais de medicina. Independentemente das incertezas prevalentes sobre segurança, eficácia e custo-benefício dos medicamentos complementares, o uso de plantas da medicina convencional, com evidências racionais de eficiência e segurança certamente terá benefícios de saúde, sociais e econômicos (Rawat, Singh, Kumar, 2016).

Nesse contexto, é muito importante saber a composição química das espécies estudadas, bem como a maneira de melhor extrair os compostos de interesse, que levam aos efeitos farmacológicos esperados. O método de extração deve ser o mais simples possível, econômico, de fácil reprodução em escalas maiores, e de acordo com o material a ser analisado. No presente trabalho, o uso de ultrassom, como método extrativo, demonstrou grande aplicabilidade, diminuindo as desvantagens dos métodos convencionais em termos de redução do tempo de processamento, solvente e energia utilizados. Esta técnica resulta em alta reprodutibilidade e manipulações simplificadas levando à obtenção de um produto final de maneira econômica e com alta pureza (Pingret, Tixier, Chemat, 2013).

Alguns gêneros da família Lythraceae como *Cuphea* e *Diplusodon* apresentam importantes metabólitos secundários, contudo flavonoides mais complexos como C-glicoflavonas e flavonóis metoxilados (rhamnetina e isoramnetina) aparecem apenas em *Cuphea* (Salatino et al., 2000). A química do gênero *Cuphea* é amplamente variável, apresentando em sua composição, predominantemente flavonoides, em sua maioria compostos 3-O-glicosídeos e flavonas, além de alguns derivados de glicosídeos e galactose (Santos, Salatino, Salatino, 1995; Krepsky et al., 2012).

Dentre as espécies mais abundantes no estado, destacam-se *C. carthagenensis*, *C. racemosa* e *C. glutinosa*, sendo a última considerada uma espécie muito comum, encontrada em campos de secos a úmidos, pastagens, borda de matas e margem de estradas. Considerando a ampla extensão de ocorrência e abundância no estado do Rio Grande do Sul, as espécies de *Cuphea* são amplamente distribuídas em diferentes regiões do estado (Facco, 2015). Na figura 7.1 é possível observar o perfil cromatográfico por CLAE das quatro principais espécies encontradas no estado, bem como o composto majoritário de cada espécie.

O grupo dos flavonóis, são os principais flavonoides pertencentes nas espécies estudadas. Dentre eles a quercetina e seus derivados estão na grande maioria ocorrendo principalmente como glicosídeos, além de outros derivados da quercetina identificados. Seus substituintes ligados alteram a atividade bioquímica e a biodisponibilidade das moléculas quando comparadas à aglicona. Os O-glicosídeos da quercetina apresentam pelo menos uma ligação O-glicosídica, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal (Materska, 2008).

