



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
(CIPHARMA)



VALIDAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE ASSOCIAÇÃO DE
ALTA INGESTÃO DE SÓDIO E INFLAMAÇÃO CRÔNICA: EFEITO DO
TRATAMENTO COM A NANOEMULSÃO DE EXTRATO DE *BACCHARIS
DRACUNCULIFOLIA*

André Luciano Lopes

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

2022

André Luciano Lopes

VALIDAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE ASSOCIAÇÃO DE
ALTA INGESTÃO DE SÓDIO E INFLAMAÇÃO CRÔNICA: EFEITO DO
TRATAMENTO COM A NANOEMULSÃO DE EXTRATO DE *BACCHARIS*
DRACUNCULIFOLIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L864v Lopes, Andre Luciano.

Validação de um modelo experimental animal de associação de alta ingestão de sódio e inflamação crônica [manuscrito]: efeito do tratamento com a nanoemulsão de extrato de Baccharis Dracunculifolia. / Andre Luciano Lopes. - 2022.

83 f.: il.: color..

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Aparecida Lima Moura.

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Baccharis dracunculifolia. 2. Sódio. 3. Inflamação. I. Moura, Sandra Aparecida Lima. II. Cardoso, Leonardo Máximo. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 620.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza- SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS
FARMACEUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

André Luciano Lopes

Validação de um modelo experimental animal de associação de alta ingestão de sódio e inflamação crônica: Efeito do tratamento com a nanoemulsão de extrato de Baccharis Dracunculifolia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de novembro de 2022.

Membros da banca

Doutora Sandra Aparecida Lima de Moura - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora Lucíola da Silva Barcelos - Universidade Federal de Minas Gerais
Doutor Guilherme de Paula Costa - Universidade Federal de Ouro Preto

Sandra Aparecida Lima de Moura, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 16/01/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Aparecida Lima de Moura, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/02/2023, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0460104** e o código CRC **758D010A**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.000663/2023-16

SEI nº 0460104

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: - www.ufop.br

Este trabalho foi financiado pelos órgãos citados abaixo:

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PROPPI – Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação da Universidade Federal de Ouro Preto

APICRIM – Grupo de Pesquisa coordenado pela Professora Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

Lista de Siglas

SD	Dieta controle de sódio
HS	Dieta com alta ingestão de sódio
DC	<i>Baccharis dracunculifolia</i>
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
HDL colesterol	High density level – colesterol
LDL colesterol	Light density level – colesterol
IMC	Índice de massa corporal
IL	Interleucina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
NAG	N-Acetyl- β -D-glicosaminidase
MPO	Mieloperoxidase
LCR	Líquido cefalorraquidiano
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
CCA	Centro de Ciência Animal

Lista de tabelas

TABELA 1 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA E PRÓPOLIS VERDE...	19
TABELA 2 - AUTORES DE NANOFORMULAÇÕES COM SUBSTÂNCIAS NATURAIS CONTENDO COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES	21
TABELA 3 - DOSAGEM DE COMPOSTOS FENÓLICOS - AMOSTRA E BRANCO.	28
TABELA 4 - DOSAGEM DE COMPOSTOS FENÓLICOS - CURVA PADRÃO.	28
TABELA 5 - DOSAGEM DE FLAVONÓIDES - AMOSTRA E BRANCO.	29
TABELA 6 - DOSAGEM DE FLAVONÓIDES - CURVA PADRÃO.	29
TABELA 7 - TEOR E QUANTIDADE DE COMPOSTOS NO EXTRATO ETANÓLICO DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA	41
TABELA 8 - PERFIL LIPÍDICO.....	58
TABELA 9 - PERFIL LIPÍDICO (SEGUNDO OS AUTORES).....	60
TABELA 10 - DOSAGEM DE SÓDIO E POTÁSSIO - SORO (MMOL/L).....	61
TABELA 11 - DOSAGEM DE SÓDIO E POTÁSSIO - SORO (SEGUNDO AUTORES - MMOL/L)	61

Lista de Figuras

FIGURA 1 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.	33
FIGURA 2 - MODELOS EXPERIMENTAIS	35
FIGURA 3 - CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS. FONTE: AUTORIA PRÓPRIA.	37
FIGURA 4 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DA NANOFORMULAÇÃO CONTENDO O EXTRATO DE DC.	43
FIGURA 5 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DA NANOFORMULAÇÃO DO PLACEBO.	44
FIGURA 6 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DA NANOFORMULAÇÃO CONTENDO O EXTRATO DE DC.	44
FIGURA 7 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DA NANOFORMULAÇÃO DO PLACEBO.	45
FIGURA 8 - MÉDIA DOS PESOS DOS ANIMAIS E DESVIO PADRÃO DAS MÉDIAS (SEM) AVALIADOS ANTES DO IMPLANTE DE ESPONJA E APÓS 14 DIAS DE TRATAMENTO.	46
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DA ESPONJA ANTES DO IMPLANTE E PÓS-IMPLANTE. GRÁFICO DE PESO ÚMIDO DOS IMPLANTES DE ESPONJAS APÓS RETIRADA NO PERÍODO DE 14 DIAS DE IMPLANTAÇÃO.	47
FIGURA 10 - DOSAGEM DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT).	49
FIGURA 11 - DOSAGEM DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST).	50
FIGURA 12 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS.	51
FIGURA 13 - DOSAGEM DE ALBUMINA.	52
FIGURA 14 - DOSAGEM DE AMILASE.	53
FIGURA 15 - DOSAGEM DE FOSFATASE ALCALINA.	54
FIGURA 16 - DOSAGEM DE CREATININA.	56
FIGURA 17 - DOSAGEM DE URÉIA.	56
FIGURA 18 - DOSAGEM DE GLICOSE.	57
FIGURA 19 - DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL.	59
FIGURA 20 - DOSAGEM DE HDL COLESTEROL.	59
FIGURA 21 - DOSAGEM DE TRIGLICERÍDEOS.	60
FIGURA 24 - DOSAGEM DE ATIVIDADE DE NAG.	62
FIGURA 25 - DOSAGEM DE ATIVIDADE DE MPO.	63
FIGURA 26 - HISTOLOGIA REPRESENTATIVA DO FÍGADO DOS ANIMAIS.	67
FIGURA 27 - HISTOLOGIA REPRESENTATIVA DOS RINS DOS ANIMAIS.	69
FIGURA 28 - HISTOLOGIA REPRESENTATIVA DOS IMPLANTES DE ESPONJAS.	71

Sumário

1- INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO DE LITERATURA	15
ESTADOS INFLAMATÓRIOS – INFLAMAÇÃO.....	15
INGESTÃO DE SÓDIO (Na ⁺)	17
A BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA (DC).....	18
NANOFORMULAÇÃO	20
3- OBJETIVOS	22
OBJETIVO GERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4- JUSTIFICATIVA	23
5- MATERIAIS E MÉTODOS	23
MATERIAIS	23
COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO DE B. DRACUNCULIFOLIA.....	25
DOSAGEM DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES	25
PREPARO DOS REAGENTES E AMOSTRA	26
<i>Amostra</i>	26
<i>Reagentes</i>	26
<i>Curva analítica</i>	27
<i>Leituras de absorvância</i>	30
<i>Cálculos</i>	30
NANOEMULSÃO DE EXTRATO DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA	30
ANIMAIS	32
MODELO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
TRATAMENTOS.....	33
MODELO DE IMPLANTE DE ESPONJAS.....	33
EUTANÁSIA.....	35
AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS	35
PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	36
<i>Análises bioquímicas</i>	36
<i>Dosagem de Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺) no soro</i>	38
<i>Histologia</i>	38
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
DOSAGEM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES.....	41

ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO – NANOFORMULAÇÃO E PLACEBO.....	42
PESO DOS ANIMAIS ANTES DAS CIRURGIAS	45
PESO DAS ESPONJAS PÓS EUTANÁSIA.....	46
ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	48
<i>Função Hepática e Pancreática.....</i>	<i>48</i>
<i>Função Renal.....</i>	<i>54</i>
<i>Dosagem de glicose.....</i>	<i>56</i>
<i>Perfil lipídico.....</i>	<i>58</i>
<i>Dosagem de Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺).....</i>	<i>61</i>
<i>Dosagem de N-Acetil-β-D-Glicosaminidase (NAG) e Mieloperoxidase (MPO).....</i>	<i>62</i>
ACHADOS HISTOLÓGICOS HEPÁTICOS, RENAIIS E NAS ESPONJAS	63
7- CONCLUSÕES	72
9- CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
11- ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).	83

RESUMO

A inflamação é um processo biológico complexo que inclui componentes vasculares, celulares e uma gama de mediadores químicos. A alta ingestão de sódio, influencia a liberação de mediadores pró-inflamatórios no organismo dos indivíduos. O sódio, altera o equilíbrio plasmático desencadeando alterações funcionais e agravando o processo inflamatório. Nesse trabalho foi desenvolvido um modelo experimental onde se associou dois processos patológicos simultâneos, inflamação crônica (induzida por um implante subcutâneo de uma esponja de poliéster-poliuretano) e uma dieta com alto teor de sal em ratos Wistar (para estabelecer o estado hipertensivo sódio-dependente). O objetivo do projeto foi determinar a influência de um processo patológico sobre o outro, e testar uma nanoformulação de extrato alcoólico de *Baccharis Dracunculifolia* afim de avaliar os possíveis efeitos sobre os parâmetros metabólicos e inflamatórios dos animais. Além disso, propôs-se determinar os níveis de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos e partir desse dado, produzir a nanoformulação para ser ministrada aos animais diariamente por via oral pelo tempo de 14 dias pós introdução do estado hipertensivo. O total de 64 ratos Wistar machos foram distribuídos em grupos de dieta contendo 0,27% de sódio (SDP e SDDC) e outro grupo com dieta de 0,90% de sódio (HSP e HSDC). Os grupos denominados DC receberam a nanoformulação contendo extrato de *B. dracunculifolia* pelo tempo de 14 dias. Foram realizadas prova de função hepática, renal e perfil metabólico. Os resultados mostraram que o modelo de implante de esponja em ratos Wistar foi efetivo e se manifestou de forma similar ao modelo camundongo. Nem a associação das dietas e nem o tratamento alterou o perfil metabólico e inflamatório em nenhum dos grupos avaliados. Os resultados obtidos da análise de sódio e potássio no soro mostrou diferença significativa nos grupos HSDC quando comparados ao grupo SDP. Pode-se concluir que o modelo proposto está adequado e de acordo com as referências obtidas na literatura.

Palavras-chave: Inflamação, *Baccharis dracunculifolia*, sódio, ingestão de sódio

1-INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo biológico complexo que inclui componentes vasculares, celulares e uma gama de mediadores químicos (ABBAS, 2019). Pode ser definido como uma resposta a um dano infeccioso ou estéril com a finalidade fisiológica de restabelecer a homeostase tecidual, no entanto quando não controlada pode evoluir para estados inflamatórios crônicos como síndromes metabólicas (SUGIMOTO, 2016). O processo inflamatório agudo caracteriza-se por eventos interrelacionados, tais como aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, edema, dor, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para o tecido afetado (LIMA, Rafael, 2007). Ao se expressar por um período longo, a inflamação pode tornar-se indesejável, por levar a manifestações patológicas, como doenças metabólicas (diabetes), doenças cardiovasculares (hipertensão) e pulmonares (fibroses) (CARNEIRO, 2009).

O processo inflamatório em casos agudos apresenta um papel de proteção, por auxiliar no reparo tecidual após uma lesão, porém nos casos crônicos observa-se que as citocinas inflamatórias são capazes de ativar vias inadequadas ou desencadear uma hiperresponsividade (WANG, Ricardo, 2020).

A presença de estímulos persistentes no foco inflamatório tais como: substâncias químicas; insuficiência venosa crônica dos membros inferiores e alterações vasculares da diabetes; hipertensão, úlceras de pressão em pacientes acamados; presença de tecidos necróticos; presença de corpo estranho; menor atividade mitogênica; envelhecimento precoce dos fibroblastos (NWOMEH, 1998; DIEGELMANN, 2003); deficiências de vitaminas e desnutrição são fatores que podem influenciar negativamente o processo inflamatório (CAMPOS, 2007) contribuindo para a manifestação de um estado inflamatório crônico (CARNEIRO, 2009).

A alta ingestão de sódio (Na^+) influencia a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Ao ser ingerido em excesso, o seu equilíbrio plasmático é alterado e sua porção inativa é mobilizada para ser armazenada em tecidos, acarretando alterações funcionais das células imunes e exacerbando o processo inflamatório (CROUCH, 2021).

A alta concentração de Na⁺ no organismo ativa células T que desencadeia a infiltração de células imunes nos espaços perivasculares e rins com liberação de citocinas e quimiocinas, acarretando desequilíbrio hidroeletrolítico, mudanças vasculares que promovem processos inflamatórios, e alterações nos mecanismos locais, neurais e hormonais para ajuste da pressão arterial (KIRABO, 2017). Frequentemente, a hipertensão se apresenta em conjunto com outras doenças como a diabetes e dislipidemias, aparecendo em pares ou como síndrome metabólica, exibindo vias fisiopatológicas em comuns que podem corroborar processos inflamatórios teciduais (JIANG, 2018; ELIJOVICH, 2020; BATISTA, 2020; OLIVERAS, 2018; ROSAS-PERALTA, 2018).

Alguns estudos apresentam evidências da interação entre a alta ingestão de Na⁺ e processos inflamatório, onde indivíduos que fazem alta ingestão de sódio apresentam aumento do número de células inflamatórias e um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que se correlacionam como marcador expressivo de eventos inflamatórios, e estão interligadas em quadros de doenças metabólicas como diabetes, quadros hipertensivos e doenças inflamatórias crônicas (KOGA, 2008; BIANCARDI, 2014).

Inúmeras citocinas pró-inflamatórias já descritas em estudos de processos inflamatórios, estão sendo correlacionadas á alta ingestão de sódio na dieta. Processos inflamatórios e a alta ingestão de sódio, quando ocorrem de forma associada, podem ser consideradas um fator agravante do risco de morbimortalidade no ambiente clínico. Xiaohan Lu e Steven D. Crowley (2018), relataram que os estímulos inflamatórios, infecção e dieta com excesso de sal ativam as respostas imunes inatas levando ao acúmulo de células inflamatórias em órgãos-alvo que regulam a Pressão Arterial (PA).

Atualmente, existem inúmeros tratamentos para os processos inflamatórios, como antiinflamatórios não esteroidais (AINES), antiinflamatórios esteroidais, inibidores de COX-1 e COX-2. Porém suas desvantagens de uso como: restrições e efeitos colaterais, como complicações gastrointestinais, hemorragias, insuficiência renal e hepática e osteoporose pode levar ao abandono do tratamento crônico ou quadros clínicos mais graves (ABRAHAM, 2007; BATLOUNI, 2010; BALBINO, 2011). A busca pela medicina alternativa e alimentos funcionais são uma nova tendência que

vêm motivando pesquisas de compostos naturais e substâncias bioativas, tanto para o controle e tratamento das doenças crônicas, como a hipertensão, bem como para a regulação da resposta inflamatória de forma a proporcionar tratamentos mais eficazes e com menores efeitos colaterais (RAUD-MATTEDI, 2008). Baseado na popularidade do uso de medicamentos fitoterápicos, e na sua utilização, o interesse científico sobre os efeitos terapêuticos de produtos naturais têm crescido consideravelmente (MUXFELDT, 2019; DAUGHERTY, 2012; CAREY, 2018; BATISTA, 2020).

Alguns produtos naturais e fitoterápicos estão sendo investigados devido seus diferentes mecanismos anti-hipertensivos, por exemplo: a atividade inibitória de peptídeos derivados do leite, peixe ou plantas, atividades nas enzimas de conversão da angiotensina, ação vasodilatadora por estimulação parassimpática ou efeitos inibitórios na liberação de noradrenalina em nervos simpáticos. Observa-se que alguns flavonóides e outros derivados de polifenóis de produtos naturais apresentam efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, vasodilatadores e anti-hipertensivos (MISHIMA, 2005).

A própolis, uma substância resinosa elaborada por abelhas a partir de diversas fontes vegetais, possui propriedades selantes dentro da colmeia a fim de evitar invasão de fungos e bactérias, apresenta diversas atividades biológicas (antibacteriana, antiviral, antiinflamatória) e sua composição vai variar dependendo da fonte botânica da qual foi elaborada (MARUYAMA, 2009).

A própolis verde, cuja principal fonte botânica é a *Baccharis dracunculifolia* (“alecrim do campo”, “vassourinha”) vem sendo estudada por apresentar propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras e anti-hipertensivas, parte dessas atividades estão relacionadas à presença de compostos como ácido cafeoilquínico, ácido cinâmico, flavonóides, terpenos (bacarina) e ácidos benzóicos (MOISE, 2020; PEREIRA, 2016; GUIMARÃES, 2012).

Por ser importante para a composição da própolis verde, a *Baccharis dracunculifolia* surge como uma planta com potenciais propriedades terapêuticas, inclusive sugerindo um efeito anti-hipertensivo (MOISE, 2020). Os mecanismos envolvidos em seu efeito ainda não estão totalmente elucidados e o papel dos mecanismos imunomoduladores ainda permanece inexplorado. Pereira (2016) relatou o uso empírico da *Baccharis* como chás, decocções e tinturas como alternativa de

tratamento para inflamações, distúrbios hepáticos e úlceras estomacais. Guimarães (2012) ressalta que muitas substâncias químicas presentes na *Baccharis dracunculifolia* também foram encontradas na própolis, o que fortalece o questionamento de similaridade de função do extrato de *Baccharis* e própolis para terapêutica hipertensiva e antiinflamatória.

Diante do exposto, nesse projeto foi proposto caracterizar as principais alterações metabólicas e o perfil inflamatório dos animais submetidos a uma com alta ingestão de sódio e avaliar o efeito de uma nanoformulação do extrato alcoólico da *Baccharis dracunculifolia* no modelo inflamatório de implantes subcutâneos de esponja.

2-REVISÃO DE LITERATURA

Estados Inflamatórios – Inflamação

A inflamação consiste em uma resposta dos tecidos a um evento ou agente agressor, seja ele físico, químico, biológico ou um estresse metabólico, apresentando recrutamento de diversas células como neutrófilos, macrófagos e mastócitos e moléculas de defesa da circulação para os locais onde são necessários para estabelecer a homeostase do organismo (COUTINHO, 2009; BACHIEGA, 2011; TEIXEIRA, 2020).

Após o dano tecidual, primeiras 24 horas, as primeiras células de defesa chegam ao local, os neutrófilos, ocasionados pela permeabilidade endotelial que facilita a migração dos leucócitos do fluxo sanguíneo para o local lesionado (COSTA, 2019). Os neutrófilos são células da classe dos granulócitos que são recrutadas por moléculas liberadas por células danificadas e necróticas após lesão tecidual (COSTA, 2019).

As moléculas liberadas por danos ou alterações em células e moléculas do organismo são denominadas de DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) e são designadas como alarminas, moléculas sinalizadoras de agressão (BOGLIOLO, 2016).

Em seguida, novas células são recrutadas, como os monócitos inflamatórios que migram para o local da lesão guiados por quimiocinas e várias moléculas de adesão que amadurecem os monócitos em macrófagos no tecido (COSTA, 2019). A função dos macrófagos é realizar a fagocitose de bactérias, tecido necrótico e neutrófilos apoptóticos. Ainda participam da liberação de fatores de crescimento e citocinas responsáveis pela modulação e recrutamento de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos no local lesionado (COSTA, 2019).

Os mastócitos, células presentes nos epitélios da pele e das mucosas, se fazem presentes em reações inflamatórias quando ativados liberando numerosos mediadores inflamatórios, como a histamina que proporciona os sintomas das doenças alérgicas (ABBAS, 2019).

Desde a antiguidade a reação inflamatória é reconhecida pelos seus sinais e sintomas típicos como calor, rubor e dor, acrescida por alterações funcionais teciduais. Esta caracterização é dada por observação em inflamações agudas (BOGLIOLO, 2016; COSTA, 2019). Durante a resposta inflamatória aguda ainda se observa o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular (GERALDO, 2008).

A reação inflamatória, embora seja um componente muito importante da execução da resposta imune a fim de eliminar a causa inicial da lesão que pode ser de ação de um patógeno ou um agente físico, também pode ocasionar danos ao organismo (COUTINHO, 2009).

Na inflamação crônica é frequentemente observada o desenvolvimento da resposta imune celular juntamente com a resposta humoral. Nessas circunstâncias a resposta humoral é mediada por moléculas sanguíneas, os anticorpos produzidos por linfócitos B. A função dos anticorpos é reconhecer antígenos, neutralizar infectividade e marcar moléculas e células para serem fagocitadas. Esta fase crônica inicia-se de forma insidiosa, com resposta imune de baixo grau, latente ou até mesmo assintomática (GERALDO, 2008).

Volp e colaboradores (2008), correlacionaram a presença de hiperfibrinogenemia com componentes de Síndrome Metabólica (glicemia em jejum, HDL-colesterol, pressão arterial sistêmica e IMC), o que caracteriza situação de processo inflamatório crônico. Já a proteína amilóide sérica A (SAA) é sintetizada pelos hepatócitos em decorrência de estímulos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e o TNF- α) e é considerada um marcador sensível que reflete processo inflamatório agudo.

Como marcadores bioquímicos na atividade inflamatória e na avaliação das atividades de macrófagos e neutrófilos tem-se a N-acetyl- β -D-glicosaminidase (NAG) e a Mieloperoxidase (MPO) (SILVA, 2013; COSTA, 2019). NAG, é uma enzima lipossomal, está relacionada com a infiltração de células mononucleares, que ocorre com hiperatividade macrofágica (SILVA, 2013). MPO, é uma proteína presente em grânulos azurófilos de neutrófilos, apresenta função de destruição de patógenos e possui capacidade de amplificar o efeito oxidativo e citotóxico dos neutrófilos, além de gerar espécies de radicais livres (COSTA, 2019).

Tem-se bem consolidado que o íon Na^+ dietético em alto teor exerce influência nas células imunes, levando a um fenótipo inflamatório, com aumento da produção de citocinas e desenvolvimento de doenças com perfil inflamatório sistêmico, como por exemplo a hipertensão (ELIJOVICH, 2020). O papel do sódio presente no espaço intersticial tem sido pesquisado e sua compreensão no perfil imunológico e fisiopatológico de processos inflamatórios tem sido correlacionado positivamente com a alteração da pressão sanguínea em humanos (PITZER, 2020). A maioria dos estudos divulgados até o momento, envolvendo o efeito da dieta rica em sódio, focou no papel dos rins, sistema nervoso simpático e os efeitos da vasculatura ao investigar a fisiopatologia da hipertensão (WILCK, 2017). Sendo assim, investigar se o impacto de um processo diretamente sobre o outro quando ocorre de forma associada, ou seja, um indivíduo que possui uma dieta rica em ingestão de sódio e apresenta um processo inflamatório crônico pode conseqüentemente apresentar um perfil de forma mais grave ao se comparar a um indivíduo que não apresenta a associação dessas patologias.