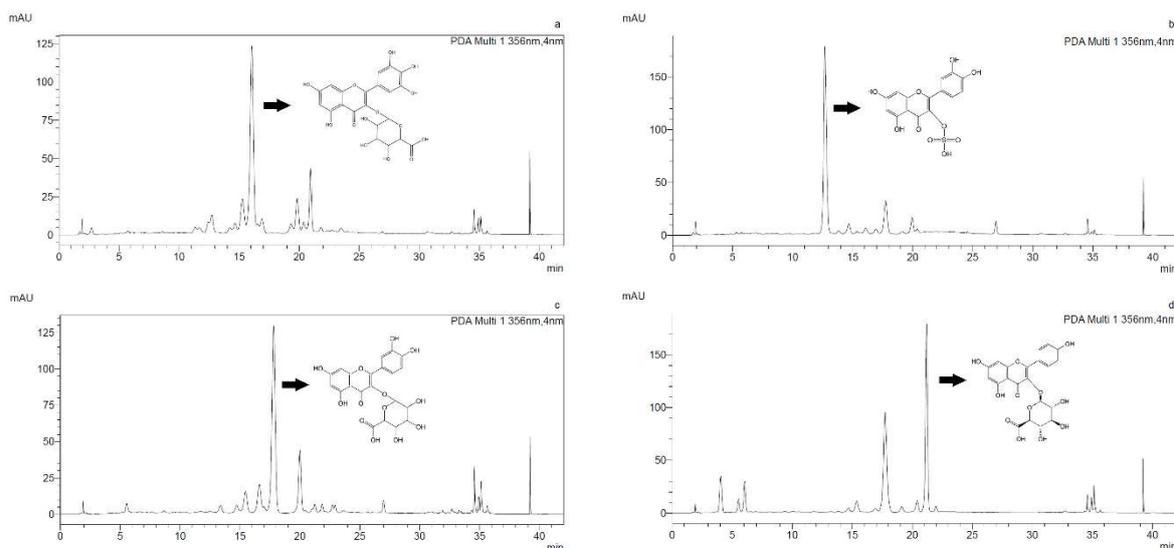


Figura 7.1 Perfis cromatográficos por CLAE e o composto majoritário de cada espécie. (a) *C. calophylla* e a estrutura da miricitrina. (b) *C. carthagenensis* e a estrutura da quercetina-3-sulfato. (c) *C. glutinosa* e a estrutura da miquelianina. (d) *C. racemosa* e a estrutura do kaempferol-3-glicuronídeo

A quercetina é uma molécula versátil com muitas propriedades farmacológicas, incluindo antioxidante, neurológica, antiviral, anticancerígena, cardiovascular, antimicrobiana, anti-inflamatória, hepatoprotetora, protetora do sistema reprodutor e agente antiobesidade (Maalik et al., 2014). Em ensaio agudo utilizando quercetina em adultos normotensos e hipertensos, observou-se redução da pressão arterial sistólica, diastólica e média (Larson et al., 2012).

No ensaio *in vitro* realizado os extratos bruto, miquelianina, miricitrina e ácido 3-O-feruloilquínico foram testados quando a inibição da ECA, e a miquelianina apresentou os melhores resultados, seguido dos extratos de *C. glutinosa*, *C. carthagenensis* e *C. calophylla*. A primeira espécie tem como composto majoritário a miquelianina. Por outro lado, de acordo com Krepsky et al. (2010), o derivado de quercetina, quercetina-3-sulfato, isolado e identificado da espécie *C. carthagenensis*, comumente citada como diurética e hipotensora, não apresentou significância na atividade vasorelaxante avaliada.

Contudo, o flavonol quercetina é dotado de um efeito cardioprotetor contra o dano isquêmico miocárdico, inibe a atividade da enzima conversora da angiotensina, melhora o relaxamento vascular e diminui o estresse oxidativo e a expressão gênica (Grande et al., 2016). Coerentemente, em extratos de *C. carthagenensis* foi possível observar diminuição da pressão arterial em doses a partir de 30mg/kg. Assim,

acredita-se que, *in vivo*, a dose administrada do extrato e dos compostos não tenha sido suficiente para observar a atividade esperada (Schaedler et al., 2018).

No processo extrativo os parâmetros envolvidos devem ser cuidadosamente avaliados. Nesse contexto, desenhos experimentais constituem ferramentas estatísticas efetivas para o planejamento dos experimentos, pois há a definição dos fatores que serão avaliados e uma ou mais respostas são medidas (NIST, 2013). A avaliação e otimização dos processos de extração possibilita a obtenção de informações de máximo aproveitamento, através de menos experimentos, minimizando assim os custos e maximizando as respostas desejadas (Erbay, Icier, 2009; Yang et al., 2009). Por isso, a otimização do processo é de fundamental, preconizando não apenas maior rendimento, mas minimizar possíveis interferentes e degradação da amostra e/ou compostos.

Através da análise das respostas foi possível observar as influências de acordo com cada fator individual ou interagindo, considerando-se a importância na escolha de cada um dos fatores (Figura 7.2). O solvente a ser escolhido é de suma importância, pois conforme os resultados, verificou-se que em maior concentração de água, a área do composto de interesse foi maior. De acordo com Oliveira (2014), o desafio de encontrar um solvente, ou uma mistura de solventes capaz de extrair de uma maneira mais seletiva os constituintes de interesse é primordial.

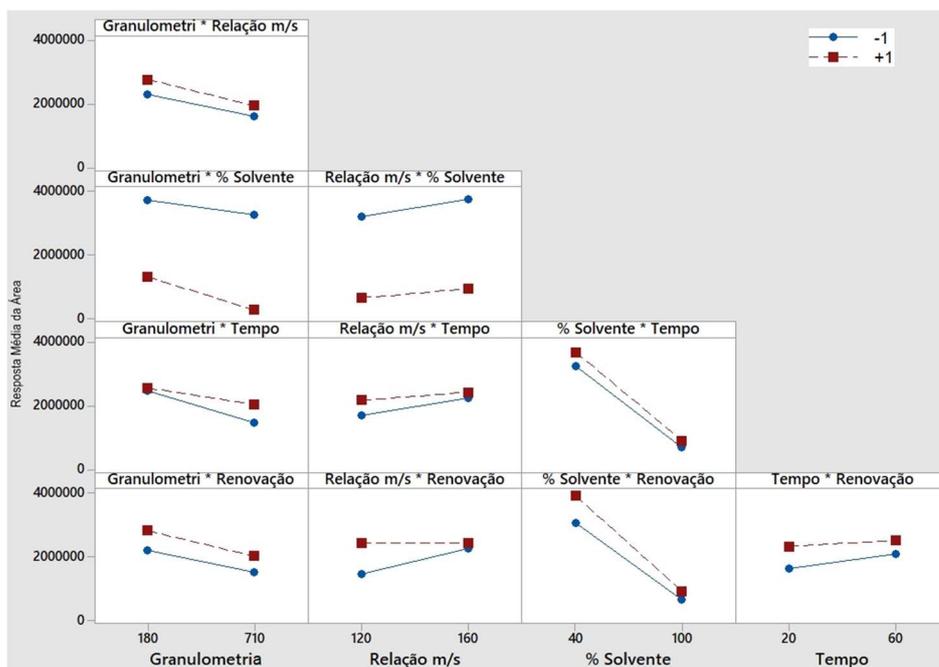


Figura 7.2 Gráfico com as respostas das interações dos efeitos analisados para a otimização do método extrativo

A maior proporção de água, mais renovações e menor granulometria levam a obtenção de áreas maiores na análise cromatográfica, em comparação com os outros fatores testados. Esses resultados demonstram que a granulometria menor favorece a extração, e além disso mais renovações do líquido extrator levam ao esgotamento, possibilitando extrair o(s) composto(s) de interesse em maior abundância, tendo em vista que as áreas dos picos majoritários aumentaram após a inserção desses parâmetros. Corroborando com os resultados, sabe-se que para a extração de flavonoides é comumente usado solventes mais polares (Dias, 2015; Oliveira, 2014; Torres et al., 2018).

O próprio software estatístico Minitab®17 fornece as condições ótimas de extração, que podem ser observadas na Figura 7.3, em vermelho. Após esta etapa foi feita a validação do método extrativo otimizado, que apresentou uma melhora no rendimento da miquelianina, após otimização, em 16,35%.

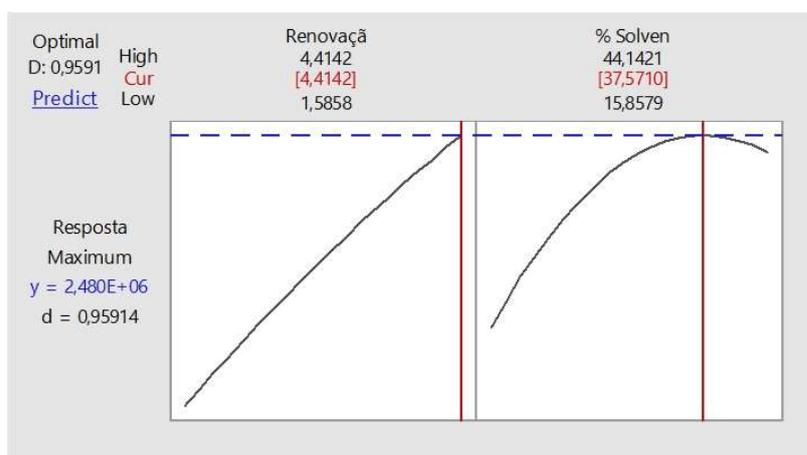


Figura 7.3 Gráfico com a resposta otimizada fornecida pelo software estatístico Minitab®17