Ingestão de sódio (Na^+)

A ingestão de sódio (Na^+) está relacionada com a modulação da liberação de mediadores pró-inflamatórios. Quando o Na^+ atinge um equilíbrio entre o interstício e o plasma o seu excesso é mobilizado para ser excretado pelos rins, porém a porção inativa do Na^+ pode ser direcionada para ser armazenada em tecidos como a pele, o que pode proporcionar alterações nas funções das células imunes e desencadear o aumento da expressão do processo inflamatório (CROUCH, 2021).

O Na^+ em excesso no organismo pode se acumular no interstício tecidual em concentrações maiores que as observadas no plasma devido interações com glicoaminoglicanos com cargas negativas. Em altas concentrações o Na^+ ativa células T por moléculas de sinalização como o NFAT5 (Fator Nuclear de Células T ativadas 5) e a quinase 1 ou SGK1 (quinase 1 regulada por soro ou glicocorticóide), que promove a infiltração das células imunes nos espaços perivasculares e nos rins, onde ocorre a liberação de citocinas que estimulam a disfunção vascular e a retenção de Na^+ e água, desencadeando a inflamação e doenças sistêmicas como a hipertensão

(KIRABO, 2017). Quando há polarização das células imunes para um fenótipo inflamatório proporciona o aumento da produção de interleucina-17 (IL-17) e hipertensão (ELIJOVICH, 2020; KIRABO, 2017).

O aumento da ingestão de sal pode proporcionar, entre outros, a elevação da pressão arterial e danos nos órgãos-alvo afetando a expressão de Canais de Sódio Epitelial (ENaC), o que polariza as células imunes adaptativas e inatas para um fenótipo pró-inflamatório (WENZEL, 2019; WANG, Wen, 2015). As células inflamatórias, como monócitos, macrófagos e células T migram e se infiltram nos rins e na vasculatura, estimulando o processo inflamatório (KIRABO, 2017).

O excesso de sal na dieta estimula a inflamação tecidual e doenças autoimunes e estudos corroboram com evidências em que indivíduos com alta ingestão de sódio apresentaram um aumento no número de monócitos e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-23, ao serem comparados com grupos com dieta de baixo teor de sódio (KIRABO, 2017).

Segundo as diretrizes dietéticas dos Estados Unidos de 2015-2020, a quantidade recomendada de ingestão de sódio não deve exceder 2300mg, enquanto a Organização mundial de saúde recomenda a ingestão de sódio inferior a 2000mg por dia, sendo mencionado que a ingestão de sódio inferior a 1500mg por dia seria a mais ideal (WANG, Yi-Jie, 2020).

A Baccharis dracunculifolia (DC)

O gênero *Baccharis*, pertence à família *Asteraceae* e apresenta características de arbusto perene e lenhoso e sua altura pode variar entre 50cm até 3 metros (CASAGRANDE, 2018; FURTADO, 2018; MANFRON, 2004). Seus arbustos dióicos, apresentam inflorescências masculinas e femininas em indivíduos distintos com o período de floração ocorrendo duas vezes ao ano (RODRIGUES, 2020).

A *Baccharis* engloba mais de 500 espécies e no Brasil podemos encontrar cerca de 120 destas espécies, sendo a *Baccharis dracunculifolia* (DC) nativa das regiões do Cerrado (região centro-oeste), Mata Atlântica (região sudeste) e Pampa Brasileiro

(região sul) (RODRIGUES, 2020; CASAGRANDE, 2018; FURTADO, 2018; RINHEL, 2015).

A espécie *B. dracunculifolia* é popularmente denominada como “vassoura” ou “Alecrim-do-campo” e possui aplicação na medicina popular como antipirético e antiinflamatório (FURTADO, 2018). Usualmente os ramos e folhas da *B. dracunculifolia* são empregados para o tratamento de distúrbios gástricos e afecções febris, tendo uso no tratamento de feridas e processos inflamatórios (RINHEL, 2015).

O uso dos extratos e formulações de plantas medicinais é popularmente difundido e a *B. dracunculifolia* se encaixa neste contexto por exibir atividades biológicas e estudos demonstrando suas ações farmacológicas, como o efeito antiinflamatório demonstrado em estudos de úlceras gástricas em ratos, e cicatrizante como no tratamento de fístulas anais (SANTOS, Carlos, 2019).

Classificada como a principal fonte botânica na produção da própolis verde a *Baccharis dracunculifolia* apresenta grande importância para a indústria farmacêutica e cosmética devido suas atividades biológicas tais como:

Tabela 1 - Atividade Biológica de *Baccharis dracunculifolia* e própolis verde.

Autor e Ano	Atividade Biológica
CASAGRANDE (2018)	Antimutagênica, Antiinflamatória, Hepatoprotetora, Antidiabética
FURTADO (2018)	Hepatoprotetora, Imunomodulatória, Antiinflamatória, Antinociceptiva
RINHEL (2015)	Antioxidante, Antiinflamatório
PEREIRA (2016)	Antibacteriano
BACHIEGA (2013)	Imunomodulatório
ROBERTO (2018)	Antigenotóxico e Antimutagênico

Estudos fitoquímicos da *B. dracunculifolia* demonstram a presença de taninos (polifenóis) e flavonóides em sua composição, sendo cerca de 120 espécies quimicamente estudadas, porém somente 30 apresentam pesquisas de atividade biológica, o que foi identificado por diversos autores (COLACITE, 2015).

Sforcin (2012) descreve que o primeiro estudo fitoquímico da espécie *B. dracunculifolia* utilizando suas partes aéreas foi realizado por Bohlmann e seus colaboradores em 1981, onde foi identificado e isolado os compostos fenilpropanóides drupanina, bacarina e artepilina C.

Os metabólitos da *B. dracunculifolia* estão associados a inúmeras funções, incluindo a atração de animais polinizadores, proteção contra a luz, defesa da planta contra microorganismos e ações medicinais (RINHEL, 2015).

Quimicamente a *B. dracunculifolia* apresenta vários compostos em seu metabolismo secundário como ácido cinâmico e derivados (p-cumárico e ferúlico), flavonóides (canferol, apigenina entre outros), monoterpenos, sesquiterpenos e outros tão importantes como artemisina, bacarina e óxido de baccharis (RINHEL, 2015). A presença destes metabólitos, principalmente os flavonóides e taninos garantem à *B. dracunculifolia* atividades biológicas como ação antiinflamatória e antioxidante (CASAGRANDE, 2018).

A investigação tanto da composição química quanto das propriedades biológicas de fontes vegetais como a *B. dracunculifolia* é importante não apenas pelo interesse acadêmico, mas também pela padronização química dos constituintes e atividade biológica.

Nanoformulação

As nanoformulações são considerados sistemas de entrega de medicamentos e têm sido empregadas na nanomedicina. Elas vêm sendo utilizadas/estudadas para tratar, diagnosticar, como profilaxia de diversas doenças – doenças parasitárias, cânceres, doenças auto-imunes, como processos inflamatórios (ABOUITAH, 2021).

As vantagens das nanopartículas podem ser listadas, como serem muito menores que as unidades convencionais já comercializadas; proporcionar a entrega dos agentes farmacêuticos com maior precisão ao tecido alvo, tendo sua dose geral reduzida juntamente com seus efeitos colaterais; possuir permeabilidade e retenção aumentada, podendo direcionar o acúmulo das nanopartículas em patologias específicas; proporcionar o aumento da concentração ativa do fármaco e biodisponibilidade, maior segurança e eficácia, liberação do fármaco em uma taxa constante ao longo do tempo desejado (FARJADIAN, 2019; CRACIUNESCU, 2021).

Existem hoje vários tipos de nanoformulações envolvidas em pesquisas com inúmeras substâncias terapêuticas; como os lipossomas, que apresentam

características semelhantes com as membranas celulares humanas; as micelas poliméricas, nanopartículas poliméricas, nanotransportadores à base de proteínas, nanopartículas de lipídios sólidos, dentre outros tipos (CHEN, Yan, 2020).

Um dos sistemas de nanoformulações empregados é a nanoemulsão, um sistema coloidal cineticamente estável e termodinamicamente instável. Sua composição é formada por uma mistura de óleo, emulsificante e água. As nanoemulsões se apresentam opticamente transparentes ou semitransparentes, e o tamanho de suas partículas vai depender do tipo e proporção dos componentes utilizados e a força mecânica empregada para sua produção (CHEN, Bing-Huei, 2019). Alguns autores dispõem-se da nanotecnologia para incorporar substâncias naturais contendo compostos fenólicos e flavonóides que também são encontrados na *Baccharis dracunculifolia* e na própolis verde, como apresentado na tabela abaixo:

Tabela 2 - Autores de Nanoformulações com substâncias naturais contendo compostos fenólicos e flavonóides

Autor	Substância
COLOMBO (2018)	Kaempferol (flavonóide)
SYUKRI (2021)	Própolis da Indonésia
SEVINÇ-ÖZAKAR (2022)	Própolis de Apis melífera
ABDELLATIF (2021)	Própolis
SON (2019)	Quercetina (flavonóide)

O uso de nanotecnologia nas ciências médicas visa buscar formas mais promissoras para garantir uma melhoria na biodisponibilidade, estabilidade, solubilidade e biodistribuição de produtos naturais, e a remodelagem dos fármacos convencionais para um tratamento com mais segurança e menos efeitos colaterais (NOURI, 2020).

A formação de nanoemulsões é avaliada, geralmente, medindo-se a distribuição do tamanho das gotículas formadas usando técnicas de dispersão de luz dinâmica (espectroscopia de correlação de fótons). Uma técnica que mede a intensidade de flutuação da luz espalhada pelas gotículas à medida que elas sofrem movimento browniano. Em muitas nanoemulsões as gotículas não são perfeitamente dispersas (apresentam tamanho estreito de distribuição) e os resultados de dispersão de luz são ponderados para polidispersidade (expressos como média de tamanho e um índice de polidispersidade com informações do desvio do tamanho médio) (TADROS, 2004). Para as nanoemulsões serem consideradas polidispersas o índice

de polidispersão tem que estar abaixo do valor de 0,3, o que indica homogeneidade da distribuição dos tamanhos e formação de sistemas monodispersos na formulação (NEMEN, 2011).

3-Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar os eventos metabólicos da associação da alta ingestão de sódio no modelo murino de inflamação crônica e avaliar o efeito do tratamento por via oral com nanoemulsão do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia*.

Objetivos específicos

- 1- Determinar a concentração dos compostos fenólicos e flavonoides no extrato alcoólico de *B. dracunculifolia*;
- 2- Produzir a nanoformulação do extrato alcoólico de *B. dracunculifolia* e avaliar a sua estabilidade;
- 3- Caracterizar o perfil metabólico dos animais que receberam dieta com altas concentração de sódio associado ao estado inflamatório induzido pelos implantes de esponja;
- 4- Caracterizar histologicamente o efeito da nanoformulação no fígado, rim e no microambiente dos implantes de esponja dos animais tratados e não tratados quanto aos possíveis efeitos citotóxicos;
- 5- Avaliar bioquimicamente e histologicamente a resposta inflamatória no microambiente dos implantes subcutâneos de esponja em ratos Wistar com alta ingestão de sódio.

4-Justificativa

Inflamação associada e a alta ingestão de sódio quando ocorrem de forma conjunta, apresentam um alto potencial de morbimortalidade no ambiente clínico. Adicionalmente o uso de medicamentos utilizados para o tratamento de processos inflamatórios pode desencadear efeitos colaterais graves podendo agravar as condições clínicas do paciente. A busca por alternativas terapêuticas naturais se faz necessária considerando a possibilidade de que, por agirem em múltiplos alvos, poderiam produzir efeitos terapêuticos com doses menores, especialmente aqueles compostos ricos em ácidos fenólicos, flavonóides e os derivados de polifenóis. Além disso, a proposição de nanotecnologias associadas a esses compostos, garante uma maior estabilidade das moléculas ativas, o que poderá garantir melhores efeitos terapêuticos com menores concentrações da substancia testada. Dessa forma, propõe-se o desenvolvimento de uma nanoformulação extrato alcoólico da *Baccharis dracunculifolia* (planta rica em compostos e ácidos fenólicos) administrado por via oral para o tratamento de distúrbios inflamatórios e hipertensivos associados. A proposta do presente trabalho foi caracterizar o perfil metabólico e inflamatório em um modelo experimental de associação dos dois processos, por meio da ingestão de uma dieta rica em de sódio em um modelo animal de inflamação induzido pelo implante subcutâneo de esponja em ratos.

5-Materiais e Métodos

Materiais

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Material cirúrgico – lâmina de bisturi, pinças, tesouras;
- Água ultra-pura;
- Água destilada;
- Tubos eppendorfs;
- Tubo Falcon 15mL;

- Tubo Falcon 45mL;
- Seringas de insulina e agulhas 26G;
- Seringas de 3mL e 5mL e agulhas 21G;
- Agulha de gavagem para ratos;
- Agodão e compressas de gaze;
- Cassete histológico com tampa;
- Pote para exame (coletor universal);
- Lâmina para microscopia 26X76 e lamínula de vidro 24x24;
- Luvas de procedimento látex;
- Papel toalha;
- Pipeta de Pasteur graduada 1mL;
- Micropipetas volume regulável (0,2 - 2 μ L; 1-10 μ L; 5-50 μ L; 10-100 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L);
- Ponteiras de 0,1-1000 μ L;
- Solução salina;
- Centrífuga para tubo eppendorf de 1,5 a 2mL;
- Estufa de laboratório;
- Balança analítica;
- Vórtex;
- Refrigerador -80°C;
- Freezer -20°C;
- Cetamina;
- Xilazina;
- Tramadol;
- Termômetro;
- Banho-maria;
- Hidróxido de Sódio;
- Cloreto de Sódio;
- Fosfato de Sódio monobásico;
- Fosfato de Potássio dibásico;
- Álcool etílico;
- Álcool metílico;

- Hetamoxilina – Eosina (HE);
- Navalha para micrótomo;
- Formaldeído 10% tamponado (pH 7,2);
- Xilol;
- Álcool 70%, 80%, 90% e 99%.

*Coleta do material vegetal e preparo do extrato de *B. dracunculifolia**

As folhas de *Baccharis dracunculifolia* foram coletadas em uma região de cultivo da planta, que fica dentro da propriedade da mineradora Samarco S.A. que visa, em um projeto paralelo, estabelecer um campo melífero e de produção de própolis como parte das atividades de recuperação de áreas degradadas pelo rompimento da barragem de rejeitos minerais no distrito de Bento Rodrigues, município de Mariana, Minas Gerais. As folhas foram coletadas no período da manhã, entre 7h e 11h, durante a estação chuvosa. Foram armazenadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular (LFEC) da UFOP para seleção, lavagem e pesagem.

Uma vez pesadas, as folhas foram imersas em etanol 95 a 97% P.A. numa proporção de 1:1,5 e assim permaneceram no processo de maceração por 10 dias à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Ao final desta etapa, a fase líquida foi sifonada, filtrada e um novo lote de etanol 95 a 97% P.A. foi adicionado às folhas até total imersão numa proporção 1:1,5. Uma terceira maceração foi feita, seguindo os mesmos procedimentos da segunda. As frações líquidas foram reunidas, misturadas e o etanol foi evaporado em rotaevaporador a 86 mBar de pressão e 40°C de temperatura (GRANCE, 2008). O fluido resultante foi utilizado para ensaios de caracterização fitoquímica e preparo da nano emulsão.

Dosagem de compostos fenólicos e flavonóides

O fluido resultante da extração das folhas de *B. dracunculifolia* foi utilizado para a realização da dosagem de compostos fenólicos e flavonóides. A metodologia

utilizada foi descrita por SILVA, Jardel (2016) e por SILVA, Larissa (2016) e adaptada para a realização do experimento.

Preparo dos reagentes e amostra

Amostra

Para o a dosagem de flavonóides foi preparado uma solução estoque da amostra a ser testada com concentração de 1mg/mL. A amostra foi solubilizada em etanol P.A. com o auxílio de ultrassom para que a solução fique homogênea. Já para o a dosagem de compostos fenólicos foi preparada uma solução estoque da amostra com a concentração de 0,5mg/mL, sendo solubilizada em etanol P.A. com o auxílio de ultrassom.

Reagentes

Na₂CO₃ (Carbonato de Sódio)

Foi preparada a solução de Carbonato de Sódio com concentração 1,5%p/v em um volume final de 10mL. Solubilizando o Na₂CO₃ em H₂O (Milli Q). Subsequente a solução foi filtrada em filtro de papel para remoção de precipitados da mesma.

AlCl₃ (Cloreto de Alumínio)

A solução foi preparada solubilizando o Cloreto de Alumínio em H₂O (Milli Q) para o volume final de 10ml com uma concentração de 10%p/v.

CH₃COOK (Acetato de Potássio)

O soluto Acetato de Potássio foi solubilizado em H₂O (Milli Q) para um volume final de 10mL e uma concentração de 1mol/L.

Padrão - Ácido Gálico

A solução do padrão de ácido gálico foi preparada na concentração de 1mg/mL. Pesou-se 0,01g de ácido gálico e solubilizou-se em 10mL de etanol P.A. A seguir foi

pipetado 200 μ L desta solução num tubo eppendorf e o volume foi completado para 1000 μ L com etanol P.A.

Padrão – Quercetina ou Rutina

A solução de padrão de quercetina ou de rutina foi preparada na concentração de 0,2mg/mL. O soluto é solubilizado em etanol P.A. para um volume final de 10mL.

Curva analítica

Em uma placa de 96 poços foi pipetado as amostras e reagentes para cada composto a ser analisado (compostos fenólicos e flavonóides) como segue as tabelas abaixo (Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6):

Tabela 3 - Dosagem de compostos fenólicos - amostra e branco.

Substâncias	Amostra	Branco
Sol. Estoque de Amostra	80µL	80µL
H ₂ O	30µL+40µL	120µL
Folin Ciocateau	10µL	0
Na ₂ CO ₃	40µL	0
Ácido Gálico	0	0

Tabela 4 - Dosagem de compostos fenólicos - curva padrão.

Padrão									
Substâncias	6,1µg/mL	12,1µg/mL	18,2µg/mL	24,3µg/mL	36,4µg/mL	48,5µg/mL	60,6µg/mL	72,8µg/mL	84,9µg/mL
H ₂ O	105µL+ 40µL	100µL+ 40µL	95µL+ 40µL	90µL+ 40µL	80µL+ 40µL	70µL+ 40µL	60µL+ 40µL	50µL+ 40µL	40µL+ 40µL
Folin Ciocateau	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL
Na ₂ CO ₃	40µL	40µL	40µL	40µL	40µL	40µL	40µL	40µL	40µL
Ácido Gálico	5µL	10µL	15µL	20µL	30µL	40µL	50µL	60µL	70µL

Tabela 5 - Dosagem de flavonóides - amostra e branco.

Substâncias	Amostra	Branco
Etanol PA	40 μ L	44 μ L
Sol. Estoque	100 μ L	100 μ L
AlCl ₃	4 μ L	0
CH ₃ COOK	4 μ L	4 μ L
H ₂ O	52 μ L	52 μ L

Tabela 6 - Dosagem de flavonóides - curva padrão.

Padrão								
Substâncias	6,4 μ g/mL	12,9 μ g/mL	19,3 μ g/mL	25,7 μ g/mL	32,1 μ g/mL	38,6 μ g/mL	45 μ /mL	51,4 μ /mL
Etanol PA	135 μ L	130 μ L	125 μ L	120 μ L	115 μ L	110 μ L	105 μ L	100 μ L
AlCl ₃	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
CH ₃ COOK	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
H ₂ O	52 μ L	52 μ L	52 μ L	52 μ L	52 μ L	52 μ L	52 μ L	52 μ L
Quercetina ou Rutina	5 μ L	10 μ L	15 μ L	20 μ L	25 μ L	30 μ L	35 μ L	40 μ L

Leituras de absorvância

As absorvâncias das soluções (compostos fenólicos e flavonóides) foram determinadas em equipamento de leitura de placa de elisa com 96 poços.

A leitura da placa para a dosagem de compostos fenólicos procedeu-se após a adição de todos os reagentes nos poços da placa e aguardar o período de 2 horas de repouso, ao abrigo de luz. O comprimento de onda utilizado foi de 650nm. Para a leitura da placa de dosagem de flavonóides, após todos reagentes adicionados aos poços, aguardou-se o período de 45 minutos, ao abrigo de luz, utilizando o comprimento de onda de 450nm.

Cálculos

Os teores de compostos fenólicos e flavonóides foram calculados utilizando-se a equação da curva analítica obtida para os respectivos padrões, ácido gálico para compostos fenólicos e quercetina ou rutina para flavonóides. Os resultados foram expressos em micrograma equivalente de ácido gálico por miligrama de extrato ($\mu\text{gEAG}/\text{mg}$ de extrato) para compostos fenólicos; e micrograma equivalente de rutina por miligrama de extrato ($\mu\text{gER}/\text{mg}$ de extrato – quando usado a rutina como padrão) e micrograma equivalente de quercetina por miligrama de extrato ($\mu\text{gEQ}/\text{mg}$ de extrato – quando usado a quercetina como padrão) (SILVA, Jardel, 2016; SILVA, Larissa, 2016; MARCUCCI, 2020).

*Nanoemulsão de extrato de *Baccharis dracunculifolia**

Foi elaborada previamente uma nanoemulsão contendo o extrato alcoólico de *B. dracunculifolia* na concentração de 50mg/kg, utilizada para administração nos animais após a cirurgia de esponja como tratamento. A dose definida para o tratamento neste trabalho foi estabelecida baseada em trabalho anterior onde foi demonstrado efeito anti-hipertensivo nos animais tratados. Juntamente foi preparado o placebo contendo os excipientes da nanoemulsão (BATISTA, 2021).

A nanoformulação utilizada neste trabalho foi descrita por BATISTA (2021) em seu estudo. O tipo de nanoformulação utilizada foi de água e óleo e incorporada pelo

método de inversão de fases, composta pelo extrato alcoólico de *B. dracunculifolia*; óleo de girassol; Crill 3 (Croda); Croduret 50 - Special® (Croda) e água destilada recém coletada que foi utilizada como quantidade suficiente de solvente para completar o volume final da formulação. Para o preparo da nanoformulação foram pesados os ativos descritos acima em um mesmo recipiente e levados ao equipamento de ultrassom Gnatus por uma hora. Logo após, o recipiente foi aquecido em banho-maria até $\pm 75^{\circ}\text{C}$, e em recipiente separado a água destilada também foi aquecida até estabelecer a mesma temperatura. Ao se atingir a temperatura, o volume de água necessário foi adicionado ao recipiente com os demais constituintes e através de força mecânica promovida por um agitador mecânico foi formada a nanoformulação. A agitação foi mantida até a formulação atingir a temperatura ambiente. No processo de produção do veículo, foi preparada uma nanoformulação segundo os mesmos critérios descritos acima com exceção a adição do extrato alcoólico de *B. dracunculifolia*. Findado o preparo, as formulações foram devidamente acondicionadas em refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Este processo segue com designação de patente dos autores Leonardo Máximo Cardoso, Marcos Adriano Carlos Batista, Sandra Aparecida Lima de Moura e Orlando David Henrique, de número de registro BR1020220108285 e título "FORMULAÇÃO NANO-ESTRUTURADA A BASE DE EXTRATO DE ALECRIM-DO-CAMPO (*BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*) PARA TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA", referente a nanoemulsão contendo o extrato alcoólico.