Além disso, a validação da metodologia analítica por CLUE, foi submetido aos ensaios, de acordo com as recomendações da RDC 166/17, a curva analítica realizada apresentou coeficiente de determinação (r^2) com valor de 0,9999, com valores de desvio padrão relativo (DPV) menor que 5%. Para verificar o efeito da matriz, a determinação foi realizada por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração, construídas com a substância química de referência (SQR) do analito e com amostras fortificada com a SQR do analito. Os resultados demonstraram que as retas são paralelas, com valor de $p = 0,74$.

Os parâmetros de precisão: repetibilidade e intermediária, exatidão e robustez apresentaram DPV de 2,18%, 1,40%, 1,47% e 0,21%, respectivamente. Em resumo, todos os parâmetros avaliados: especificidade, linearidade, efeito da matriz, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e intermediário), exatidão e robustez, estavam de acordo com as Diretrizes da ICH e a RDC 166/17.

O tratamento de desordens inflamatórias com plantas medicinais e seus compostos isolados é recorrente na medicina popular (Liu et al., 2016). Além da capacidade de eliminação de radicais livres, há evidências de potencial anti-inflamatório em espécies do gênero *Cuphea*. No presente estudo, *C. calophylla*, *C. carthagenensis*, *C. glutinosa*, *C. racemosa*, miquelianina e miricitrina, foram capazes de inibir a migração de leucócitos, principalmente *C. calophylla* e miquelianina que inibiram 100% da migração na concentração de 10 µg/mL. Contudo, nos ensaios *in vivo*, em modelo de neuro-inflamação em *zebrafish*, a miquelianina não inibiu a inflamação nas concentrações testadas (2,5, 7,5 e 15 mg/kg peixe).

Em estudo realizado por Chen, Yang e Lee (2000) a espécie *C. hyssopifolia*, quatro elagitaninos isolados e um flavonol, inibiram a produção de NO induzida por LPS na concentração de 20 mg/mL. Outrossim, conforme Campana et al. (2015), *C. carthagenensis* reduziu significativamente a liberação de TNF- α (inibição >80%), pelas células THP-1 estimuladas por LPS.

Em resumo, o presente estudo indica que o gênero *Cuphea*, apresenta potencial inibidor da ECA, foi possível otimizar o método extrativo nas folhas de *C. glutinosa*, que aumentou a concentração de miquelianina e o método foi validado de acordo com a legislação vigente. No entanto, a inibição da inflamação foi significativamente apenas para o ensaio antiqumiotáxico.

- ✓ Uma revisão aprofundada na literatura, indicou 24 espécies do gênero *Cuphea* com relevância química e/ou terapêutica;
- ✓ Os principais efeitos descritos para o gênero foram potencial antioxidante, antimicrobiano e antitumoral;
- ✓ Foi possível avaliar o perfil fitoquímico de quatro espécies, *C. calophylla*, *C. carthagenensis*, *C. glutinosa* e *C. racemosa*, de diferentes localidades do Rio Grande do Sul;
- ✓ Nas análises por UHPLC-MS, foram propostos 26 compostos polifenóis, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides (na maioria flavonóis);
- ✓ A miquelianina apresentou maior potencial inibidor da ECA, com inibição de 32,41% da enzima;
- ✓ A otimização da extração a partir das folhas de *C. glutinosa* foi definida com extração assistida por ultrassom, nas seguintes condições: tamanho de partícula $\leq 180 \mu\text{m}$, planta:solvente 1:60 (m/v), etanol 38% como solvente, cinco extrações e tempo de 60 minutos;
- ✓ O método analítico foi validado por CLUE, demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa de miquelianina nas folhas de *C. glutinosa*;
- ✓ O teor médio de miquelianina foi de 1,03% no método validado;
- ✓ A concentração de miquelianina, após a otimização e validação do método, teve um aumento de 29,02%, quando comparado ao método não otimizado e validado;
- ✓ A espécie *C. calophylla*, *C. carthagenensis*, *C. glutinosa*, *C. racemosa* e os compostos isolados miquelianina e miricitrina apresentaram significativa inibição da migração de leucócitos, demonstrando *in vitro*, relevante potencial anti-inflamatório.
- ✓ No ensaio, *in vivo*, com modelo de neuro-inflamação em *zebrafish*, não foi possível observar diferença significativa nas concentrações de miquelianina testadas.

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Wenzig, E.M.P., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614.

Atehortúa, A.M.R., Agudelo, L.M., Osorio, E., & Guzmán, O.J.L., 2018. The Traditional Medicinal Plants *Cuphea calophylla*, *Tibouchina kingii*, and *Pseudelephantopus spiralis* Attenuate Inflammatory and Oxidative Mediators. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-11.

Barboza, L. N., Lívero, F. A. dos R., Prando, T. B. L., Ribeiro, R. de C. L., Lourenço, E. L. B., Budel, J. M., & Gasparotto, A., 2016. Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. in New Zealand rabbits fed with cholesterol-rich diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 134-145.

Bauer, A.; Brönstrup, M., 2014. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 35-60.

Bolson, M., Hefler, S. R., Chaves, E.I.D., Gasparotto Junior, A., Cardozo Junior, E. L., 2015. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10.

Booi, M., Punt, W. & Hoen, P.P., 2003. The Northwest European Pollen Flora, 68 LYTHRACEAE. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 123, p. 163-180.

Braga, F.C., Wagner, H., Lombardi, J., Braga, A.O., 2000. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, p. 245-250.

Braga, F.C., Serra, C., Viana Júnior, N., Oliveira, A. Côrtes, S. Lombardi, J., 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 353-358.

Braga, M.E.M., Seabra, I., Dias, A.M.A., De Souza, H.C. Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products. In: Rostagno, M.A. e Prado, J.M. **Natural Product Extraction: Principles and Applications**. In: Cambridge: Ed. Royal Society of Chemistry, 2013, p. 231-284.

Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Diário Oficial da União. 2017.

Campana, P.R.V., Mansur, D.S., Gusman, G.S., Ferreira, D., Teixeira, M.M., Braga, F.C., 2015. Anti-TNF- α activity of brazilian medicinal plants and compounds from *Ouratea semiserrata*. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 1509-1515.

Carvalho, A.C., Ramalho, L.S., Marques, R.F., Perfeito, J.P., 2014. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506.

Cavalcanti, T.B.; Graham, S. *Cuphea* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8735>. Acesso em: 28 Out. 2015

Chen, L.-G., Yen, K.-Y., Yang, L.-L., Hatano, T., Okuda, T., Yoshida, T., 1999. Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D1 and D2, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 307-312.

Chen, Y.-C., Yang, L.-L., Lee, T.J.-F., 2000. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- κ B activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1445-1457.

Chen, Z.Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y.M., Yang, N., Huang, Y., 2009. Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4485-4499.

Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U., 2012. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336.

Dias, J.C.R. Novos métodos de extração de compostos bioativos de verduras. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança, Portugal. 43 p. 2015.

Dutra, R.C., Campos, M.M., Santos, A.R., Calixto, J.B., 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug Discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29.

Erbay, Z., Icier, F., 2009. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 533-541.

Facco, G.M. **Estudo taxonômico do gênero *Cuphea* P. Browne (Lythraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, p. 162, 2015.

Goleniowski, M. E., Bongiovanni, G. A., Palacio, L., Nuñez, C. O., Cantero, J. J., 2006. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 324-341.