Foram preparadas duas formulações para atender a demanda de tratamento dos animais, cujos experimentos foram divididos em dois períodos. O aparelho utilizado para realizar as análises foi o ZetaSizer. Para a análise foi utilizada uma cubeta de quartzo e feita uma diluição da amostra pipetando $100\mu\text{L}$ de amostra e $900\mu\text{L}$ de água ultrapura. A análise foi realizada a uma temperatura de 25°C , em triplicada e cada triplicada foi repetida 13 vezes segundo a programação sugerida pelo aparelho.

Animais

Para a realização do estudo experimental foram utilizados ratos Wistar, sexo masculino com 21 dias de idade, provenientes do CCA-UFOP, sob número do protocolo do comitê de ética e experimentação animal 5152120421; os animais foram mantidos com 25 trocas/hora de ar, ração e água (de torneira) *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12:12, sendo as luzes apagadas as 19h e acesas as 7h, em temperatura média de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ até a realização dos procedimentos experimentais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Arouca (Lei 11.794) e com a aprovação prévia da Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

Modelo e delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo HS, tratados com dieta composta por 0,90% de Na^+ por 12 semanas após o desmame; Grupo SD, sob dieta composta por 0,27% de Na^+ por 12 semanas após o desmame.

Cada grupo foi subdividido em diferentes subgrupos, distribuídos de acordo com o tratamento combinado ao implante de esponjas para indução de inflamação da seguinte forma (Figura1):

Grupo HSP – dieta 0,90% de Na^+ + implante de esponja + placebo (Figura1)

Grupo HSDC – dieta 0,90% de Na^+ + implante de esponja + nanoemulsão de DC (dose de 50mg/kg) (Figura1)

Grupo SDP – dieta 0,27% de Na^+ + implante de esponja + placebo (Figura1)

Grupo SDDC – dieta 0,27% de Na^+ + implante de esponja + nanoemulsão de DC (dose de 50mg/kg) (Figura1)

Tratamentos

Tanto nanoemulsão sem o extrato como nanoemulsão contendo o extrato foram administrados em um volume de 1mL por gavagem orogástrica nos animais contidos para tal procedimento. O tratamento se iniciou logo após a cirurgia para implante de esponja nos animais, pelo tempo de 14 dias de tratamento.

A nanoemulsão sem o extrato foi designada como placebo e a nanoemulsão contendo o extrato foi designada como DC 50mg/kg. Placebo por definição é um produto sem efeitos terapêuticos que beneficia o estado de saúde devido à crença do paciente de que seu uso é eficaz. Também chamados de tratamentos inativos, onde se tem um produto sem o composto ativo (POŽGAIN, Ivan, 2014; VASE, 2019).

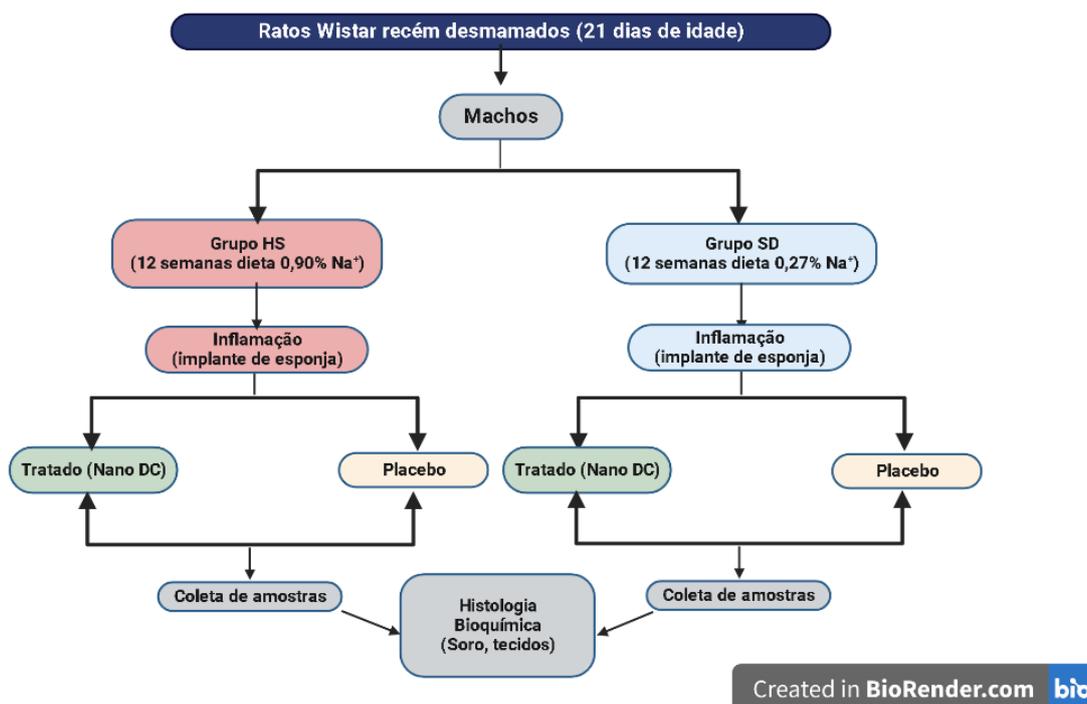


Figura 1 - Delineamento experimental.

Modelo de implante de esponjas

Para a indução do processo inflamatório, foram realizados implantes subcutâneos de discos de esponja de poliéster-poliuretano estéreis. Foram utilizados

discos com 8mm de diâmetro, 5mm de espessura e 4,8mg de peso médio. Os discos foram preparados e colocados em álcool 70°GL pelo período de 48 horas. No dia do implante, as esponjas foram lavadas e fervidas a 95°C em água destilada por 30 minutos.

Na realização do procedimento os animais foram anestesiados, sendo o local da incisão tricotomizado com máquina de aparar os pêlos e limpo com álcool 70°GL para a assepsia. Subsequente o local da incisão passou por assepsia com álcool 70°GL. Foi realizada uma incisão na pele da região dorso-lombar de cerca de 1cm onde foi divulsionado o tecido para a inserção do disco de esponja a 2cm acima da região da incisão. Após a realização da sutura no local, os animais foram colocados em caixas individuais com livre acesso a água e ração e posterior administração da formulação contendo a nanoemulsão do extrato de *B. dracunculifolia* e o placebo nos devidos grupos.

Os procedimentos que envolveram as esponjas foram baseados em publicações que dispuseram da mesma metodologia com a esponja com o desígnio de desenvolver pesquisas relacionadas ao processo inflamatório. Tendo nota que as pesquisas relacionadas com implantes de esponjas foram desenvolvidas com camundongos das espécies Swiss, Balb-c e C57BL/6 (LANNA, 2020).

Os animais foram obtidos com 21 dias, dispostos em grupos com dieta controle (0,27% de sódio) e dieta com alta ingestão de sódio (0,90% de sódio) por 90 dias. Completados os 90 dias, foi realizado o implante de esponja subcutâneo nos animais e as respectivas dietas foram mantidas até o fim do experimento. Após o implante de esponja iniciou-se o tratamento com as nanoformulações, dividindo os animais em grupo veículo e grupo tratado com o extrato de *B. dracunculifolia*, durante 14 dias. Após tratamento, foi realizado a eutanásia e a coleta das esponjas, líquido, soro e órgãos para as análises (Figura 2).

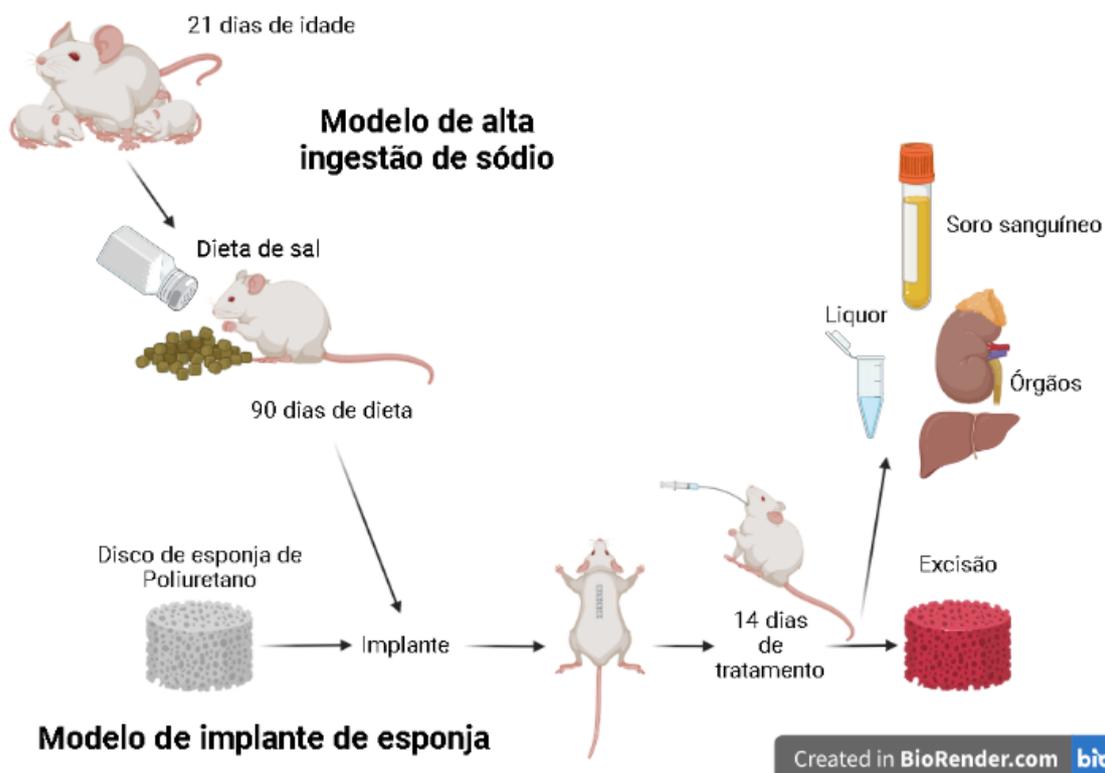


Figura 2 - Modelos experimentais

Eutanásia

O procedimento consistiu em aplicar uma sobredose de anestésico: cetamina (300mg/kg) e xilazina (21mg/kg), aguardar o período de tempo necessário para a eutanásia do animal e realizar a toracotomia para retirada dos órgãos (fígado, rins) e punção atrial direita para coleta do sangue. Também realizada uma incisão para retirada da esponja no dorso do animal. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado e o soro separado, armazenado e congelado no freezer -80°C para posterior análises de sódio, potássio e parâmetros bioquímicos. A esponja foi armazenada em freezer -80°C para posterior análise.

Avaliação do peso corporal dos animais

Os animais tiveram seu peso corporal medido antes dos procedimentos cirúrgicos (implante de esponja e eutanásia). A análise da variação de peso dos animais entre os procedimentos cirúrgicos foi tabulada para verificar a influência dos protocolos de dieta (SD e HS), tratamento (nanoformulação e nanoformulação sem o extrato DC) e associação dos processos patológicos no comportamento e metabolismo dos animais.

Processamento das amostras

Análises bioquímicas

Foram coletadas amostras de sangue (soro) e retirada a esponja do tecido subcutâneo dos animais para a realização das análises bioquímicas, com o intuito de realizar análises da função hepática e atividade do pâncreas, função renal, perfil glicídico, perfil lipídico, dosagem de sódio e potássio e atividade de NAG e MPO.

As amostras foram coletadas em microtubos eppendorf, identificados e acondicionados em banho de gelo até o término dos procedimentos cirúrgicos. Sendo as amostras armazenadas no freezer -80°C para posterior análise.

Os exames realizados para a função hepática e atividade pancreática foram: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Proteínas totais, Albumina, Fosfatase alcalina e Amilase. Para a análise da função renal foram realizados os exames de Uréia e Creatinina. Na avaliação do perfil glicídico foi dosado a glicose dos animais e no perfil lipídico foi dosado o colesterol total, HDL e Triglicérides.

Para a determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Biureto (Zaia, 98). Tal método consiste nas reações do biureto, uma mistura constituída de cobre e hidróxido de sódio com um estabilizante de cobre em solução. A análise foi realizada em duplicata, sendo pipetado 50µL do soro para uma placa de leitura de 96 poços. Consequente adicionou-se 200µL do reagente de trabalho, 200µL do reagente biureto. A placa foi colocada em estufa à 37°C por 10 minutos, sendo realizada a leitura no espectrofotômetro de UV visível Elisa a 700nm.

A curva padrão para a dosagem de proteínas totais foi construída a partir da resposta de absorção para cada concentração estabelecida e obtida a equação da reta (Figura 3).

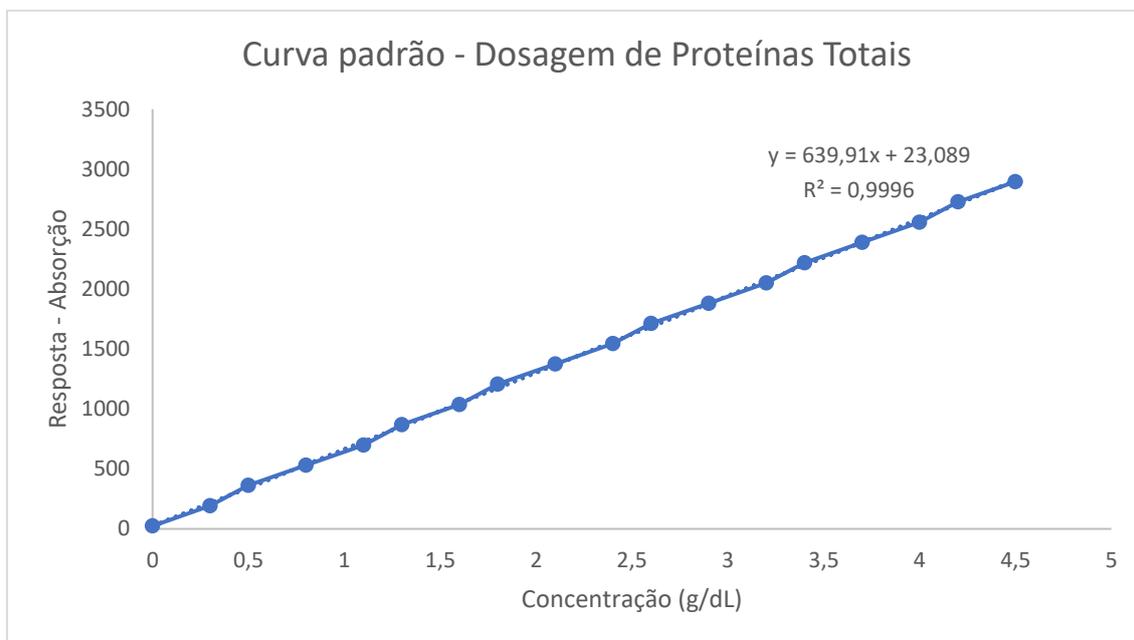


Figura 3 - Curva padrão de proteínas totais. Fonte: autoria própria.

A quantificação de AST, ALT, Fosfatase alcalina e Amilase foi realizada através de métodos cinéticos. Foi pipetado 50 μ L do soro dos animais e adicionado 1mL do reagente do kit analítico. Transferiu-se 200 μ L da amostra para a placa de 96 poços, incubou-se à 37°C por 1 minuto para realizar a leitura. Para cada quantificação foi utilizado kits analíticos específicos da marca Bioclin.

O perfil lipídico foi determinado utilizando método enzimático. Foi utilizado 10 μ L de amostra dos animais, 50 μ L da solução padrão e 50 μ L do branco. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos, após o período de incubação foi realizada a leitura no espectrofotômetro UV visível (ELISA) no comprimento de onda de 500nm.

A dosagem de glicose foi executada através do método enzimático/colorimétrico. Foi adicionado 10 μ L de amostra a 500 μ L de reagente branco e 500 μ L do padrão analítico em microplaca de 96 poços previamente incubadas a 37°C. A leitura foi realizada após o período de 10 minutos de incubação.

A metodologia utilizada para a dosagem de albumina foi verde de bromocresol, onde foi adicionado 10 μ L de amostra a 1000 μ L de reagente de branco e 1000 μ L do reagente padrão. Foi pipetado 200 μ L em microplaca de 96 poços previamente incubadas a 37°C. A leitura prosseguiu após o período de 10 minutos de incubação.

Os valores obtidos foram tabelados, analisados e os resultados expressos em suas respectivas unidades de medida especificadas por cada kit comercial adotado para quantificação.

Dosagem de Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺) no soro

As amostras de soro coletadas na eutanásia foram processadas para determinação da concentração de sódio e potássio. As leituras das concentrações de sódio e potássio foram realizadas em fotômetro de chamas, que se baseia na espectrometria atômica. Consiste na diluição da amostra com solução específica, as amostras são aspiradas e expostas à chama, promovendo a liberação de energia que são medidas em comprimentos de onda específicos ao eletrólito mensurado. Para cada eletrólito foi utilizado um padrão para calibração prévia do aparelho (LABTEST: dados de arquivo).

Histologia

Após a eutanásia dos animais, as esponjas que foram implantadas foram coletadas através de procedimento cirúrgico, identificadas para cada animal no seu devido grupo, pesadas em balança analítica e imergidas em solução de formaldeído tamponado 10% para fixação pelo período de 48h.

Os órgãos retirados (fígado, rins) foram identificados para cada animal e seus devidos grupos, limpos e imergidos em solução de formaldeído tamponado 10% para fixação pelo mesmo período de 48h.

Passadas as 48h, todos tecidos e esponjas foram retirados da solução de fixação e transferidos para solução de álcool 70°GL para aguardar o processamento para inclusão em resina e parafina.

Em etapa subsequente, as amostras dos tecidos e esponjas foram submetidas ao processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (80%,

90%, 95% e 100%) e posterior infiltração. Foram seccionados pedaços dos órgãos para serem emblocados com cerca de 5mm de tamanho. Em exceção às esponjas, que foi retirado o excesso de tecido suficiente para deixa-la de tamanho adequado ao molde.

Para a inclusão em resina, os cortes dos órgãos e as esponjas foram imersos em álcool 80% durante 30 minutos. Passado o tempo, todo o álcool foi retirado com auxílio de uma pipeta pasteur e descartado adequadamente.

Uma nova imersão foi realizada dos cortes e esponjas, agora em álcool 90%, durante 30 minutos. Após o tempo, foi retirado totalmente o álcool do recipiente e descartado de maneira adequada.

Foi adicionado álcool 95% aos cortes e esponjas e aguardado 30 minutos. Em seguida todo o álcool foi retirado, descartado e substituído por álcool 100% e aguardado o tempo de 40 minutos.

Ao final do tempo, todo o álcool foi retirado cuidadosamente. Foram utilizados frascos âmbar ou protegidos com papel alumínio e identificados com as designações das amostras para colocar o meio de infiltração nas amostras. Este meio de infiltração usado é a resina com o ativador. As amostras foram imersas em quantidade suficiente para cobri-las dentro do frasco com o auxílio de uma pipeta pasteur.

Os frascos foram apoiados de forma inclinada e deixados de repouso em overnight. No dia seguinte, foi retirado todo o meio de infiltração, armazenado em frasco âmbar e acondicionado em geladeira, garantindo que ele possa ser utilizado posteriormente.

Para o processo de inclusão nas formas, faz-se necessário utilizar um banho de gelo para armazenar a resina nova acrescida de ativador e endurecedor, esta resina foi preparada nas medidas indicadas pelo fabricante.

Previamente ao processo de inclusão, as amostras foram identificadas em uma folha de papel com a disposição dos poços da placa de polimerização, sendo colocado a designação de cada órgão ou esponja e a posição em que se encontra na placa para melhor identificação.

No fundo dos poços da placa de polimerização foram acrescidas algumas gotas de resina para inclusão (de 3 a 9 gotas) e em seguida foram posicionados os órgãos

e as esponjas nos poços da placa. Cada órgão e esponja foi coberto com resina até formar uma área côncava na superfície do poço. Em seguida a placa foi coberta com papel alumínio e levada à estufa a 38°C pelo período de 3 a 6 dias.

No processo que emprega a utilização de parafina, faz-se necessário o processo de desidratação das amostras que se encontram armazenadas em álcool 70%. Utiliza-se concentrações crescentes de álcool para este processo (80%, 90%, 100%), deixando as amostras imersas durante 30 minutos em cada concentração do álcool.

Após o processo de desidratação as amostras foram diafanizadas em xilol para tornar o tecido translúcido e posteriormente incluí-los em blocos de parafina. Os blocos de parafina contendo os tecidos foram submetidos ao processo de microtomia para obtenção de cortes histológicos com espessura de 4µm. Os cortes obtidos foram colocados sobre as lâminas de vidro e levados à estufa a 60°C para secagem. Com os tecidos aderidos à lâmina, faz-se a desparafinização em xilol e hidratação com concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 90%, 80% e 70%). As lâminas com os cortes foram lavadas com água corrente e, posterior secagem, foram corados com os corantes hematoxilina e eosina (HE).

Para corar as lâminas, faz-se a imersão delas no corante hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos, prosseguindo com a lavagem em água corrente e passagem rápida das lâminas em álcool acidulado. Posterior nova lavagem em água corrente, as lâminas foram imergidas no corante eosina (corante básico) por 30 segundos, e lavadas em água. Finalizando o processo, as lâminas já secas foram imersas em xilol e montadas com historesina e lamínula (LABIOCEL, 2002).

As imagens digitais dos órgãos e das esponjas foram obtidas com o auxílio de microscópio óptico acoplado a um scanner de lâminas histológicas. O software utilizado para leitura das lâminas foi o CaseViewer versão 2.4 - 3DHISTECH.

Análise Estatística

Os resultados obtidos nas análises foram tabelados e submetidos à análise de variância de duas vias (two way anova) para os parâmetros de Amilase, ALT, AST, Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais, Albumina, Colesterol Total, HDL colesterol,

Triglicerídeos, Glicose, Uréia, Creatinina, NAG, MPO e as dosagens de sódio e potássio no soro, seguidas por pós-teste de Tukey. O peso dos animais e o peso úmido das esponjas seguiram análise de duas vias com pós-teste de Bonferroni. O software utilizado para as análises foi GraphPad Prism 9.0. Os valores obtidos de cada análise encontram-se expressos seguindo as unidades de medida padrão para cada exame. As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e foram representadas nos gráficos por asteriscos.