Gonçalves, R.N., Gonçalves, J.R.S.N., Buffon, M.C.M., 2017. Plantas medicinais: relacionando conhecimento popular e científico na atenção primária à saúde. **Visão Acadêmica**, v.18, p. 25-65.

González, A., Valencia, E., Expósito, T., Barrera, J., Gupta, M., 1994. Chemical Components of *Cuphea* Species. Carthagenol: A New Triterpene from *C. carthagenensis*. **Planta Medica**, v. 60, p. 592-593.

Graham, S.A., Freudenstein, J.V., Luker, M., 2006. Phylogenetic Study of *Cuphea* (Lythraceae) Based on Morphology and Nuclear rDNA ITS Sequences. **Systematic Botany**, v. 31, p. 764-778.

Graham, S.A., Pinheiro, C.J.G., Murad, A.M., Rech, E.L., Cavalcanti, T.B., Inglis, P.W., 2016. Patterns of fatty acid composition in seed oils of *Cuphea*, with new records from Brazil and Mexico. **Industrial Crops & Products**, v. 87, p. 379-391.

Grande, F., Parisi, O.I., Mordocco, R.A., Rocca, C., Puoci, F., Scrivano, L., Quintieri, A.M., Cantafio, P., Ferla, S., Brancale, A., Saturnino, C., Cerra, M.C., Sinicropi, M.S., Angelone T., 2016. Quercetin derivatives as novel antihypertensive agents: Synthesis and physiological characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 161-170.

ICH, 2005. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2A. **Guideline on validation of analytical procedure: definitions and methodology**. Brussels, Belgium.

ICH-M10, 2019. International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use. **Guideline M10 on bioanalytical method validation**. Draft version. European Medicines Agency. Amsterdam, Netherlands. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf

Krepesky, P.B., Farias, M.R., Côrtes, S.F., Braga, F.C., 2010. Quercetin-3-sulfate: A chemical marker for *Cuphea carthagenensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 125-127.

Krepesky, P.B., Isidório, R.G., de Souza Filho, J.D., Côrtes, S.F., Braga, F.C., 2012. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**, v. 19, p. 953– 957.

Landim, LP., Feitoza, G.S., Costa, J.G.M., 2012. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 58-64.

Larson, A., Witman, M.A., Guo, Y., Ives, S., Richardson, R.S., Bruno, R.S., Jalili, T., Symons, J.D., 2012. Acute, quercetin-induced reductions in blood pressure in hypertensive individuals are not secondary to lower plasma angiotensin-converting enzyme activity or endothelin-1: nitric oxide. **Nutrition Research**, v. 32, p. 557-564.

Liu, B., Guo, Z., Bussmann, R., Li, F., Li, J., Hong, L., Long, C., 2016. Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies in Southwest China: A literature review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 343-350.

Lusa, M.G. & Biasi, L.A., 2011. Estaquia de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (Koehne) Lourteig (Lythraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, p. 52-57.

Maalik, A., Khan, F., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., Atif, M., Karim, S., Altaf, Y., Tariq, I., 2014. Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research September**, v. 13, p. 1561-1566.

Madureira, A. R., Pereira, A., & Pintado, M., 2015. Current state on the development of nanoparticles for use against bacterial gastrointestinal pathogens. Focus on chitosan nanoparticles loaded with phenolic compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 429-439.

Materska, M., 2008. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, p. 407-413.

Nist Sematech. Engineering Statistics e-Handbook, 2013. Disponível em <<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>> Acesso em: 03 set 2018.

Oliveira, F. 4,1 milhões dos gaúchos têm pelo menos uma doença crônica. Agência da Saúde, Ministério da saúde. Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/16006-4-1-milhoes-dos-gauchos-tem-pelo-menos-uma-doenca-cronica> Acesso em: 11 out 2015.

Oliveira, F. 57,4 milhões de brasileiros têm pelo menos uma doença crônica. Agência da Saúde, Ministério da saúde. Brasília, 2014. Disponível em: <http://portal.saude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/15978-57-4-milhoes-de-brasileiros-tem-pelo-menos-uma-doenca-cronica> Acesso em: 11 out 2015.