6-Resultados e discussão

Dosagem dos compostos fenólicos e flavonóides

A dosagem dos compostos fenólicos e flavonóides presentes no extrato bruto da *Baccharis dracunculifolia* teve como intuito caracterizar a presença de compostos com atividade biológica de interesse para a execução do presente trabalho. Foi constatado a presença de compostos fenólicos e flavonóides e suas quantificações estão representadas a seguir.

A curva padrão de ácido gálico para a dosagem de compostos fenólicos foi realizada com o mínimo de 4 pontos segundo metodologia de PIRES (2017), obtendo-se a equação da reta $y = 0,0423x - 0,0767$. A curva padrão para a dosagem de flavonóides resultaram nas respectivas equações da reta para cada padrão utilizado: Rutina ($y = 0,0073x - 0,0165$) e Quercetina ($y = 0,0274x - 0,0175$). A quantidade de compostos encontrada no extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* analisado encontra-se demonstrado na tabela 7 a seguir:

Tabela 7 - Teor e quantidade de compostos no extrato etanólico de Baccharis dracunculifolia

Teor e quantidade de compostos fenólicos e flavonóides em extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

Composto	%(p/p)	µgEq/mg de extrato*
Fenólicos totais	4,37	43,7
Flavonóides (quercetina)	1,82	18,2
Flavonóides (rutina)	6,84	68,4

A análise de flavonóides foi procedida com o uso de dois padrões para se comparar as quantidades de flavonóides semelhantes aos respectivos padrões. Observou-se uma quantidade maior de flavonóides dosados com o padrão de rutina em comparação com o padrão de quercetina. Em seu trabalho, Marcucci (2020) discorrem sobre o uso da rutina e da quercetina na determinação de flavonóides totais, mostrando que o uso da rutina é empregado na determinação de flavonóides totais em material foliar da planta, onde ocorre o predomínio de glicosídeos (a rutina se apresenta como diglicosídeo). Quando utilizado a quercetina (uma substância aglicana), a dosagem encontrada de flavonóides totais em material foliar se apresentará em menor quantidade.

Índice de Polidispersão – Nanoformulação e placebo.

A dose proposta para produção da nanoformulação e utilização no tratamento dos animais pós cirurgia foi estabelecida em estudo que avaliou o efeito anti-hipertensivo de uma formulação nano estruturada contendo extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia* em ratos Wistar com sobrecarga de sódio (BATISTA, 2021).

Foram preparadas duas formulações (com extrato e o veículo). As formulações após preparadas necessitam de 48 horas de repouso para posteriormente ser realizado o teste de polidispersão.

O teste de polidispersão da primeira formulação foi realizado e para a formulação com o extrato de *B. dracunculifolia* os resultados para tamanho das partículas foram de 68,35nm ($\pm 0,5654$) e o índice de polidispersão encontrado foi de 0,106 ($\pm 0,011$), o que confere a formulação homogeneidade de tamanhos de partículas e formação de um sistema monodisperso (Figura 4).

Os resultados obtidos para o placebo demonstraram que o tamanho médio das partículas foi de 76,21nm ($\pm 0,2011$) e o índice de polidispersão foi de 0,127 ($\pm 0,005$), indicando uma homogeneidade nos tamanhos das partículas e um sistema monodisperso (Figura 5).

A segunda formulação teve o teste de polidispersão realizado e o resultado obtido para a formulação contendo o extrato mostrou que o tamanho médio das partículas foi de 76,38nm ($\pm 0,1650$) e o índice de polidispersão foi de 0,084 ($\pm 0,002$)

(Figura 6). Já a formulação contendo o veículo apresentou tamanho de partículas de 74,40 ($\pm 0,3252$) e um índice de polidispersão de 0,096 ($\pm 0,003$) (Figura 7). Os resultados indicaram que ambas as formulações apresentaram tamanho de partículas homogêneas e a formação de um sistema monodisperso.

Tadros (2004) e Nemen (2011) discorrem em seus trabalhos que uma nanoemulsão considerada estável e polidispersão adequadas devem possuir índice de polidispersão abaixo do valor de 0,3 e homogeneidade nos tamanhos das partículas. Colombo (2018) apresenta em seu estudo um pequeno valor para o índice de polidispersão no valor $< 0,2$. Syukri (2021) demonstra em seu estudo com nanoformulações que o índice de polidispersão das formulações realizadas variaram de 0,11 até 0,29. Os valores encontrados na avaliação das nanoemulsões preparadas condizem com os dados expressos na literatura (Figuras 4, 5, 6 e 7).

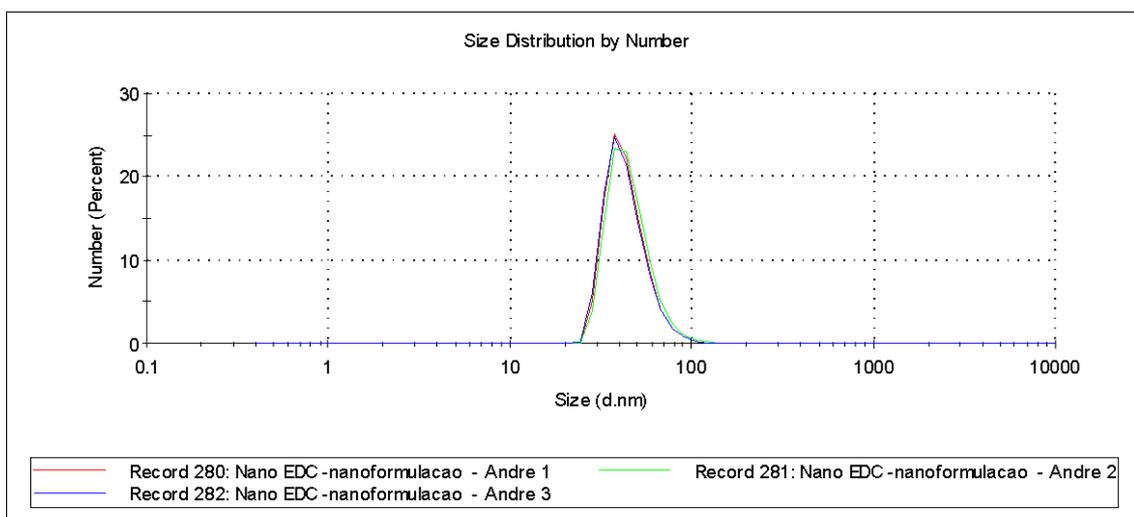


Figura 4 - Gráfico representativo do tamanho das partículas da nanoformulação contendo o extrato de DC.

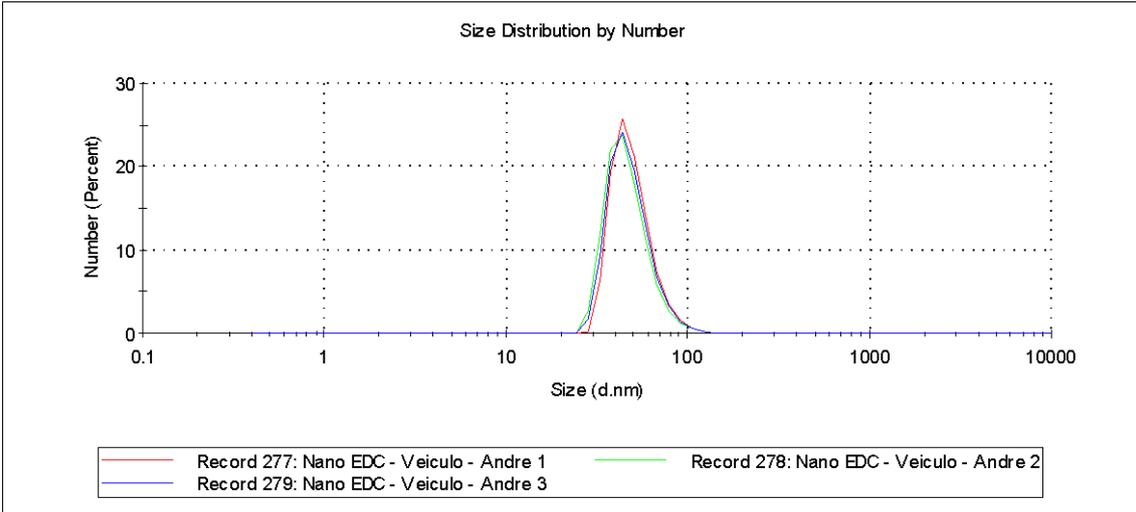


Figura 5 - Gráfico representativo do tamanho das partículas da nanoformulação do placebo.

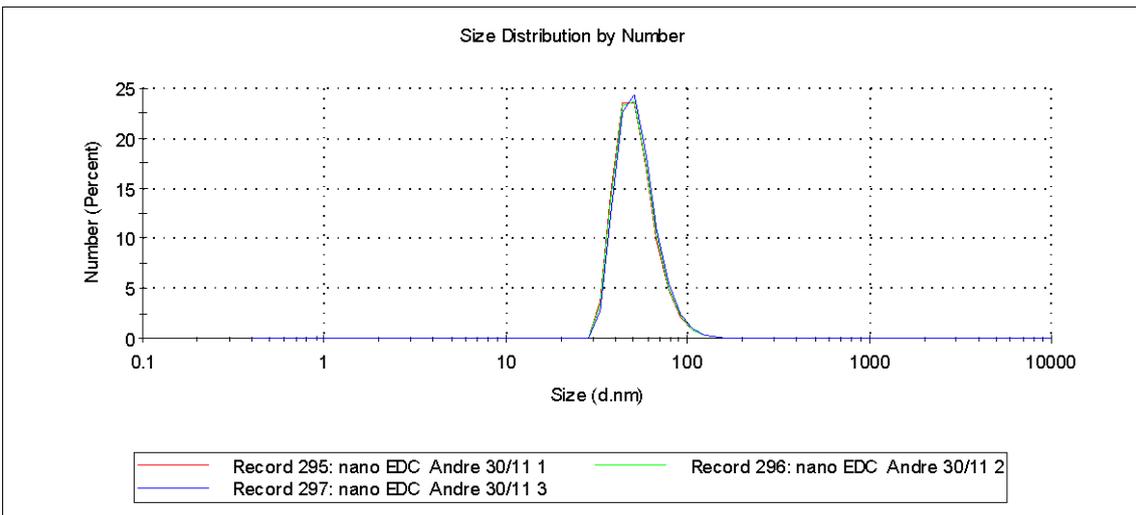


Figura 6 - Gráfico representativo do tamanho das partículas da nanoformulação contendo o extrato de DC.

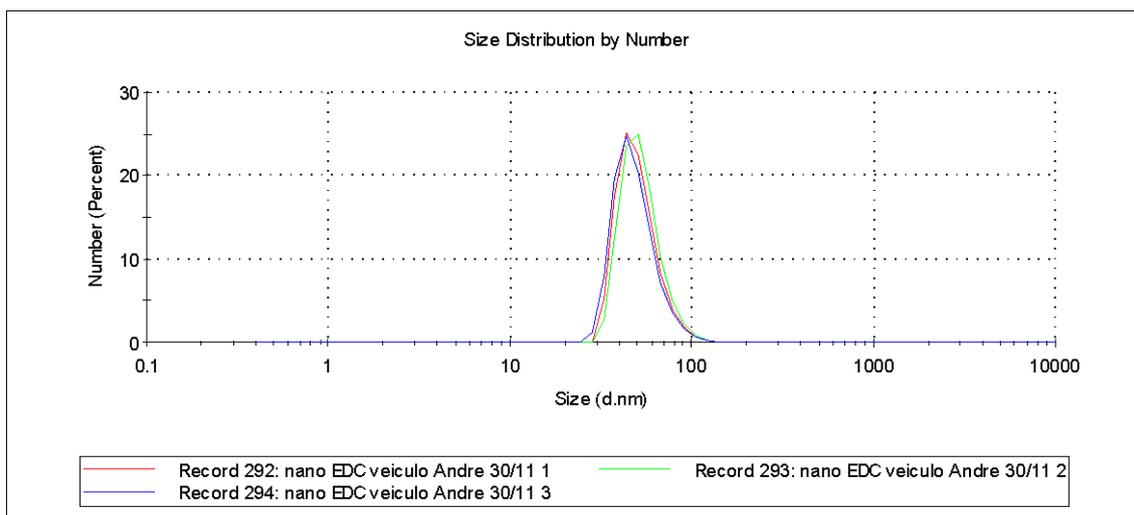


Figura 7 - Gráfico representativo do tamanho das partículas da nanoformulação do placebo.

Peso dos animais antes das cirurgias

Os pesos dos animais foram utilizados para avaliar se a combinação de dois eventos, um estado inflamatório local e a alta ingestão de sódio, que promove alterações fisiológicas e desenvolve um processo inflamatório sistêmico, promovendo alterações metabólicas que podem influenciar no ganho ou perda de peso. Cabe ressaltar que este trabalho apresenta um caráter inovador ao se realizar a técnica de implante de esponja em ratos da espécie Wistar.

Os pesos dos animais foram avaliados no dia do implante de esponja, mantendo-se a dieta respectiva para cada grupo (SD = 0,27% Na⁺ e HS = 0,90% Na⁺) e distribuindo entre grupo que recebeu o tratamento com placebo e grupo tratamento com a nanoformulação. Após 14 dias de tratamento, realizou-se a eutanásia, fazendo-se uma nova medida do peso dos animais antes do procedimento.

A análise dos pesos coletados foi realizada e os animais apresentaram um ganho de peso dentro dos grupos, mas não apresentaram uma variação de peso entre os grupos. Possivelmente o ganho de peso dentro dos grupos foi relacionado com a disposição dos animais individualmente nas caixas dentro do biotério, que não estimulou a competição pela alimentação sendo a oferta de alimento condicionada apenas ao apetite. A expectativa sobre o peso dos animais seria de alterações possivelmente induzidas por alterações das condições fisiológicas, como por exemplo: retenção hídrica, alterações absorptivas de nutrientes pelo intestino, ocasionadas pela

ingestão da dieta com alta ingestão de sódio e o tratamento com o extrato alcoólico de *Baccharis*. O peso inicial médio dos animais e o ganho de peso ao final dos 14 dias de tratamento para cada grupo avaliado foi de: SD (placebo) 393,9g e ganho de 17,6g; HS (placebo) 387,3g e ganho de 19,7g; SD (DC 50mg/kg) 391,9g e ganho de 12g e HS (DC 50mg/kg) 376,8g e ganho de 17,8g. Os valores de média de peso e desvio padrão das médias para cada grupo obtido foi: SD (placebo) = $402,7 \pm 8,8$; HS (placebo) = $397,2 \pm 9,85$; SD (DC 50mg/kg) = $397,9 \pm 6$ e HS (DC 50mg/kg) = $385,7 \pm 8,9$. O número amostral utilizado foi de 10 animais para cada grupo e o valor de p na análise é de $p=0,4537$ (Figura 8).

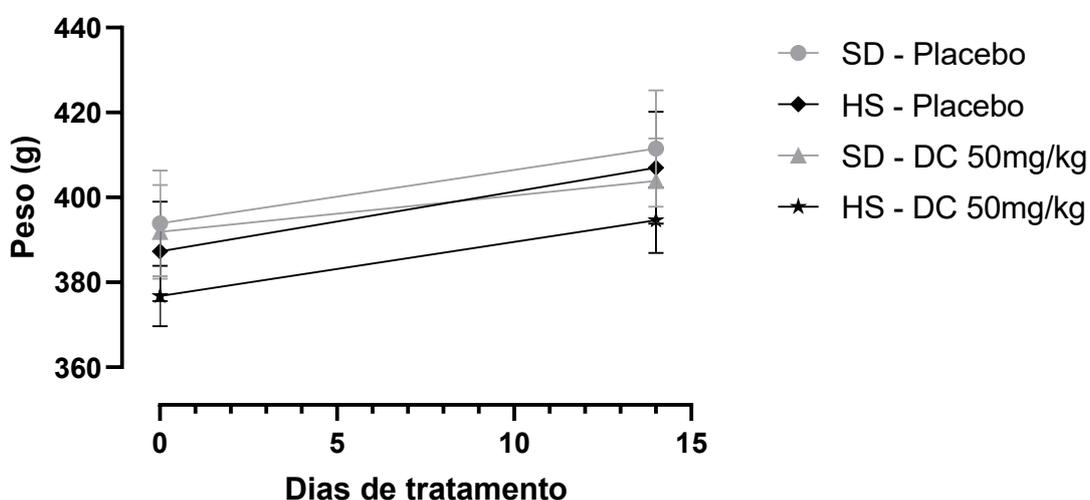


Figura 8 - Média dos pesos dos animais e desvio padrão das médias (SEM) avaliados antes do implante de esponja e após 14 dias de tratamento.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. Dia zero: medida de peso antes do implante de esponja, dia 14: medida de peso antes da eutanásia. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Bonferroni, $p=0,4537$.

Peso das esponjas pós eutanásia

O peso úmido das esponjas foi avaliado após o período de 14 dias do implante subcutâneo. A análise do peso úmido das esponjas foi associada com análises bioquímicas para correlacionar se a combinação de um evento inflamatório local com a ingestão de sódio influenciaria em estado inflamatório sistêmico. Além disso, o tratamento com a nanoemulsão de extrato de *B. dracunculifolia* foi proposto com o

objetivo de determinar se o tratamento teria alguma influência na expressão das enzimas NAG e MPO, alterando a expressão quantitativa de células inflamatórias dentro do ambiente da esponja. O tratamento com a nanoemulsão contendo o extrato de *Baccharis dracunculifolia* não influenciou no peso médio das esponjas analisadas dos animais que receberam a formulação com o extrato DC quando comparado com as esponjas dos animais que receberam a formulação placebo. A análise desse parâmetro não revelou diferenças significativas nos grupos estudados ($p=0,1552$). Para o grupo SD (placebo) o peso médio e o desvio padrão das médias em miligramas foi de $140,9 \pm 7,45$; o grupo SD (DC 50mg/kg) o peso médio e o desvio padrão em miligramas foi de $126,0 \pm 7,45$; o grupo HS (placebo) apresentou o peso médio e desvio padrão em miligramas de $138,5 \pm 5,84$ e o grupo HS (DC 50mg/kg) o peso médio e desvio padrão em miligramas foi de $150,2 \pm 5,84$. Foram analisadas 10 amostras para cada subgrupo (Figura 9).

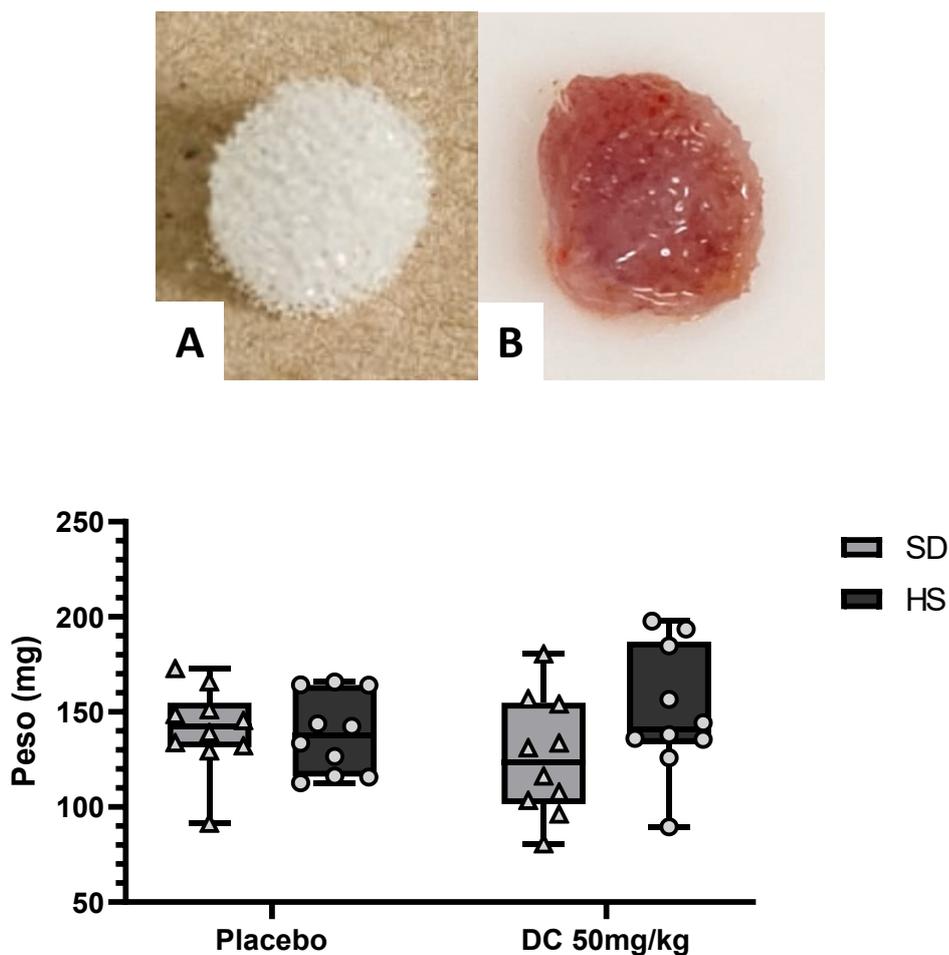


Figura 9 - Representação da esponja antes do implante e pós-implante. Gráfico de Peso úmido dos implantes de esponjas após retirada no período de 14 dias de implantação.

Figura A – Esponja pré-implante subcutâneo. Figura B – Esponja pós 14 dias de implante subcutâneo. SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Bonferroni, $p=0,1552$.

Análises bioquímicas

Função Hepática e Pancreática

Os exames bioquímicos foram realizados com o objetivo de determinar possíveis evidências de alterações da função hepática e pancreática promovidos no modelo experimental de dieta com alta ingestão de sódio e indução de estímulo inflamatório local e ainda, se o tratamento com a nanoemulsão de extrato alcoólico de *Baccharis* teria algum efeito citotóxico ou modulador nesses parâmetros.

A Alanina Aminotransferase (ALT), é uma enzima presente em reações bioquímicas no fígado. Sua análise tem a função de avaliar injúrias celulares hepáticas evidenciando que nem o tratamento e nem a dieta exerceu efeito hepatotóxico. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados ($p=0,6073$). A média e o desvio padrão da média para cada subgrupo apresenta-se nos valores de: 49,7 U/L($\pm 4,08$) para grupo SD – Veículo; 52,4 U/L ($\pm 3,33$) para o grupo HS – Veículo; 44 U/L ($\pm 1,83$) para o grupo SD DC 50mg/kg e 43,6 U/L ($\pm 2,14$) para o grupo HS DC 50mg/kg (Figura 10).

LIMA, Cláudio (2014) em seu trabalho sobre valores de referências de exames hematológicos e bioquímicos para ratos Wistar obteve dados que condizem com o presente trabalho. Para animais machos o valor médio e o desvio padrão de ALT relatado por LIMA (2014) foi de 57,55U/L ($\pm 11,95$). Já LIMA, Francisco (2018) encontrou os valores de 54,95U/L ($\pm 9,89$) para ratos da mesma linhagem, demonstrando que os valores obtidos neste experimento estão dentro do padrão esperado para esse modelo animal quando comparados com animais saudáveis. (Figura 10).

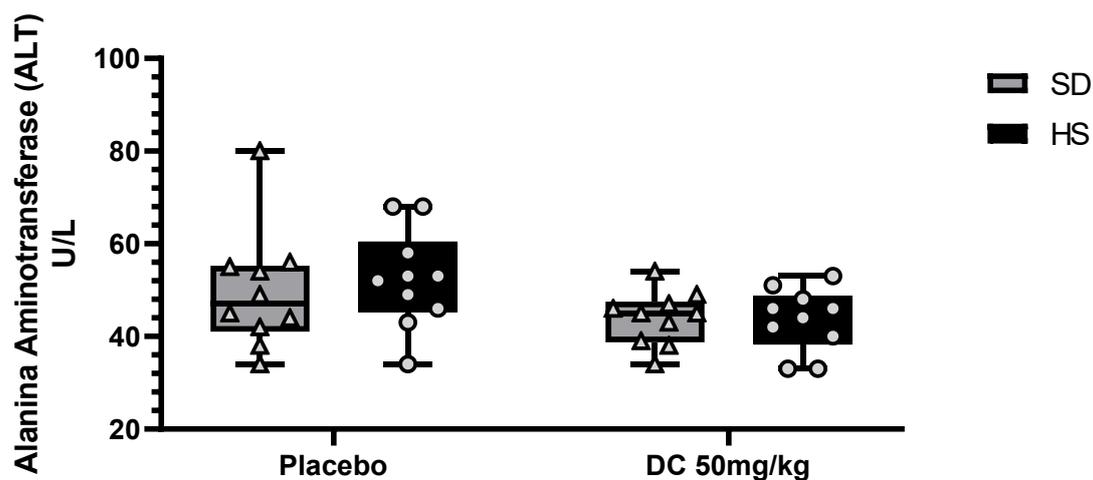


Figura 10 - Dosagem de Alanina Aminotransferase (ALT).

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova e pós-teste de Tukey, $p=0,6073$.

A Aspartato Aminotransferase (AST), enzima presente em organelas celulares como mitocôndrias e no citosol celular, promove a catalisação de transaminação reversível de aspartato e 2-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato. Seus valores podem ser induzidos por diversas doenças como por exemplo, hipóxia, acúmulo de lipídeos hepáticos, inflamações e intoxicações medicamentosas (Figura 11).

Os resultados indicaram que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados ($p=0,7432$). Os valores obtidos de média e desvio padrão para cada grupo foram: SD – Veículo = 130,1 U/L ($\pm 13,73$); HS – Veículo = 131,1U/L ($\pm 13,12$); SD DC = 103,7U/L ($\pm 10,22$) e HS DC = 112,3U/L ($\pm 8,07$). Ainda de acordo com LIMA, Cláudio (2014) os valores de referência para a análise de AST em ratos Wistar machos de 131,33 U/L ($\pm 43,98$) (Figura 11). Enquanto LIMA, Francisco (2018) discorre o valor de 104,35U/L ($\pm 12,8$), condizendo os valores dispostos por eles com as análises obtidas para esse modelo animal.

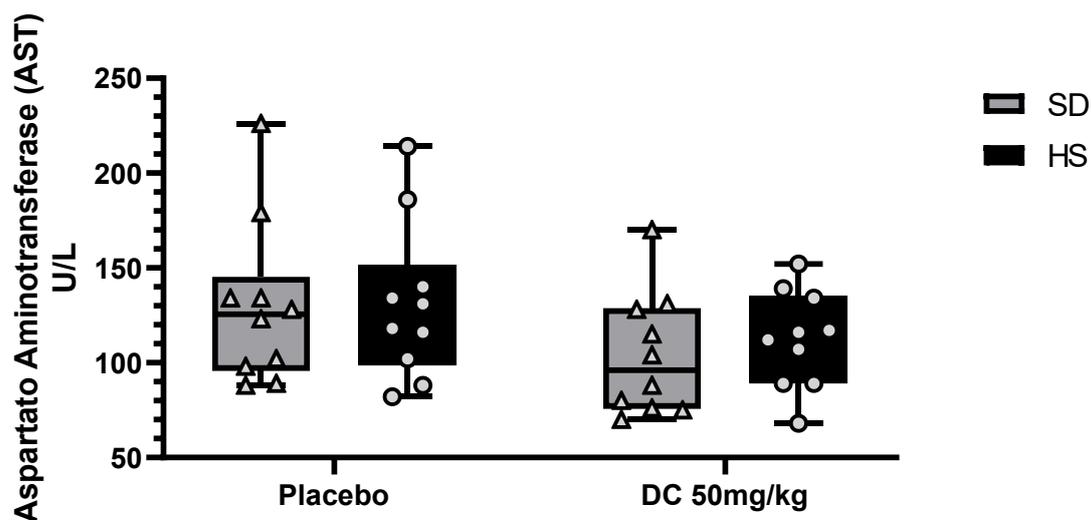


Figura 11 - Dosagem de Aspartato Aminotransferase (AST).

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova e pós-teste de Tukey, $p=0,7432$.

Na dosagem das Proteínas totais e dos níveis de Albumina avalia-se a funcionalidade do fígado frente aos estímulos inflamatórios e das condições metabólicas. A avaliação dos níveis de proteínas totais investiga a condição clínica metabólica referente à dieta e ao tratamento com a nanoformulação.

A análise estatística realizada para proteínas totais mostrou que não houve variação estatística significativa em nenhum grupo avaliado. O valor de p foi de 0,6412. As médias e desvio padrão para cada grupo foi de: SD (veículo) = 5,66g/dL ($\pm 0,052$); HS (veículo) = 5,66g/dL ($\pm 0,076$); SD (DC) = 5,58 g/dL ($\pm 0,091$) e HS (DC) = 5,66 g/dL ($\pm 0,109$) (figura 12). Em seu trabalho LIMA, Cláudio (2014) relataram o valor de 5,75g/dL ($\pm 0,87$). Castello Branco (2011) descreveram o valor de 6,1g/dL ($\pm 0,1$) para animais de um biotério universitário, corroborando com os valores achados nas análises realizadas. Ao avaliar os resultados observou-se que nem a dieta e nem o tratamento influenciaram no metabolismo hepático e não causaram alterações bruscas nos dados analíticos.

A análise estatística dos dados de albumina não indicou uma variação estatística entre os grupos e o valor de p obtido foi de 0,3930. Os valores obtidos de médias e desvio padrão para os grupos foram de: SD (veículo) = 3,32g/dL ($\pm 0,02$); HS (veículo) = 3,33g/dL ($\pm 0,033$); SD (DC) = 3,24g/dL ($\pm 0,030$) e HS (DC) = 3,3g/dL ($\pm 0,029$) (Figura 13). Os valores encontrados no trabalho de LIMA, Cláudio (2014) foram de 2,65g/dL ($\pm 0,30$), MELO (2013) relata o valor de 3,0g/dL ($\pm 0,12$) (Figura 12 e 13).

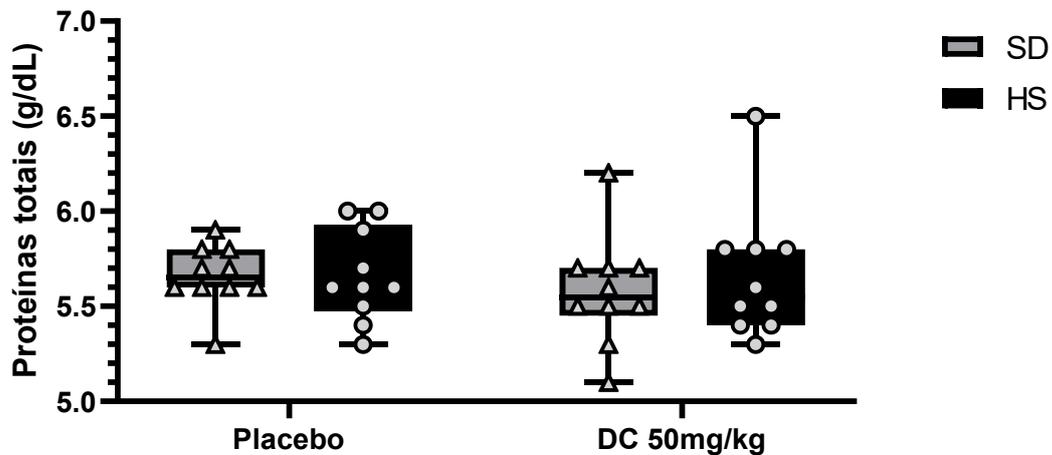


Figura 12 - Dosagem de Proteínas Totais.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova e pós-teste de Tukey, p=0,6412.

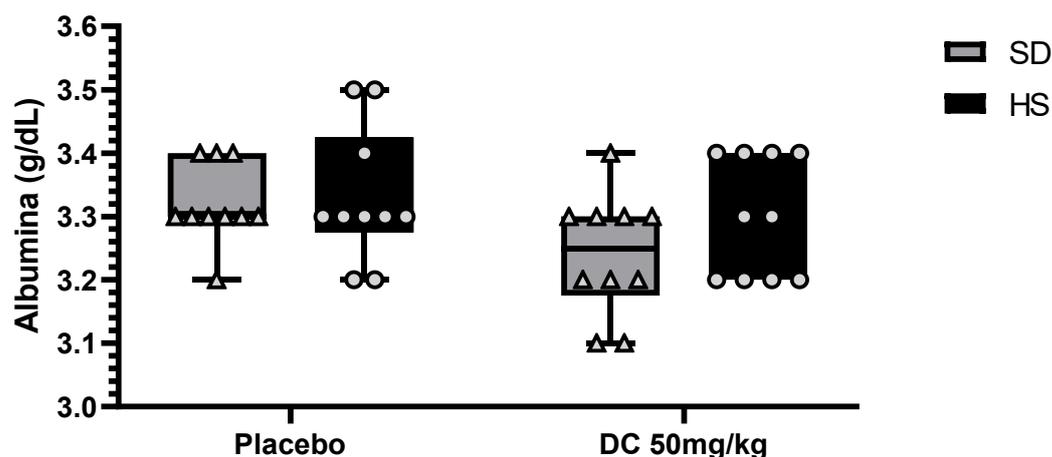


Figura 13 - Dosagem de Albumina.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova e pós-teste de Tukey, $p=0,3930$.

A enzima amilase, produzida pelo pâncreas e pelas glândulas salivares e que auxiliam a digestão de amido e glicogênio, ajuda na identificação de doenças pancreáticas que podem estar relacionadas com o mal funcionamento do pâncreas, além disso, seus níveis elevados no soro estão associados a alterações da função renal, como insuficiência renal por exemplo (LAM, 2021). Em seu trabalho avaliando parâmetros bioquímicos de ratos Wistar, ORLANDINI (2012) relata valores máximos de 1532u/L (± 172) e mínimo de 1308u/L (± 144) nas dosagens de amilase, sendo compatíveis com os valores encontrados nas análises do presente trabalho.

Ao se realizar a análise estatística dos valores encontrados, observou-se uma variação significativa da amilase entre os grupos HS (placebo) e HS (DC 50mg/kg) ($p=0,0442$), não tendo sido observada diferenças entre os demais grupos. Esta variação pode de alguma forma, estar relacionada ao tratamento com a nanoemulsão contendo o extrato de *Baccharis*. Torna-se evidente que o tratamento influenciou na expressão da enzima, o que pode estar relacionado aos processos de digestão de carboidratos (amido e glicogênio). Além do exposto, a ração utilizada para manutenção dos animais foi a @Nuvilab CR1 cujo teor de carboidratos totais é igual a 530g/kg. A busca por referências que indicassem os teores de carboidratos para espécie animal escolhida neste experimento evidenciou uma discrepância para estes

teores bem como em outras, não foram encontradas descrições dos valores em seus rótulos.

As médias e desvio padrão encontrados foram de: SD (veículo) = 1622u/L ($\pm 28,62$); HS (veículo) = 1669u/L ($\pm 60,53$); SD (DC) = 1576u/L ($\pm 34,46$) e HS (DC) = 1497u/L ($\pm 46,02$) (Figura 14).

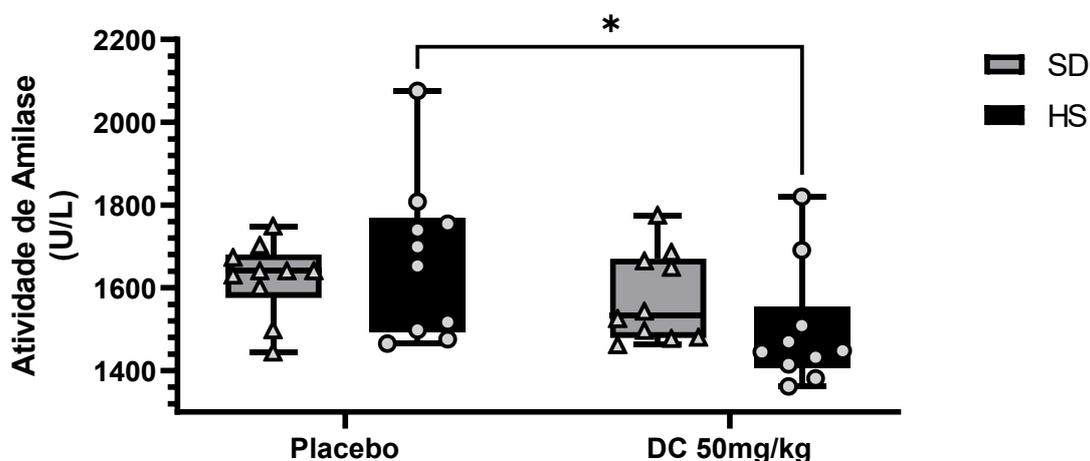


Figura 14 - Dosagem de Amilase.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. Diferença estatística entre grupos HS (placebo) vs HS (DC 50mg/kg), $p=0,0442$. SD – placebo ($n=10$); HS – placebo ($n=10$); SD – DC50mg/kg ($n=10$); HS – DC 50mg/kg ($n=10$). Teste two way anova e pós-teste de Tukey.

A fosfatase alcalina, uma enzima presente em células que circundam os ductos biliares do fígado, apresenta-se aumentada quando ocorre obstruções nos ductos biliares, colestase hepática ou doenças degenerativas do fígado. Pode ser encontrada também no tecido ósseo. Em seu trabalho LIMA, Cláudio (2014) relata valores de referência de 124u/L ($\pm 6,1$), enquanto ORLANDINI (2012) relata valores de 222u/L (± 44).

Na análise dos dados encontrados, observou-se uma variação estatística entre os grupos SD (veículo) e HS (DC 50mg/kg) com $p=0,0121$. Quando comparado ao grupo controle (SD placebo), o grupo HS (DC 50mg/kg) apresenta maior expressão da enzima fosfatase alcalina o que pode estar relacionada com a dieta de alta ingestão

de sódio, devido a alterações fisiológicas condizentes com estados inflamatórios sistêmicos além da metabolização da nanoformulação pelo fígado. SINGH (2021) discorre sobre a importância da fosfatase alcalina, principalmente presente no intestino, como protagonista antiinflamatório realizando a desintoxicação direta de moléculas pró-inflamatórias. Essa premissa se adequa a condição clínica estabelecida em nosso modelo experimental. Além do exposto, a nanoemulsão pode de alguma forma ter influenciado na expressão dos níveis dessa enzima, já que esse efeito foi observado apenas nos grupos que receberam o tratamento.

As médias e desvio padrão encontrados nas análises foram de: SD (veículo) = 101,4u/L ($\pm 5,93$); HS (veículo) = 118,7u/L ($\pm 6,83$); SD (DC) = 122,7u/L ($\pm 8,14$) e HS (DC) = 139,6u/L ($\pm 11,16$) (Figura 15).

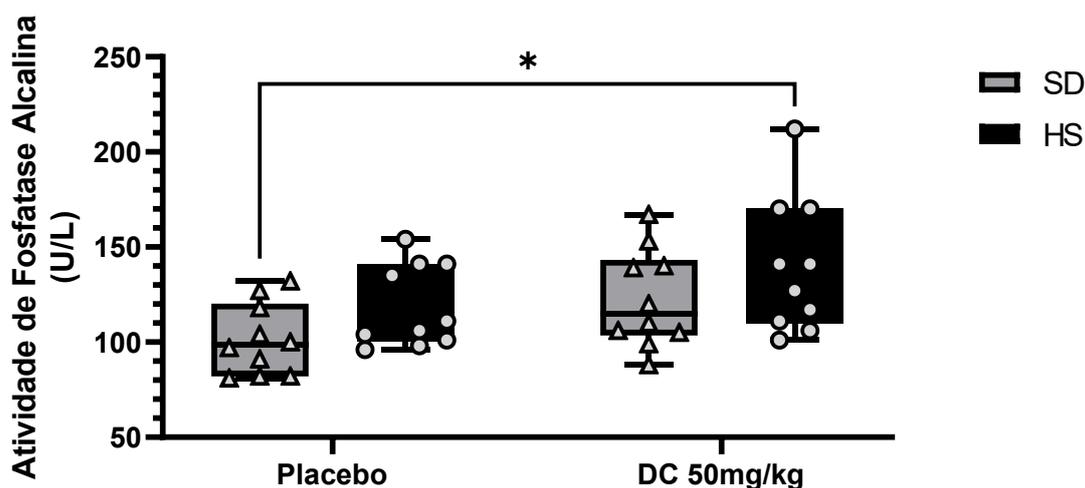


Figura 15 - Dosagem de Fosfatase Alcalina.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. Diferença estatística entre os grupos SD (placebo) vs HS (DC 50mg/kg). SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova e pós-teste de Tukey, $p=0,0121$.

Função Renal

A dosagem de creatinina e uréia no sangue pode ser um indicador de distúrbios na função renal como por exemplo, filtragem dos rins ou presença de substâncias em níveis anormais. A creatinina dosada no sangue separadamente pode ser derivada,

principalmente, do metabolismo muscular. Quando as dosagens se encontram alteradas no soro, a função renal já pode estar comprometida em 50%. Devido ser uma molécula pequena e circular não ligada às proteínas plasmáticas, o que facilita sua filtração a nível glomerular (HUIDOBRO, 2018). Para consolidar, a dosagem de uréia é necessária para alinhar o diagnóstico, porém a creatinina ainda é considerada um indicador mais confiável para diagnóstico. LIMA, Cláudio (2014) ao fazer seu referencial bibliográfico relata os valores de 0,5mg/dL ($\pm 0,07$) para creatinina e 48mg/dL ($\pm 7,6$) para a uréia. Castello Branco (2011) apresentam os valores de 45mg/dL ($\pm 2,3$) para o parâmetro de uréia e 0,3mg/dL ($\pm 0,1$) para a creatinina. Estando os valores analisados no presente trabalho dentro dos valores na literatura.

As análises estatísticas dos dados coletados para creatinina mostraram diferença estatística entre os grupos SD (placebo) e SD (DC 50mg/kg) com $p=0,0482$. Observa-se que o tratamento no grupo com dieta controle influenciou na concentração de creatinina plasmática o que pode estar relacionado a alterações decorridas da metabolização e/ou excreção da nanoemulsão com o extrato. Os valores médios e os desvios padrões para cada grupo foram: SD (veículo) 0,679mg/dL ($\pm 0,02$); HS (veículo) 0,709mg/dL ($\pm 0,018$); SD (DC) 0,775mg/dL ($\pm 0,037$) e HS (DC) 0,716mg/dL ($\pm 0,016$) (Figura 16).

Para as análises de uréia não foi observado diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p=0,9071$). Os valores médios e desvios padrões para os grupos foram: SD (veículo) 41,4mg/dL ($\pm 0,65$); HS (veículo) 39,8mg/dL ($\pm 1,49$); SD (DC) 42,3mg/dL ($\pm 1,38$) e HS (DC) 41mg/dL ($\pm 1,39$) (Figura 17).

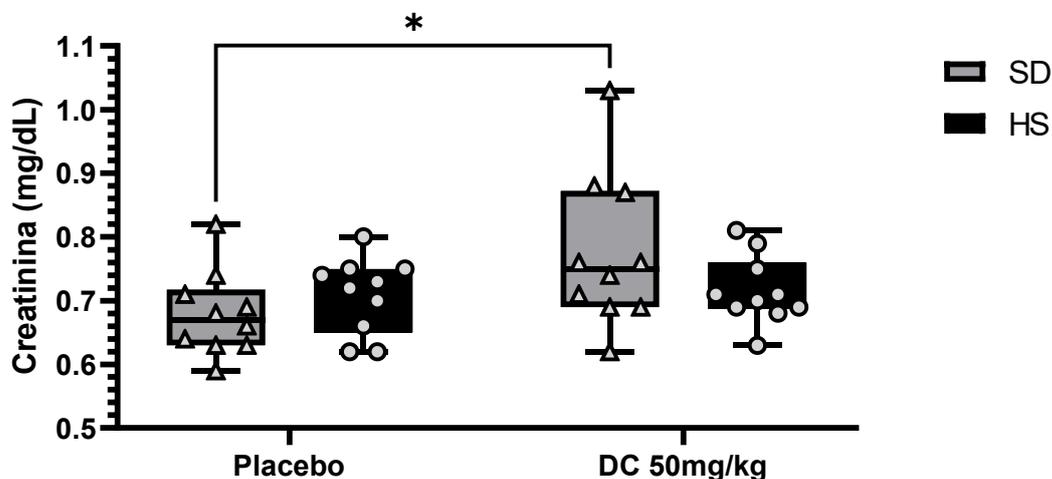


Figura 16 - Dosagem de Creatinina.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. Diferença estatística entre os grupos SD (placebo) e SD (50mg/kg). SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,0482$.

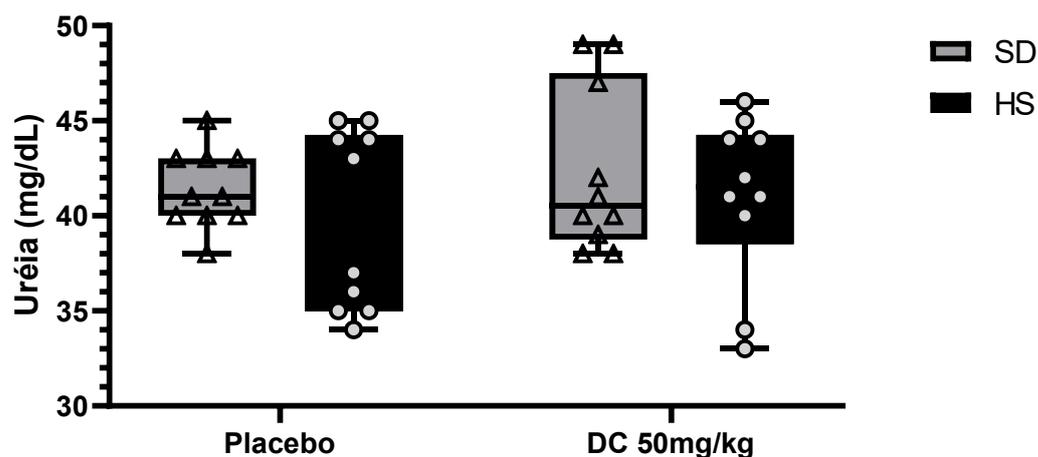


Figura 17 - Dosagem de Uréia.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,9071$.