Oliveira, G.A.R., 2014. Otimização de Processos de Extração de Princípios Ativos de Plantas. **Processos Químicos**, v. 8, p. 33-41.

Perez, M.I. e Musini, V.M., 2008. Pharmacological interventions for hypertensive emergencies: a Cochrane systematic review. **Journal of Human Hypertension**, v. 22, p. 596-607.

Pingret, D., Tixier, A.S.F. & Chemat, F. Ultrasound-assisted Extration. In: Rostagno, M.A. & Prado, J.M. **Natural Product Extraction: Principles and Applications**. 1ed. Cambridge: Ed. Royal Society of Chemistry, 2013, p. 89-112.

Rawat, P., Singh, P.K. & Kumar, V., 2016. Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, p. 107-118.

Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., Schneider, G., 2016. Counting on natural products for drug design. **Nature chemistry**, v. 1, p. 1-11.

Salatino, A., Salatino, M.L.F., Santos, D.Y.A.C., Patrício, M.C.B., 2000. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, Lythraceae and Velloziaceae from “campos rupestres”. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 931-940.

Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F. & Salatino, A., 1995. Flavonoids of Species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, p. 99-103.

Santos, M.C., Farias, L.S., Merlugo, L., de Oliveira, T.V., Barbosa, F.S., Fuentefria, A.M., Henriques, A.T., Garcia, C.V., Mendez, A.S.L., 2018. UPLC-MS for identification

of quercetin derivatives in *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltidl (Lythraceae) and evaluation of antifungal potential. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 14, p. 586-594.

Schaedler, M.I., Palozzi, R.A.C., Tirloni, C.A.S., Silva, A.O., Araújo, V.O., Lourenço, E.L.B., de Souza, L.M., Lívero, F.A.R., Gasparotto Junior, A., 2018. Redox regulation and NO/cGMP plus K⁺ channel activation contributes to cardiorenal protection induced by *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. in ovariectomized hypertensive rats. **Phytomedicine**. v. 51, p. 7-19.

Schuldt, E.Z., Ckless, K., Simas, M.E., Farias, M.R., Ribeiro-Do-Valle, R.M., 2000. Butanolic Fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride Relaxes Rat Thoracic Aorta Through Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 35, p. 234-239.

Serna, J.A.M., Ríos, E.G., Madrigal, D., Cárdenas, J., Salmón M., 2011. SERNA, J.A.M. et al. Constituents of Organic Extracts of *Cuphea hyssopifolia*. **Sociedad Química de México**, v. 55, p. 62-62.

Tabatabei, Z.M., Asoodeh, A., Housaindokht, M.R., Chamani, J., 2013. Purification and biochemical characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) from ostrich lung: The effect of 2,2,2-trifluoroethanol on ACE conformation and activity. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1091-1098.

Torres, D. S., Pereira, E.C.V., Sampaio, P.A., Souza, N.A.C., Ferraz, C.A.A., Oliveira, A.P., Moura, C.A., Almeida, J.R.G.S., Rolim-Neto, P.J., Oliveira-Júnior, R.G., Rolim, L.A., 2018. Influência do método extrativo no teor de flavonoides de *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae) e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 41, p. 743-747.

Yang, L., Jiang, J.G., Li, W.F., Chen, J., Wang, D.Y., Zhu, L., 2009. Optimum extraction Process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 1437-1444.

Yazbek, P. B., Matta, P., Passero, L. F., Santos, G., Braga, S., Assunção, L., Sauini, T., Cassas, F., Garcia, R.J.F., Honda, S., Barreto, E.H.P., Rodrigues, E., 2019. Plants utilized as medicines by residents of Quilombo da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brazil: A participatory survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 1-12.

Zago, A.M., Manfron, M.P., Morel, A.F., Zanetti, G.D., 2009. Morfonatomia do caule de *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltidl. (Lythraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 720-726.