Dosagem de glicose

A glicose, um nutriente de fácil metabolização pelo organismo como principal fonte energética no metabolismo celular. A mensuração dos níveis de glicose no sangue pode sinalizar o estado funcional do pâncreas na liberação de insulina na corrente sanguínea. A dosagem de glicose obtida das amostras coletadas quando analisados estatisticamente estes valores, não demonstraram significância, tendo suas médias e desvio padrão demonstrados a seguir: SD (veículo) 336,8mg/dL ($\pm 16,41$); HS (veículo) 387mg/dL ($\pm 21,84$); SD (DC) 403mg/dL ($\pm 20,17$); HS (DC) 371,2mg/dL ($\pm 19,25$). A análise estatística obteve um $p=0,1725$ para este parâmetro (Figura 18).

Os valores encontrados em outros trabalhos, como de ORLANDINI (2012), onde relata-se o valor de 216mg/dL (± 41), LIMA, Cláudio (2014) em que se encontra o valor de 138,72mg/dL ($\pm 30,17$) e ROBERTO (2018) ao qual descreve o valor de 245,13mg/dL ($\pm 31,0$) indicam que os níveis detectados nos diferentes grupos encontram-se mais elevados que o esperado para esses animais. Deve-se levar em consideração que estes autores submeteram os animais a um jejum de 12 horas sem ingestão de ração para realização da coleta de sangue e análise. Em nosso experimento, não foi realizado o mesmo procedimento, o que explica em parte a diferença entre os valores obtidos quando comparado aos valores obtidos pelos autores citados.

Os autores LOPES (2021) e SANTOS, Monique (2019) discorrem sobre a flexibilização do jejum para exames laboratoriais, principalmente para o perfil lipídico, onde eles alegam que o estado de jejum não demonstra o estado fisiológico do indivíduo na realidade, pois o mesmo não exibe o perfil de realizar jejum periodicamente e em suas pesquisas eles não evidenciaram variações estatísticas pertinentes para as quantificações dos exames laboratoriais. O fato de optarmos pela não realização do jejum prévio em nosso trabalho se deu em função da escolha de um estado mais próximo ao da realidade para os indivíduos nessas condições de saúde, ou seja, indivíduos portadores de co-morbidades e com outras desordens metabólicas.

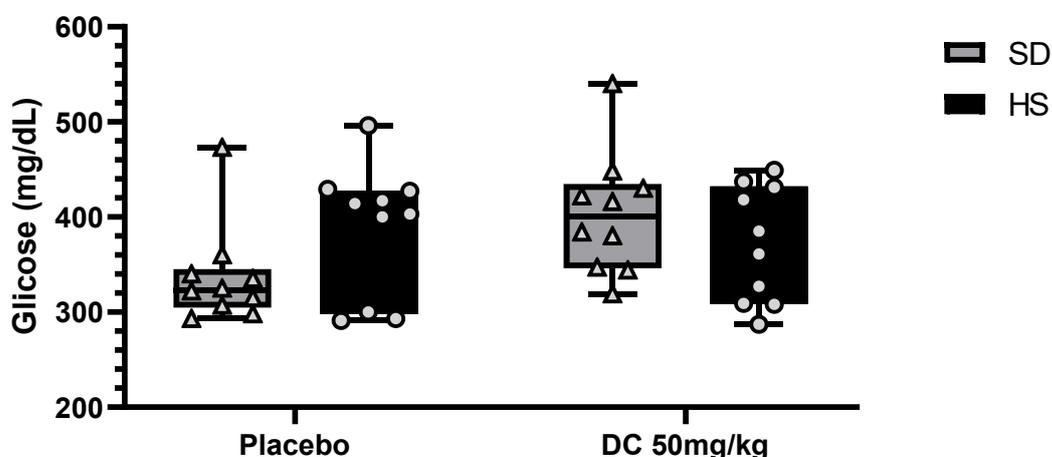


Figura 18 - Dosagem de Glicose.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, p=0,1725.

Perfil lipídico

O perfil lipídico, conjuntos de exames para determinar níveis de LDL colesterol, HDL colesterol, triglicerídeos e colesterol total no sangue, quando alterados, apresentam risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Os valores detectados em todos os grupos experimentais não evidenciaram diferença estatística significativa (Figuras 19, 20 e 21). Os valores das médias e seus respectivos desvios padrão encontram-se representados na tabela abaixo (tabela 8), expressos em mg/dL. Para o parâmetro LDL colesterol os valores não foram mensurados níveis expressivos passíveis de detecção pelo método empregado (Tabela 8).

Tabela 8 - Perfil Lipídico

Grupos	Colesterol total	HDL colesterol	LDL colesterol	Triglicerídeos
SD (veículo)	55 ± 1,85	41,8 ± 2,04	**	122,8 ± 11,72
HS (veículo)	57,6 ± 2,08	40,9 ± 2,64	**	125,2 ± 18,51
SD (DC)	52,7 ± 2	40 ± 1,59	**	110,7 ± 11,13
HS (DC)	51,6 ± 1,28	38 ± 1,70	**	110,5 ± 13,02

Valores de médias expressos em mg/dL com seus respectivos desvios padrões. **LDL colesterol, não foi possível mensuração. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p<0,05. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10).

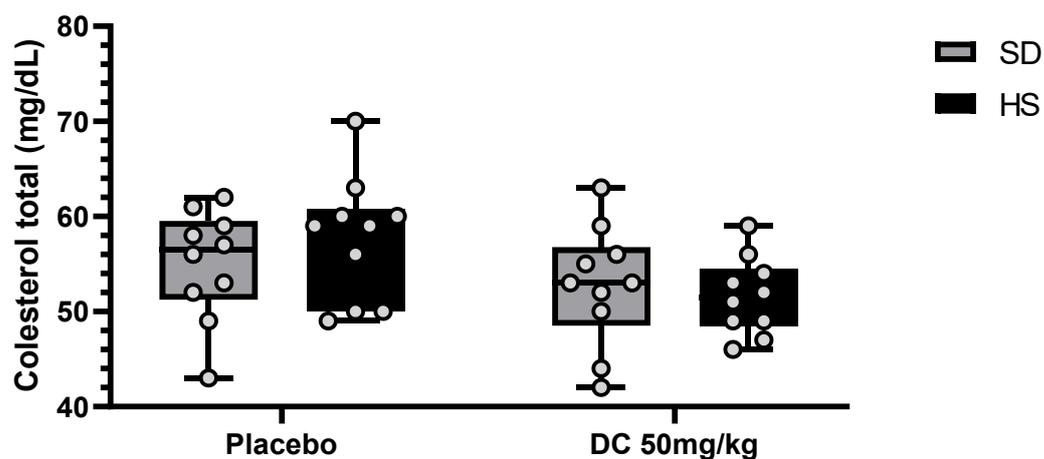


Figura 19 - Dosagem de Colesterol Total.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,3191$.

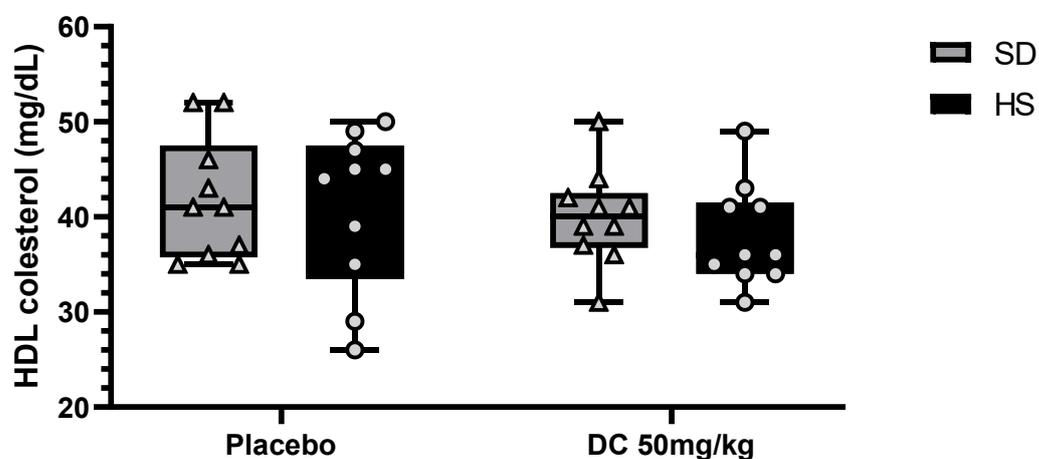


Figura 20 - Dosagem de HDL Colesterol.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,7892$.

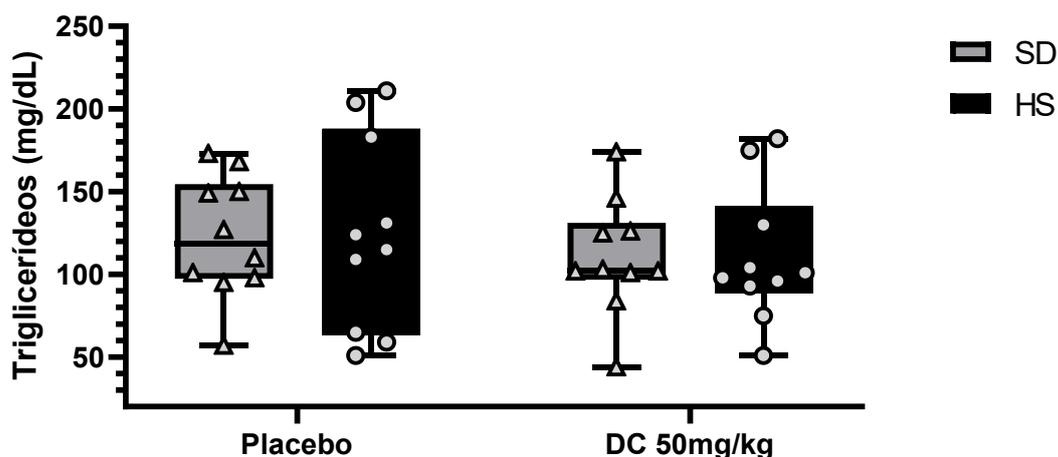


Figura 21 - Dosagem de Triglicerídeos.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,9260$.

ROBERTO (2018) e LIMA, Francisco (2018) realizaram testes para determinar o perfil lipídico de ratos wistar submetendo-os a um jejum de 12 horas antes da coleta de sangue para as análises. Os valores encontrados pelos autores encontram-se expressos em md/dL na tabela abaixo (Tabela 9):

Tabela 9 - Perfil Lipídico (segundo os autores)

Autores	Colesterol total	HDL colesterol	LDL colesterol	Triglicerídeos
ROBERTO (2018)	54,69 ± 22,15	17,50 ± 14,04	**	64,49 ± 27,30
LIMA, Francisco (2018)	62,95 ± 14,23	23,1 ± 4,12	1325,1 ± 144	60,35 ± 11,86

Valores de médias expressos em mg/dL com seus respectivos desvios padrões. **LDL colesterol, valor não relatado no trabalho do autor.

LIMA, Francisco (2018) relatam o valor para LDL em seu trabalho, enfatizam que não foram encontrados valores para este parâmetro na literatura. Nossos resultados indicam ao manter a dieta normalmente e não proporcionar um jejum de 12 horas para a coleta das amostras pode ter influenciado os valores das dosagens para o perfil lipídico.

Dosagem de Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺)

A reabsorção de sódio pelos túbulos renais é um dos principais fatores que aumentam o consumo de oxigênio renal e a hipóxia das células epiteliais tubulares dos rins concomitante ao aumento de transporte de fluidos nos túbulos exerce um papel importante no desenvolvimento de danos nas estruturas celulares dos túbulos renais. A sobrecarga primária de sódio que chega aos túbulos renais pode ser capaz de desencadear eventos que aumentam a demanda de oxigênio e induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), iniciando uma reação inflamatória (ROSÓN, 2006).

Os valores das médias e desvios padrões encontrados nas dosagens realizadas estão apresentados na tabela abaixo, com valor de $p=0,6171$ para sódio e $p=0,2914$ para potássio (Tabela 10) e não foi evidenciado diferenças estatísticas nos valores encontrados:

Tabela 10 - Dosagem de sódio e potássio - Soro (mmol/L)

Grupos	Na ⁺ - Soro	K ⁺ - Soro
SD (veículo)	147,4 ± 0,68	6,80 ± 0,36
HS (veículo)	147,4 ± 1,13	6,94 ± 0,21
SD (DC)	146,6 ± 1,55	7,79 ± 0,61
HS (DC)	145,3 ± 1,50	7,04 ± 0,32

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. Valores de médias expressos em mmol/L com seus respectivos desvios padrões. SD – placebo (n=7); HS – placebo (n=7); SD – DC50mg/kg (n=7); HS – DC 50mg/kg (n=7); $p=0,6171$ (sódio) e $p=0,2914$ (potássio).

Autores como MELO (2013) e LIMA, Cláudio (2014) realizaram análises de sódio e potássio em soro e encontraram valores que se assemelham aos valores encontrados no presente trabalho como demonstrado em tabela seguinte (Tabela 11).

Tabela 11 - Dosagem de sódio e potássio - Soro (segundo autores - mmol/L)

Autores	Na ⁺ - Soro	K ⁺ - Soro
MELO (2013)	138,7 ± 3,06	4,7 ± 0,53
LIMA, Cláudio (2014)	134,03 ± 4,67	5,41 ± 1,15

Valores de médias expressos em mmol/L com seus respectivos desvios padrões. **valores não analisados pelos autores.

Dosagem de N-Acetil- β -D-Glicosaminidase (NAG) e Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação da atividade das enzimas inflamatórias NAG e MPO foi realizada no pellet obtido do homogeneizado centrifugado da esponja extraída dos animais, e correlaciona-se a atividade para o recrutamento de células inflamatórias no ambiente da esponja durante o processo inflamatório.

Em seu trabalho, utilizando extrato aquoso de própolis verde, MOURA (2011) relata que ao avaliar a atividade de NAG do grupo tratado comparado ao grupo controle houve uma diminuição de ~50% desta atividade. Em contrapartida a atividade de MPO não foi afetada pelo tratamento com própolis em seu estudo. No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas em ambas as análises de atividade enzimática (NAG, $p=0,0895$) e (MPO, $p=0,7874$), podendo estar relacionada com a concentração do extrato utilizada na nanoemulsão, quantidade de doses administradas aos animais ou tempo de tratamento. Representado nos gráficos abaixo (Figuras 24 e 25).

Estatisticamente não houve alterações significativas, para atividade de NAG ($p=0,0895$) e MPO ($p=0,7874$) nas análises do conteúdo das esponjas, como é representado nos gráficos abaixo (Figuras 24 e 25).

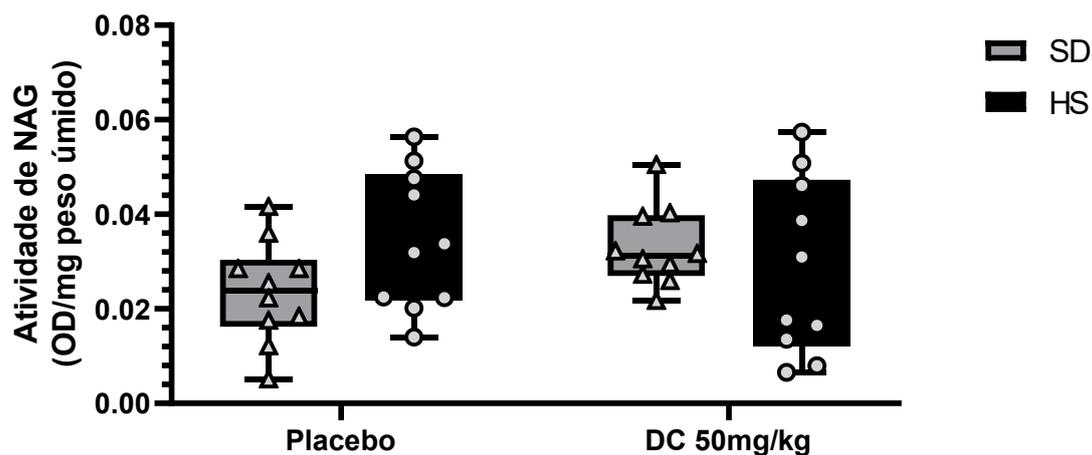


Figura 22 - Dosagem de Atividade de NAG.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. No eixo y estão expressos os valores

encontrados em densidade óptica (OD)/mg peso úmido da esponja, no eixo x estão demonstrados os grupos de tratamento (veículo e nanoformulação) e dieta (SD e HS). As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,0895$.

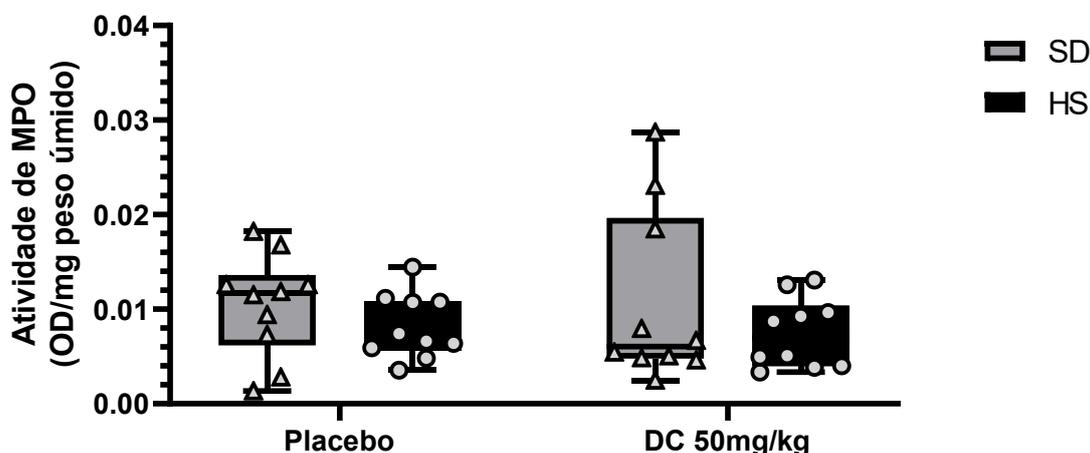


Figura 23 - Dosagem de Atividade de MPO.

SD (placebo): grupo dieta controle com tratamento placebo; HS (placebo): grupo dieta de alto teor de sódio com tratamento placebo; SD DC 50mg/kg: grupo dieta controle com tratamento com extrato de DC; HS DC 50mg/kg: grupo dieta com alto teor de sódio e tratamento com extrato de DC. No eixo y estão expressos os valores encontrados em densidade óptica (OD)/mg peso úmido da esponja, no eixo x estão demonstrados os grupos de tratamento (veículo e nanoformulação) e dieta (SD e HS). As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10). Teste two way anova com pós-teste de Tukey, $p=0,7874$.

Achados histológicos hepáticos, renais e nas esponjas

O fígado é responsável pela concentração e metabolização da maioria das drogas e toxinas. É exatamente por esse motivo que algumas substâncias podem gerar hepatotoxicidade. Além dos hepatócitos, ductos e canalículos biliares, o endotélio vascular e as células estreladas podem ser afetados. A hepatotoxicidade relacionada às drogas é um evento comum. Está presente em mais de 10% das reações adversas aos medicamentos. A lesão hepática induzida por drogas é responsável por 30% dos casos de hepatite aguda e por mais de 50% dos de icterícias agudas. A classificação da lesão hepática relacionada às drogas é estabelecida de acordo com a apresentação clínica, os achados laboratoriais e histológicos e também pelo mecanismo de toxicidade. De forma similar, o aparelho renal, sendo o

responsável pelo processo de filtração e eliminação dos resíduos farmacológicos, também é afetado pelos processos citotóxicos podendo o órgão desenvolver desde uma glomerulonefrite tóxica a uma insuficiência renal crônica, principalmente em se tratando de drogas cuja estratégia terapêutica aplicada a longo prazo.

Com o objetivo de se avaliar o impacto das formulações nos rins e fígado, ambos os tecidos foram coletados em todos os animais (grupo controle e grupo tratado) e submetidos a processamento histológico. Os tecidos foram submetidos à coloração de rotina (Hematoxilina e Eosina) e foram analisados de acordo com o padrão histopatológico exibido.

A morfologia do fígado dos animais de ambos os grupos demonstrou que não houve qualquer alteração estrutural na organização dos hepatócitos, ductos, vasos ou artérias ou células estreladas. Os hepatócitos apresentavam citoplasma homogêneo, de formato poliédrico sem alterações degenerativas. O núcleo em sua maioria exibia nucléolo evidente sem sinais de formações picnóticas. Não foi observado em nenhum dos animais de ambos os grupos, sinais de necrose ou alterações conjuntivas da matriz extracelular. Em nenhum animal, foi observada a presença de hemorragia ou infiltrado inflamatório (Figura 26).

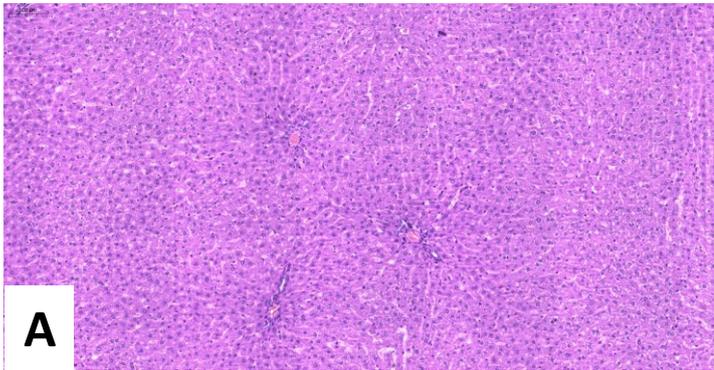
Em relação ao tecido renal, não foram observadas alterações na morfologia glomerular ou glomerulonefrite evidente, bem como a presença de degeneração e/ou cilindros hialinos intratubulares indicativos de nefrotoxicidade em nenhum dos grupos avaliados (Figura 27).

A matriz esponjosa foi bem tolerada por todos os animais. Nenhum sinal de infecção ou rejeição do implante foi observado no compartimento da esponja durante os 14 dias do experimento. Os implantes de ambos os grupos (controle e tratado) evidenciaram o crescimento de um estroma fibrovascular, com grande produção de fibras colágenas espessas, dispostas de forma aleatória em torno das trabéculas esponjosas (fig 28 A, C e D) na tentativa de isolar as áreas remanescentes de matriz esponjosa. O perfil inflamatório foi constituído predominantemente por células mononucleares (macrófagos e linfócitos) além da expressiva quantidade de fibroblastos (fig 28 B). A matriz apresentava-se vascularizada com vasos de diferentes calibres distribuídos na porção periférica dos implantes e em torno das áreas isoladas pelos aglomerados celulares (fig 28 B, C e D).

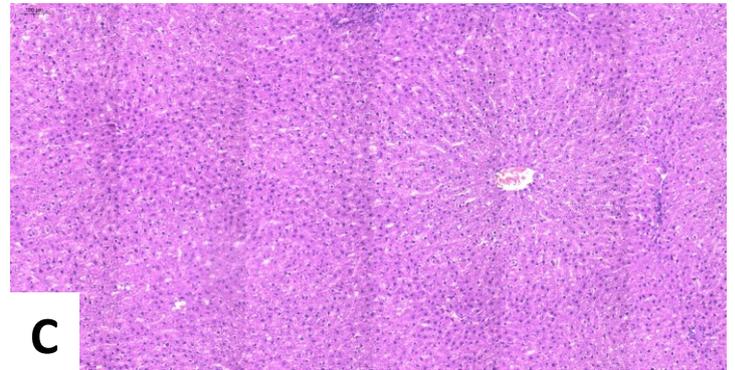
De forma interessante, os grupos que receberam a nanoformulação contendo a DC evidenciou um estroma mais robusto, com maior densidade de células, especialmente macrófagos, e maior deposição de fibras colágenas Fig 28 C e D.

Cortes Histológicos de Fígado

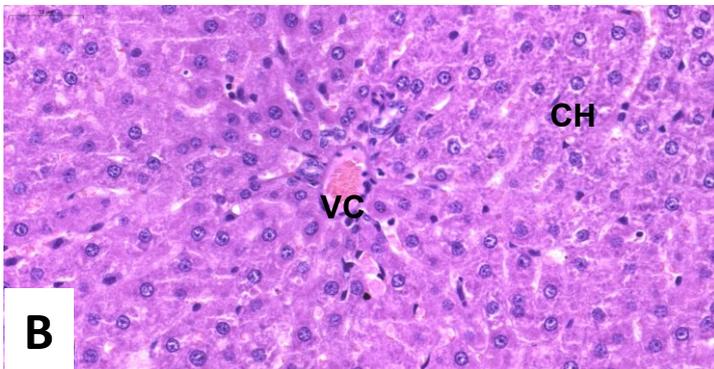
Grupo SD - placebo 10x



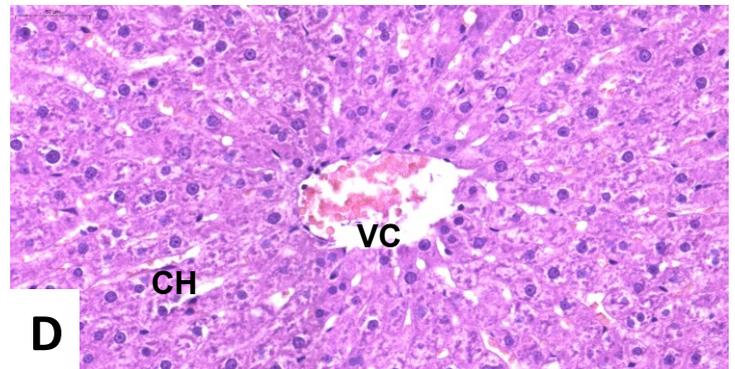
Grupo HS - placebo 10x



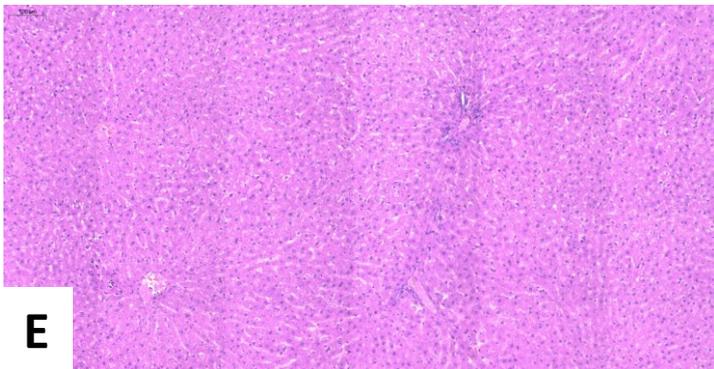
Grupo SD - placebo 40x



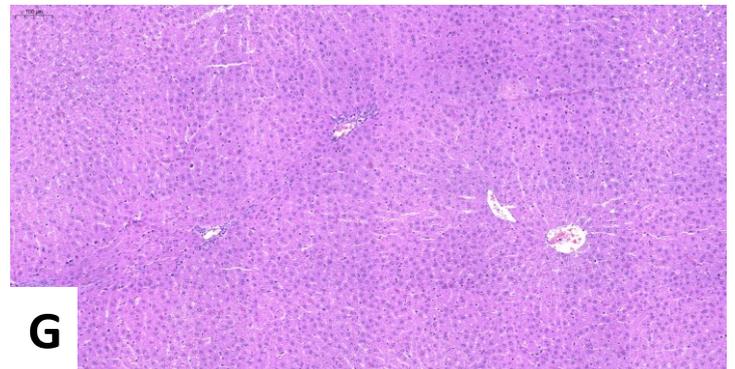
Grupo HS - placebo 40x



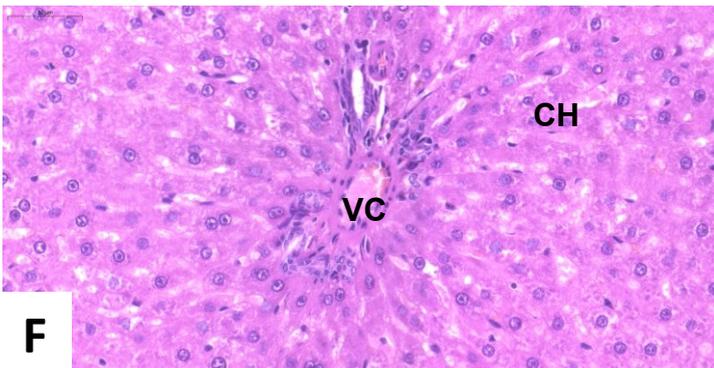
Grupo SD - DC 50mg/kg 10x



Grupo HS - DC 50mg/kg 10x



Grupo SD - DC 50mg/kg 40x



Grupo HS - DC 50mg/kg 40x

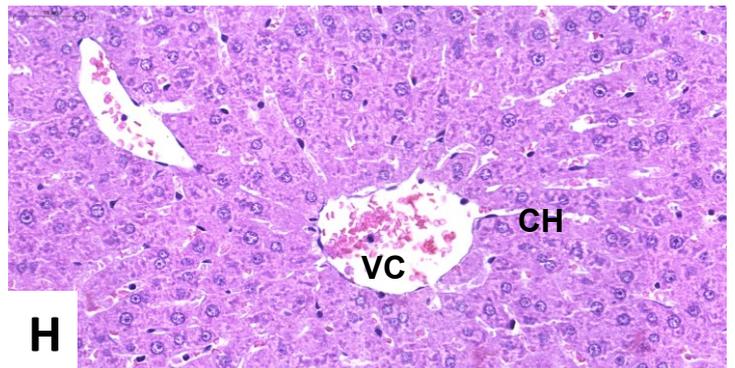
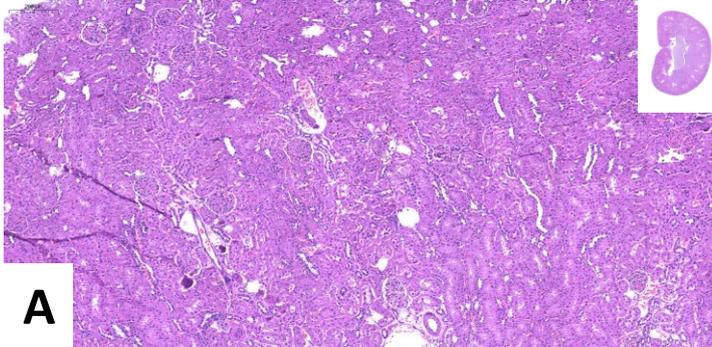


Figura 24 - Histologia Representativa do Fígado dos Animais.

Análise histológica do fígado (aumento óptico 10x e 40x), coloração HE. Figuras A e B representam grupo controle SD (placebo); Figura C e D representam grupo HS (placebo). Figura E e F representam grupo SD (DC 50mg/kg - tratados) e figura G e H representam grupo HS (DC-50mg/kg - tratados). Legenda: VC – vaso sanguíneo central, CH – cordão de hepatócitos. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10).

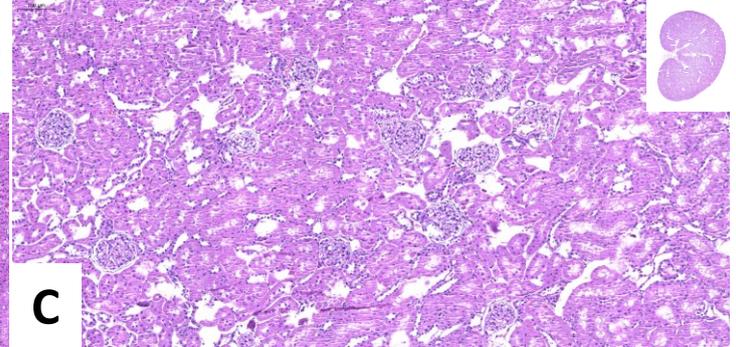
Cortes Histológicos de Rim

Grupo SD - placebo 10x



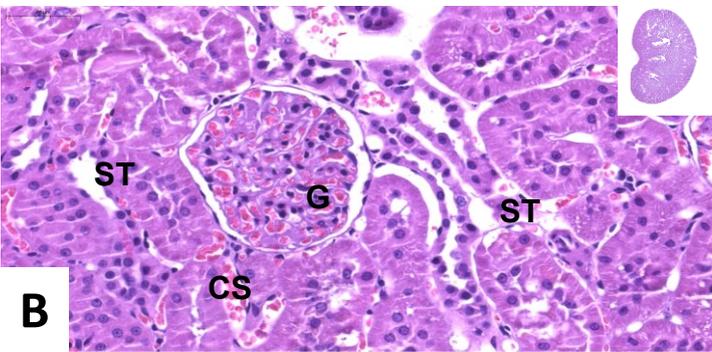
A

Grupo HS - placebo 10x



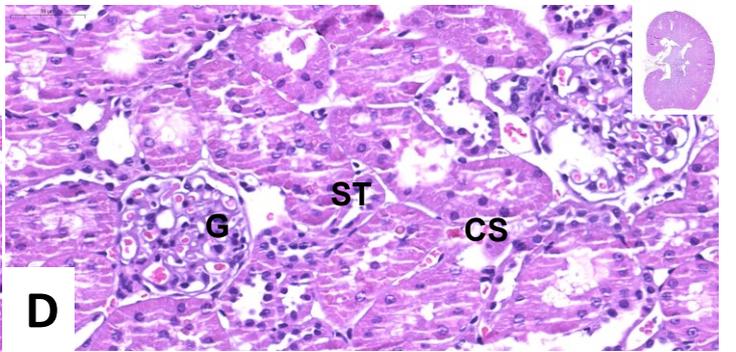
C

Grupo SD - placebo 40x



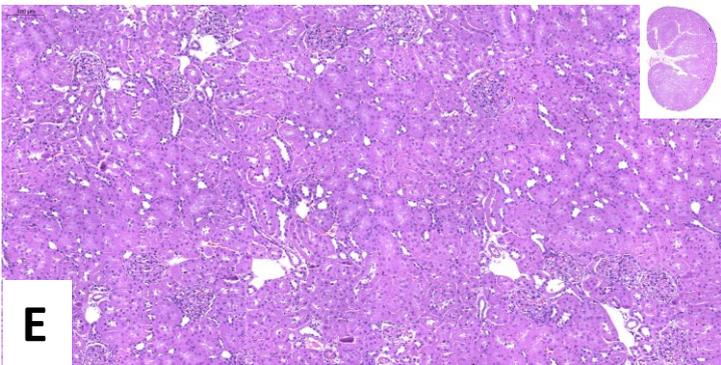
B

Grupo HS - placebo 40x



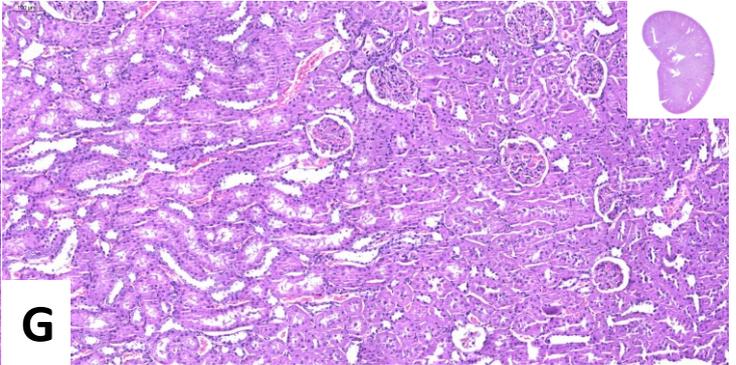
D

Grupo SD - DC 50mg/kg 10x



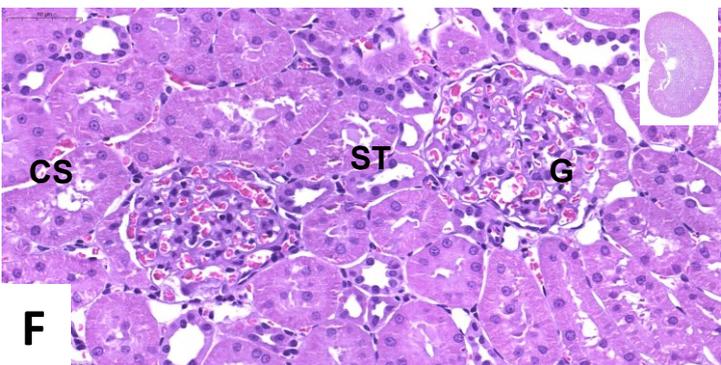
E

Grupo HS - DC 50mg/kg 10x



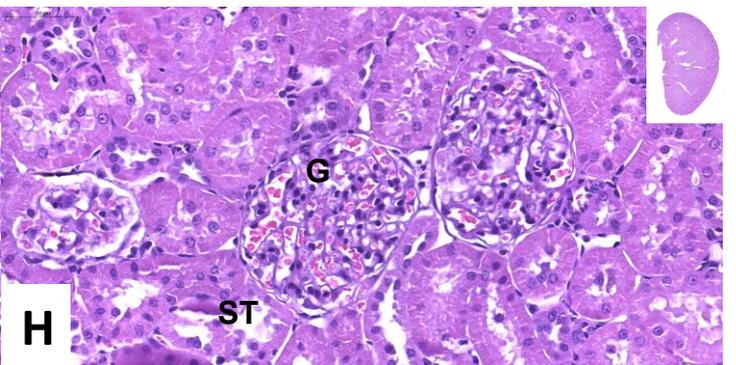
G

Grupo SD - DC 50mg/kg 40x



F

Grupo HS - DC 50mg/kg 40x

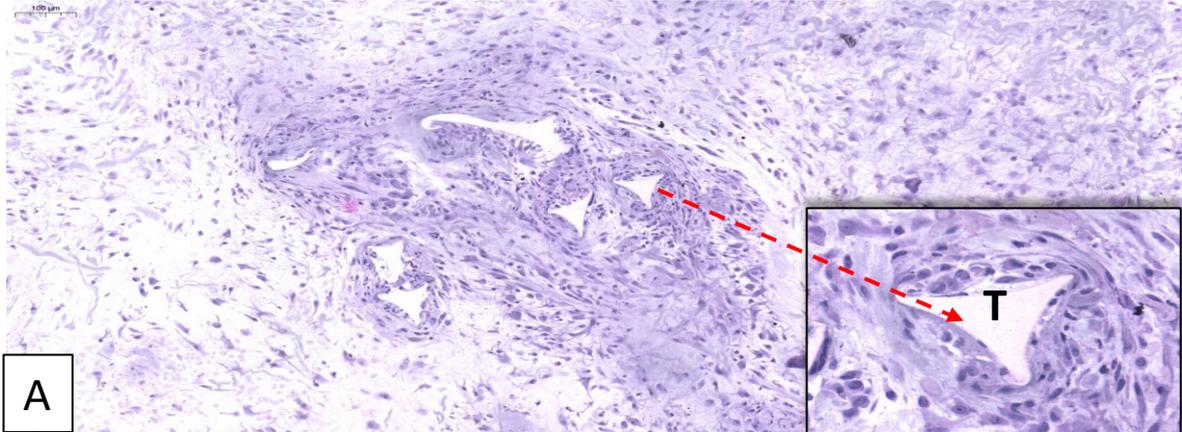


H

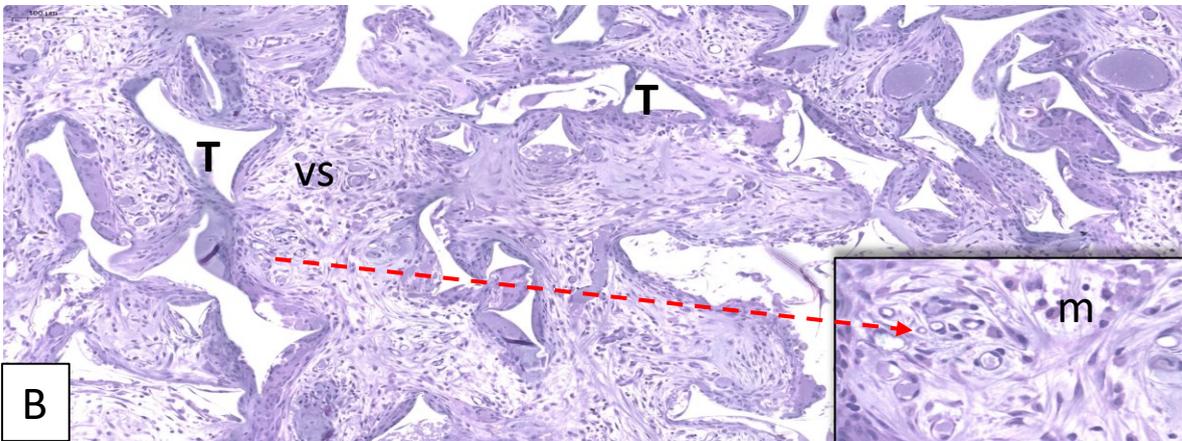
Figura 25 - Histologia Representativa dos Rins dos Animais.

CORTES HISTOLÓGICOS DE IMPLANTES DE ESPONJA

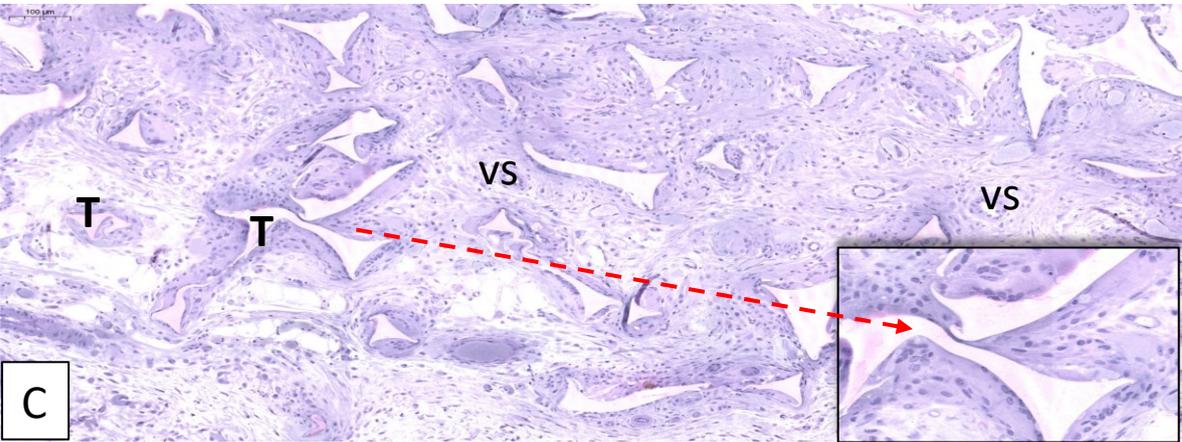
Grupo SD - placebo 10x



Grupo HS - placebo 40x



Grupo SD - DC 50mg/kg 10x



Grupo HS - DC 50mg/kg 10x

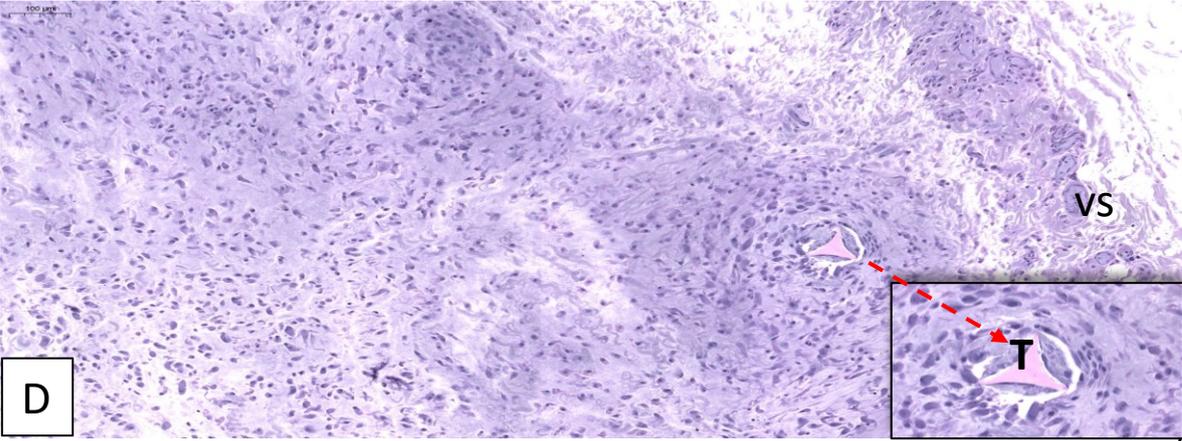


Figura 26 - Histologia Representativa dos implantes de esponjas

Análise histológica dos implantes de esponja (aumento óptico 10x) Insert = zoom 40x, coloração HE. Figuras A e B representam grupo placebo (figura A – grupo SD, figura B – grupo HS); Figura C e D representam grupo tratados (figura C – grupo SD, figura D – grupo HS. Legenda: T– trabécula de esponja, m – macrófago, VS – vaso sanguíneo. SD – placebo (n=10); HS – placebo (n=10); SD – DC50mg/kg (n=10); HS – DC 50mg/kg (n=10).

7-Conclusões

- 1- A determinação de compostos presentes no extrato de *Baccharis dracunculifolia* mostrou-se equivalente quando comparados aos dados de referência na literatura para esse extrato.
- 2- O protocolo de dieta e do tratamento com as nanoformulações não alteraram o comportamento alimentar dos animais, tampouco influenciaram no ganho ou perda de peso.
- 3- Os parâmetros metabólicos e provas de função renal e hepática avaliados nos animais pós-tratamento com as nanoformulações não sofreram alterações expressivas, mostrando que a nanoformulação na dosagem utilizada não exerceu efeito citotóxico nos animais.
- 4- A análise histológica não evidenciou danos teciduais aos órgãos avaliados, mostrando que a dosagem utilizada para o tratamento não desempenhou toxicidade aos tecidos.
- 5- A avaliação histológica dos implantes de esponja foi capaz de induzir uma resposta inflamatória no interior das trabéculas esponjosas com considerável migração de células mononucleares e deposição de um estroma fibrovascular denso.

9-Considerações finais

Os resultados desse trabalho foram obtidos a partir de uma única dosagem, que foi realizada no tempo de 14 dias, considerando o tempo máximo dos implantes de esponja. É importante considerar que a cinética inflamatória envolve eventos vasculares, celulares e proliferativos que não foram analisados temporalmente neste trabalho. Um estudo mais detalhado e que monitore tais parâmetros ao longo da manifestação dos eventos inflamatórios, poderá revelar mudanças expressivas na dinâmica dos marcadores metabólicos em animais com alta ingestão de sódio.

A realização de outros estudos com diferentes dosagens da nanoformulação no modelo de implante de esponja em ratos Wistar sem a dieta contendo alto teor de sódio, poderia melhor elucidar os efeitos sobre esse processo, o que facilitaria a compreensão dos efeitos no modelo associado.

Cabe ainda ressaltar que o modelo de estudo proposto (associação da alta ingestão de sódio e inflamação crônica) é inédito, e revela um cenário compatível com a realidade vivida pela população brasileira. Novos estudos deverão ser realizados a fim de melhor elucidar as interações e fatores (como gênero e idade) poderiam ser ou não determinantes para o agravamento dessa condição.

10- Referências bibliográficas

ABBAS, A. K.; Lichtman, A. H. (2019). **Imunologia celular e molecular**. [tradução Anderson de Sá Nunes, Soraya Imon de Oliveira] 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

ABDELLATIF, M. M., Elakkad, Y. E., Elwakeel, A. A., Allam, R. M., & Mousa, M. R. (2021). Formulation and characterization of propolis and tea tree oil nanoemulsion loaded with clindamycin hydrochloride for wound healing: In-vitro and in-vivo wound healing assessment. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, 29(11), 1238–1249. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.10.004>>

ABOUITAH, K., Allayh, A. K., Wojnarowicz, J., Shaker, Y. M., Swiderska-Sroda, A., & Lojkowski, W. (2021). Nanoformulation Composed of Ellagic Acid and Functionalized Zinc Oxide Nanoparticles Inactivates DNA and RNA Viruses. **Pharmaceutics**, 13(12), 2174. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122174>>

ABRAHAM, N. S.; El-Sereg, H. B.; Hartman, C.; Richardson, P. *et al.* (2007). **Cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs and the risk of myocardial infarction and cerebrovascular accident**. *Aliment Pharmacol Ther.*

BACHIEGA, Tatiana Fernanda. Produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por macrófagos estimulados in vitro com própolis, alecrim-do-campo, capim-limão e cravo-da índia. (2011). 92 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu**. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/95858>>.

BALBINO, C. A. (2011). ANTI-INFLAMATÓRIOS: uma compreensão total. Entrevista, **Pharm Bras**, n. 81 - Apr/May.

BATISTA, Marcos Adriano Carlos. (2021). Avaliação do Efeito Anti-Hipertensivo de Uma Formulação Nano-Estruturada Contendo Extrato de *Baccharis Dracunculifolia* em Ratos Wistar com Sobrecarga de Sódio. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal de Ouro Preto**.

BATISTA, M. A. C.; Braga, D. C. A.; De Moura, S. A. L.; De Souza, G. H. B. *et al.* (2020). Salt-dependent hypertension and inflammation: targeting the gut-brain axis and the immune system with Brazilian green propolis. **Inflammopharmacology**, 28, n. 5, p. 1163-1182, Oct.

BATLOUNI, M. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 4, p. 556-63, Apr.

BIANCARDI, V. C.; Son, S. J.; Ahmadi, S.; Filosa, J. A. *et al.* (2014). Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. **Hypertension**, 63, n. 3, p. 572-579, Mar.

BOGLIOLO (2016), patologia/Geraldo Brasileiro Filho. – 9. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

CAMPOS, A. C. L; Branco, A. B; Groth, A. K. (2007). Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig**, v. 20, n. 1, Jan/Mar.

CAREY, R. M.; Calhoun, D. A.; Bakris, G. L.; Brook, R. D. *et al.* (2018). Resistant Hypertension: Detection, Evaluation, and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Hypertension**, 72, n. 5, p. e53-e90, Nov.

CARNEIRO, Patrícia dos Santos. (2009). Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda. 2009. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, **University of São Paulo**, São Paulo. <doi:10.11606/T.42.2009.tde-08072009-142404>.

CASAGRANDE, M.; Zanela, J.; Wagner, A.; Busso, C. *et al.* (2018). Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, 125, p. 207-219, Jan.

CASTELLO BRANCO, A. C. da S.; Diniz, M. De F. F. M.; Almeida, R. N. De; Santos, H. B.; Oliveira, K. M. De; Ramalho, J. Do A.; Dantas, J. G. (2011). PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR E CAMUNDONGOS SWISS DO BIOTÉRIO PROFESSOR THOMAS GEORGE. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde, [S. I.]**, v. 15, n. 2, p. 209–214.

CHEN, Bing-Huei; Stephen Inbaraj, B. (2019). Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. **Nutrients**, 11, n. 5, May 10.

CHEN, Yan; Lu, Y.; Lee, R. J.; Xiang, G. (2020). Nano Encapsulated Curcumin: And Its Potential for Biomedical Applications. **Int J Nanomedicine**, 15, p. 3099-3120.

COLACITE, J. (2015). Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória e Antinociceptiva de *Baccharis Dracunculifolia* DC e *Bryophyllum Pinnatum* Kurtz. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia, [S. I.]**, v. 10, n. 3, p. 49–58.

COLOMBO, M., Figueiró, F., de Fraga Dias, A., Teixeira, H. F., Battastini, A., & Koester, L. S. (2018). Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal administration reduces glioma growth in vitro. **International journal of pharmaceutics**, 543(1-2), 214–223. <doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.055>

COSTA, Marcelo Carrijo da. (2019). Avaliação da atividade do dióxido de cloro na cicatrização de feridas excisionais cutâneas em camundongos. 48 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia**. <<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1246>>

COUTINHO, M.A.S.; Muzitano, M.F.; Costa, S. (2009). Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.** 1. 241-256.

CRACIUNESCU, O.; Icriverzi, M.; Florian, P. E.; Roseanu, A. *et al.* (2021). Mechanisms and Pharmaceutical Action of Lipid Nanoformulation of Natural Bioactive Compounds as Efficient Delivery Systems in the Therapy of Osteoarthritis. **Pharmaceutics**, 13, n. 8, Jul 21.

CROUCH, S. H.; Botha-Le Roux, S.; Delles, C.; Graham, L. A. *et al.* (2021). Inflammation and salt in young adults: the African-PREDICT study. **Eur J Nutr**, 60, n. 2, p. 873-882, Mar.

DAUGHERTY, S. L.; Powers, J. D.; Magid, D. J.; Tavel, H. M. *et al.* (2012). Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. **Circulation**, 125, n. 13, p. 1635-1642, Apr 3.

DIEGELMANN, R. F. (2003). Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. **Wound Repair Regen**, 11, n. 6, p. 490-495, Nov-Dec.

ELIJOVICH, F.; Laffer, C. L.; Sahinoz, M.; Pitzer, A. *et al.* (2020). The Gut Microbiome, Inflammation, and Salt-Sensitive Hypertension. **Curr Hypertens Rep**, 22, n. 10, p. 79, Sep 3.

FARJADIAN, F.; Ghasemi, A.; Gohari, O.; Roointan, A. *et al.* (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. **Nanomedicine (Lond)**, 14, n. 1, p. 93-126, Jan.

FURTADO, Fabiana Barcelos. (2018). Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica*. 2018. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – **Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP**. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/153976>>.

GERALDO, J. M.; Alfenas, R. de C. G. (2008). Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica: evidências atuais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**. v. 52, n. 6, pp. 951-967.

GRANCE, S. R., Teixeira, M. A., Leite, R. S., Guimarães, E. B., de Siqueira, J. M., de Oliveira Filiu, W. F., de Souza Vasconcelos, S. B.; do Carmo Vieira, M. (2008). *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of ethnopharmacology**, 117(1), 28–33. <doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.020>

GUIMARÃES, N. S.; Mello, J. C.; Paiva, J. S.; Bueno, P. C. *et al.* (2012). *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity

and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food Chem Toxicol**, 50, n. 3-4, p. 1091-1097, Mar.

GOMES, Paula Magalhães. (2019). Ingestão crônica de sódio na dieta a partir do desmame causa hipertensão em ratos jovens: envolvimento de mecanismos neurogênicos no controle da pressão e balanço hidroeletrólítico no modelo HS12W. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.**

HUIDOBRO E., Juan Pablo, Tagle, Rodrigo, & Guzmán, Ana María. (2018). Estimation of glomerular filtration rate with creatinine. **Revista médica de Chile**, 146(3), 344-350. <dx.doi.org/10.4067/s0034-98872018000300344>

JIANG, E.; Chapp, A. D.; Fan, Y.; Larson, R. A. et al. (2018). Expression of Proinflammatory Cytokines Is Upregulated in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Dahl Salt-Sensitive Hypertensive Rats. **Front Physiol**, 9, p. 104.

KIRABO, A. (2017). A new paradigm of sodium regulation in inflammation and hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 313, n. 6, p. R706-r710, Dec 1.

KOGA, Y.; Hirooka, Y.; Araki, S.; Nozoe, M. *et al.* (2008). High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res**, 31, n. 11, p. 2075-2083, Nov.

LABIOCEL (2002). MANUAL DE TÉCNICAS EM HISTOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR DO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Consolidação dos procedimentos. **Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina.**

LABTEST: dados de arquivo. C.A Burtis, E.R. Ashwood, D. E. Bruns – Tietz Text book of **Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, 4 ed.

LAM R, Muniraj T. (2021). Hyperamylasemia. [Updated 2021 Dec 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559273/?report=classic>>.

LANNA, M. F., Resende, L. A., Aguiar-Soares, R., de Miranda, M. B., de Mendonça, L. Z., Melo Júnior, O., Mariano, R., Leite, J. C., Silveira, P., Corrêa-Oliveira, R., Dutra, W. O., Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., de Moura, S., Silveira-Lemos, D., & Giunchetti, R. C. (2020). Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants: Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 8, 538203. <doi.org/10.3389/fbioe.2020.538203>

LIMA, Rafael Rodrigues et al. (2007). Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Rev. Para. Med.**, Belém, v. 21, n. 2, p. 29-34, jun.

LIMA, C. M.; Lima, A. K.; Melo, M. G. D.; Dória, G. A. A.; Serafini, M. R.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Araújo, A. A. S. (2014). Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 10, n. 3.

LIMA, F. E. G.; Santos, M. S. N. Dos; Bachur, T. P. R.; Filho, M. O. De M.; Moraes, M. E. A. De; Aragão, G. F. (2018). Perfil bioquímico de ratos wistar do biotério central da Universidade Federal do Ceará. **Ciência animal**, v.28, n.3, p.1-11.

LOPES, B. A. da S.; Eliseu, P. A.; Ferrazza, M. H. S. H.; Voltolini, A. T.; Plautz, K.; Borgmann, G.; Steinchak, R. N. E. (2021). Avaliação da flexibilização do jejum para determinação laboratorial do perfil lipídico / Assessment of flexibilization of fasting for laboratory determination of the lipid profile. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 26314–26326. <DOI: 10.34117/bjdv7n3-367>.

LU, X.; Crowley, S. D. (2018). Inflammation in Salt-Sensitive Hypertension and Renal Damage. **Curr Hypertens Rep**, 20, n. 12, p. 103, Oct 30.

MARCUCCI, M. C., Salatino, A., Oliveira, L. F. A. M., & Gonçalves, C. P. (2021). Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. **Rev. Virt. Quím**, 13(1), 61-73.

MANFRON, J.B., Duarte, M.D., Santos, C.A., Farago, P.V. (2004). Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY**. 23. 477-83.

MARUYAMA, H.; Sumitou, Y.; Sakamoto, T.; Araki, Y. *et al.* (2009). Antihypertensive effects of flavonoids isolated from brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull**, 32, n. 7, p. 1244-1250, Jul.

MELO, M. G. D.; Dória, G. A. A.; Serafini, M. R.; Araújo, A. A. S. (2013). Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 8, n. 9.

MISHIMA, S.; Yoshida, C.; Akino, S.; Sakamoto, T. (2005). Antihypertensive effects of Brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull**, 28, n. 10, p. 1909-1914, Oct.

MOISE, A. R.; Bobiş, O. (2020). *Baccharis dracunculifolia* and *Dalbergia ecastophyllum*, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. **Plants (Basel)**, 9, n. 11, Nov 21.

de MOURA, S. A., Ferreira, M. A., Andrade, S. P., Reis, M. L., Noviello, M.deL., & Cara, D. C. (2011). Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, 2011, 182703. <doi.org/10.1093/ecam/nep197>

MUXFELDT, E. S.; Chedier, B.; Rodrigues, C. I. S. (2019). Resistant and refractory hypertension: two sides of the same disease? **Brazilian Journal of Nephrology**, 41, n. 2, p. 266-274.

NEMEN, Daiane; Lemos-Senna, Elenara. (2011). Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova [online]**. v. 34, n. 3, pp. 408-413. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000300008>>.

NOURI, Z.; Hajjalyani, M.; Izadi, Z.; Bahramsoltani, R. et al. (2020). Nanophytomedicines for the Prevention of Metabolic Syndrome: A Pharmacological and Biopharmaceutical Review. **Front Bioeng Biotechnol**, 8, p. 425.

NWOMEH, B. C.; Yager, D. R.; Cohen, I. K. (1998). Physiology of the chronic wound. **Clin Plast Surg**, 25, n. 3, p. 341-356, Jul.

OLIVERAS, A.; Armario, P.; Sans, L.; Clarà, A. et al. (2018). Organ damage changes in patients with resistant hypertension randomized to renal denervation or spironolactone: The DENERVHTA (Denervación en Hipertensión Arterial) study. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, 20, n. 1, p. 69-75, Jan.

ORLANDINI, Lorena Floriani. (2012). Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos wistar expostos à amônia por inalação. 2012. 66 f. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Faculdade Veterinária. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/48967>>.

PEREIRA, C. A.; Costa, A. C.; Liporoni, P. C.; Rego, M. A. et al. (2016). Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*. **J Infect Public Health**, 9, n. 3, p. 324-330, May-Jun.

Pitzer, A. L., Van Beusecum, J. P., Kleyman, T. R., & Kirabo, A. (2020). ENaC in Salt-Sensitive Hypertension: Kidney and Beyond. **Current hypertension reports**, 22(9), 69. <doi.org/10.1007/s11906-020-01067-9>

POŽGAIN, I., Požgain, Z., & Degmečić, D. (2014). Placebo and nocebo effect: a mini-review. **Psychiatria Danubina**, 26(2), 100–107.

RAUD-MATTEDI, C. (2008). Os alimentos funcionais: A nova fronteira da indústria alimentar. **Rev Sociol Polít**, v.16, n.31, p. 85-100.

RINHEL, Andréa Silva Garcia de Figueiredo. (2015). O extrato etanólico das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) modula funções efectoras de neutrófilos: um promissor agente fitoterápico para o tratamento de processos inflamatórios mediados por estas células. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto**. <[doi:10.11606/T.60.2016.tde-17112015-151553](https://doi.org/10.11606/T.60.2016.tde-17112015-151553)>

ROBERTO, J. V. B., Júnior, C. S. d. N., Souza, E. S. A. d., Martins, R. A., Araújo, E. R. d., Barros, M. M. A. d. (2018). PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE REFERÊNCIA DE RATOS WISTAR DE DIFERENTES FAIXAS DE PESO, PROVENIENTES DO

BIOTÉRIO DAS FACULDADES NOVA ESPERANÇA – PB. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, 16(1).

RODRIGUES, D. M., De Souza, M. C., Arruda, C., Pereira, R., & Bastos, J. K. (2020). The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **Journal of chemical ecology**, 46(2), 150–162. <doi.org/10.1007/s10886-019-01141-w>

ROSAS-PERALTA, M.; Borraro-Sánchez, G. (2018). [Impacto de los nuevos criterios para diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial sistémica sugeridos por la American College of Cardiology/American Heart Association]. *In: Gac Med Mex. Mexico*. v. 154, p. 633-637.

ROSÓN, M. I., Cavallero, S., Della Penna, S., Cao, G., Gorzalczany, S., Pandolfo, M., Kuprewicz, A., Canessa, O., Toblli, J. E., Fernández, B. E. (2006). Acute sodium overload produces renal tubulointerstitial inflammation in normal rats. **Kidney international**, 70(8), 1439–1446. <doi.org/10.1038/sj.ki.5001831>

SANTOS, C.H.M.dos; Casavana, A.L.; Moreira, D.L.; Dourado, D.M.; Guimarães, F.S.; Barros, F.H.R.; Campos, G. C. O.de; Leme, G.A.L.; Silva, L.D.M.da; Wahl, L.M.; Gutterres, N.B.A.; Matias, R.; Câmara, S.J.F.; Santos, S.E.O. (2019). Tratamento da fístula anal com extrato de *Baccharis dracunculifolia*. Estudo experimental em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. 46. <10.1590/0100-6991e-20192297>

SANTOS, Monique Oliveira Carvalho. (2019). Flexibilização do jejum na dosagem do perfil lipídico em voluntários adultos assistidos em laboratórios público e privado na região metropolitana de Belo Horizonte. 88f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina**.

SEVINÇ-ÖZAKAR, R., Seyret, E., Özakar, E., & Adıgüzel, M. C. (2022). Nanoemulsion-Based Hydrogels and Organogels Containing Propolis and Dexpanthenol: Preparation, Characterization, and Comparative Evaluation of Stability, Antimicrobial, and Cytotoxic Properties. **Gels (Basel, Switzerland)**, 8(9), 578. <doi.org/10.3390/gels8090578>

SILVA, Claudia Maria da. (2013). Avaliação da presença de marcadores da resposta inflamatória e angiogênese em sangue periférico e menstrual de mulheres portadoras de endometriose. 96 f. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal de Minas Gerais**. Disponível em: < http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AX4FT2>.

SILVA, J. B.; Costa, K. M. F. M.; Coelho, W. A. C.; Paiva, K. A. R.; Costa, G. A. V.; Salatino, A.; Freitas, C. I. A.; Batista, J. S. (2016). Quantification of phenols, total flavonoids and pharmacological activities of geopropolis *Plebeia aff. flavocincta* of Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesqui. Vet. Bras.**, 36(9): 874-880. <doi.org/10.1590/S0100-736X2016000900014>

SILVA, L. M. R. da, Teixeira de Figueiredo, E. A., Silva Ricardo, N. M., Pinto Vieira, I. G., Wilane de Figueiredo, R., Brasil, I. M., Gomes, C. L. (2014). Quantification of

bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, 143, 398–404. <doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>

SINGH, S. B., & Lin, H. C. (2021). Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Innate Immunity. **Biomolecules**, 11(12), 1784. <doi.org/10.3390/biom11121784>

SFORCIN, José Maurício et al. (2012). Baccharis dracunculifolia: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. **São Paulo: Editora Unesp**. ISBN 9788539303762

SON, H. Y., Lee, M. S., Chang, E., Kim, S. Y., Kang, B., Ko, H., Kim, I. H., Zhong, Q., Jo, Y. H., Kim, C. T., & Kim, Y. (2019). Formulation and Characterization of Quercetin-loaded Oil in Water Nanoemulsion and Evaluation of Hypocholesterolemic Activity in Rats. **Nutrients**, 11(2), 244. <doi.org/10.3390/nu11020244>

SUGIMOTO, M. A.; Sousa, L. P.; Pinho, V.; Perretti, M. *et al.* (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? **Front Immunol**, 7, p. 160.

SYUKRI, Y., Fitria, A., Hanifah, S., & Idrati, M. (2021). Development of New Indonesian Propolis Extract-Loaded Self-emulsifying: Characterization, Stability and Antibacterial Activity. **Advanced pharmaceutical bulletin**, 11(1), 120–129. <doi.org/10.34172/apb.2021.013>

TADROS, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and interface science**, 108-109, 303–318. <doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>

TEIXEIRA, D.A. (2020). Patologia Geral. Bibliografia básica – Livro, Teófilo Otoni-MG. Ago. ISBN 978-65-992205-2-4.

VASE, L., Wartolowska, K. (2019). Pain, placebo, and test of treatment efficacy: a narrative review. **British journal of anaesthesia**, 123(2), e254–e262. <doi.org/10.1016/j.bja.2019.01.040>

VOLP, Ana Carolina Pinheiro et al. (2008). Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia [online]**. v. 52, n. 3, pp. 537-549. <doi.org/10.1590/S0004-27302008000300015>.

WANG, Ricardo; Neuenschwander, F.C.; Nascimento, B.R. (2020). Inflamação pós-Infarto Agudo do Miocárdio: “Médico ou Monstro”. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 115, n. 6, p. 1-2, Dec.

WANG, Wen.; Ji, H. L. (2015). Epithelial Sodium and Chloride Channels and Asthma. **Chin Med J (Engl)**, 128, n. 16, p. 2242-2249, Aug 20.

WANG, Yi-Jie, Yeh, T. L., Shih, M. C., Tu, Y. K., Chien, K. L. (2020). Dietary Sodium Intake and Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Dose-

11- Anexo 1 – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da correlação etiopatogênica da inflamação e hipertensão sódio-dependente: Proposição de um modelo experimental com ratos wistar como plataforma de estudos para futuras estratégias de tratamento e avaliação do efeito do extrato alcoólico da *Baccharis dracunculifolia*", protocolada sob o CEUA nº 5152120421 (ID 000597), sob a responsabilidade de **Sandra Aparecida Lima de Moura e equipe; Ana Carolina Lima; Leonardo Máximo Cardoso; André Luciano Lopes ; Jorge Andrés García Suárez** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 02/07/2021.

We certify that the proposal "Study of the etiopathogenic correlation of inflammation and sodium-dependent hypertension: Proposition of an experimental model with wistar rats as a study platform for future treatment strategies and evaluation of the effect of the alcoholic extract of *Baccharis dracunculifolia*", utilizing 608 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 5152120421 (ID 000597), under the responsibility of **Sandra Aparecida Lima de Moura and team; Ana Carolina Lima; Leonardo Máximo Cardoso; André Luciano Lopes ; Jorge Andrés García Suárez** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/02/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2021](#) a [07/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [21 a 95 dias](#)

N: [608](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [45 a 400 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular ICEB II, sala 46.

Ouro Preto, 11 de julho de 2021

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto