



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**A FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DE *Bixa orellana* E SEU
COMPOSTO ISOLADO ÁCIDO ELÁGICO ATENUAM A
PROGRESSÃO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MIA
EM JOELHOS DE RATOS**

LUIS ÂNGELO MACÊDO SANTIAGO

São Luis - MA

OUTUBRO/2023

LUIS ÂNGELO MACEDO SANTIAGO

**A FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DE *Bixa orellana* E SEU
COMPOSTO ISOLADO ÁCIDO ELÁGICO ATENUAM A
PROGRESSÃO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MIA
EM JOELHOS DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins
Sousa

São Luis - MA

OUTUBRO/2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Macedo Santiago, Luis Ângelo.

A fração de acetato de etila de *Bixa orellana* e seu composto isolado ácido elágico atenuam a progressão da osteoartrite induzida por mIA em joelhos de ratos / Luis Ângelo Macedo Santiago. - 2023.

79 f.

Orientador(a): Eduardo Martins Sousa.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Analgesia. 2. Anti-inflamatório. 3. Antinocicepção. 4. Citocinas. 5. Degeneração articular.
I. Sousa, Eduardo Martins. II. Título.

LUIS ÂNGELO MACEDO SANTIAGO

**A FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DE *Bixa orellana* E SEU
COMPOSTO ISOLADO ÁCIDO ELÁGICO ATENUAM A
PROGRESSÃO DA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MIA
EM JOELHOS DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do
Maranhão, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 31 / 10 /2023

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



EDUARDO MARTINS DE SOUSA

Data: 31/10/2023 20:03:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Martins Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente



DEBORA LUANA RIBEIRO PESSOA

Data: 31/10/2023 13:38:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Débora Luana Ribeiro Pessoa (Membro Titular)
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente



ADELIANE CASTRO DA COSTA

Data: 31/10/2023 22:03:01-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Adeliane Castro da Costa
Universidade Federal de Jataí (Membro Titular)

Documento assinado digitalmente



MARSEN GARCIA PINTO COELHO

Data: 01/11/2023 17:27:38-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Membro Titular)

Documento assinado digitalmente



MARCIA CRISTINA GONCALVES MACIEL

Data: 31/10/2023 15:08:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Márcia Cristina Gonçalves Maciel (Membro Titular)
Universidade de Brasília

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, **Luis Ângelo Macedo Santiago**, (X) autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “**A Fração de Acetato de Etila de *Bixa orellana* e seu composto isolado Ácido Elágico atenuam a progressão da Osteoartrite induzida por MIA em joelhos de ratos**” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: São Luis, 08 de Fevereiro de 2024

Discente do BIONORTE (PPG-BIONORTE)

CPF: 829050883-20

RG: 14938928

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência.

À minha mãe, Maria da Conceição Macêdo Santiago, pelo apoio e exemplo de determinação. Tudo de bom que sou começou na senhora.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Martins Sousa pela sua ajuda e contribuição ao longo dessa jornada.

À todos os professores e colaboradores do LIMIR – UniCEUMA - Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias. Ao LEED – UFMA – Laboratório Experimental de Estudo da Dor, representado aqui pela profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Minha imensa gratidão aos professores, Dr. Rafael Cardoso Carvalho, Dra. Rachel Melo Ribeiro e Dra. Joicy Cortez de SÁ Sousa, por serem sempre prestativos e solícitos.

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

**“Mantenho a meu serviço seis homens honestos (ensinam-me tudo o que sei)
Seus nomes são: O quê, por quê, quando, como, onde e quem”**

Kipling

SANTIAGO, Luis Ângelo Macêdo. A fração de acetato de etila de *Bixa orellana* e seu composto isolado ácido elágico atenuam a progressão da osteoartrite induzida por MIA em joelhos de ratos. 2023. 82f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma patologia caracterizada pela erosão progressiva da cartilagem articular, com alterações estruturais e funcionais concomitantes nos tecidos ao redor das articulações. Nesse contexto, plantas medicinais tornaram-se relevantes ferramentas quanto ao seu potencial papel na prevenção e tratamento da OA, proporcionando uma abordagem terapêutica ou adjuvante segura e eficaz. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia terapêutica da fração acetato de etila das folhas de *Bixa orellana* (BoEA) e ácido elágico (ElAc) para o tratamento terapêutico de OA induzida por monosodium iodoacetate (MIA) em ratos. Do material vegetal, obtivemos o extrato bruto por maceração com solvente hidroalcólico 70% (BoHE), seguido de fracionamento com solventes em ordem de polaridade crescente, obtivemos a fração acetato de etila (BoEA). Foi identificado e isolado o composto ElAc na BoEA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA) e curva analítica. A OA induzida por MIA foi realizada no joelho direito com volume máximo de 2 mg/25 µL na articulação fêmur tíbio-patelar, através do ligamento patelar. Todos animais foram previamente sedados com o composto de cloridrato de ketamina® 10% (90 mg/kg) para em seguida serem anestesiados por meio de Cloridrato de xilazina® 2% (5 mg/kg) em região intraperitoneal. As doses dos compostos de BoEA e ElAc, assim como da Indometacina e sorbitol foram realizadas via gavagem de 12/12 horas. As gavagens foram realizadas administrando-se volume de 1 mL e ajustada de acordo com a pesagem do animal realizado antes do procedimento. Avaliamos os animais através de testes clínicos e radiológicos a cada 7 dias. No 29º dia foi realizada eutanásia por anestesia profunda em via intraperitoneal na dosagem de 0,3 ml de Xilazina (80mg/kg) + 0,3 ml de Ketamina (10mg/kg). Todo material biológico foi retirado por punção da aorta totalizando 08-10 mL de sangue em tubos contendo EDTA. Os resultados demonstraram que doses dos compostos BoEA e ElAc administradas a longo prazo foram capazes de induzir ação anti-inflamatória e antinociceptiva evidenciados através dos testes clínicos e se mostraram determinantes nesse processo inibição evidenciada pela diminuição dos níveis séricos de TNF- α e aumento de IL-10 detectada após 28 dias de tratamento. Em relação às imagens radiológicas e histopatológicas do presente estudo, observamos no grupo não tratado a presença de osteófitos marginais exuberantes, esclerose óssea subcondral, áreas de erosão da cartilagem e luxação patelar medial, caso bem diferente dos animais que foram tratados com os compostos fitoquímicos, onde apresentaram a progressão do dano articular reduzida evidenciado com menores graus de alterações articulares. Concluímos que os efeitos da BoEA e ElAc foram capazes de reduzir a dor, inibir atividade das vias catabólicas e consequentemente, a inflamação por meio de regulação e equilíbrio recíproco de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias em ratos com OA induzida por MIA, além atenuar a degeneração da cartilagem evidenciadas pelas imagens radiológicas e histológicas.

Palavras-chave: Degeneração articular; citocinas; anti-inflamatório; analgesia; antinocicepção.

SANTIAGO, Luis Ângelo Macêdo. The ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* and its isolated compound ellagic acid attenuate the progression of mia-induced osteoarthritis in rat knees. 2023. 82f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – Federal University of Maranhão, São Luis, 2023.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a pathology characterized by the progressive erosion of articular cartilage, with concomitant structural and functional changes in the tissues around the joints. In this context, medicinal plants have become relevant tools in terms of their potential role in the prevention and treatment of OA, providing a safe and effective therapeutic or adjuvant approach. The aim of this study was to investigate the therapeutic efficacy of the ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* leaves (BoEA) and ellagic acid (ElAc) for the therapeutic treatment of monosodium iodoacetate (MIA)-induced OA in rats. From the plant material, we obtained the crude extract by maceration with 70% hydroalcoholic solvent (BoHE), followed by fractionation with solvents in order of increasing polarity, obtaining the ethyl acetate (BoEA) fraction. The compound ElAc was identified and isolated in BoEA using high performance liquid chromatography (HPLC-PDA) and analytical curve. MIA-induced OA was performed on the right knee with a maximum volume of 2 mg/25 μ L at the tibiopatellar femur joint, through the patellar ligament. All animals were previously sedated with ketamine hydrochloride[®] 10% (90 mg/kg) and then anesthetized using xylazine hydrochloride[®] 2% (5 mg/kg) in the intraperitoneal region. The doses of BoEA and ElAc compounds, as well as Indomethacin and sorbitol were performed via 12/12 hour gavage. Gavages were performed by administering a volume of 1 mL and adjusted according to the animal's weighing performed before the procedure. We evaluate the animals through clinical and radiological tests every 7 days. On the 29th day, euthanasia was performed by deep intraperitoneal anesthesia at a dosage of 0.3 ml of Xylazine (80mg/kg) + 0.3 ml of Ketamine (10mg/kg). All biological material was removed by puncture of the aorta, totaling 08-10 mL of blood in tubes containing EDTA. The results demonstrated that doses of the compounds BoEA and ElAc administered in the long term were capable of inducing anti-inflammatory and antinociceptive action evidenced through clinical tests and proved to be decisive in this process, inhibition evidenced by the decrease in serum levels of TNF- α and increase in IL -10 detected after 28 days of treatment. In relation to the radiological and histopathological images of the present study, we observed in the untreated group the presence of exuberant marginal osteophytes, subchondral bone sclerosis, areas of cartilage erosion and medial patellar dislocation, a case very different from the animals that were treated with phytochemical compounds, where they showed reduced progression of joint damage evidenced with lower degrees of joint changes. We concluded that the effects of BoEA and ElAc were able to reduce pain, inhibit the activity of catabolic pathways and consequently, inflammation through regulation and reciprocal balance of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in MIA-induced OA, in addition to attenuating the cartilage degeneration evidenced by radiological and histological images.

Keywords: Joint degeneration; cytokines; anti-inflammatory; analgesia; antinociception.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1- Urucum.....	21
Figura 2- Estrutura básica do Composto Isolada da <i>Bixa orellana</i> (Ácido Elágico).....	22
Figura 3 - Curva analítica obtida pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de solução padrão Ácido elágico.....	25
Figura 4 – Desenho Experimental.....	27
Tabela 1 - Critérios de Scores para avaliação das imagens radiológicas.....	29
Tabela 2 - Critérios de Scores para avaliação histopatológica.....	30
Figura 5 - Cromatograma da fração acetato de etila de <i>Bixa orellana</i> e do padrão ácido elágico. Coluna Phenomenex® Luna C18 (250 x 4,6mm i.d. ; 4µm), fluxo 1,0 ml.min-1 , Solventes: A=H2O, B=MeOH ambos com FA 0,01%.....	33
Figura 6 - Efeito da fração BoEA e ElAc na atividade motora (deambulação forçada) de ratos com OA induzida por MIA, usando o escore de <i>Rotarod test</i>	34
Figura 7 – Efeito da fração BoEA e ElAc na alodinia mecânica (limiar de retirada da pata) de ratos com OA induzida por MIA, usando o escore de <i>Von Frey's test</i>	35
Figura 8 - Efeito da fração BoEA e ElAc na incapacidade articular (distribuição de peso das pernas) de ratos com OA induzida por MIA através do <i>Weight-Bearing Test</i>	37
Figura 9. Comparação radiológica e histopatológica da cartilagem articular fêmur tíbio-patelar do joelho direito de ratos com OA induzida por MIA após 28 dias de tratamento com BoEA e ElAc. (1A-1G).....	38
Figura 10 e 11. Análise de citocinas TNF- α e IL-10 em ratos com OA induzida por MIA, após tratamento com BoEA e ElAc.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINH	Anti-Inflamatórios não Hormonais
Arthros	Articulação
AVD'S	Atividades de Vida Diária
µL	Microlitro (s)
nm	Nanómetro
min	Minuto (s)
BoEA	Fração Acetato de Etila
BoHE	Extrato Hidroalcoólico de Etila
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAD	Detector de Matriz de Fotodiodos
FA	Ácido Fórmico
FCN	<i>Fator de Crescimento Nervoso</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	Método de detecção de matriz de fotodiodos por cromatografia líquida de alta eficiência
IL1	<i>Interleucina-1</i>
IL-1β	<i>Interleucina-1 beta</i>
IL-6	<i>Interleucina-6</i>
IL-10	<i>Interleucina-10</i>
Ite	Inflamação
LAMIR	Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções respiratórias
LEED	Laboratório Experimental para Estudo da Dor
MIA	Monoiodoacetado de Sódio
NF-κB	<i>Fator Nuclear Kappa de células B</i>
OA	Osteoartrite
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
PAC	Particionado com Acetato de Etila
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGFb-quinase 1	<i>Quinase 1 ativada por Fator de Crescimento Transformador-beta</i>
TLRs	<i>Receptores Toll-Like</i>
TNF-α	<i>Fator de Necrose Tumoral - Alpha</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 OSTEOARTRITE: BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÃO	16
2.2 FISIOPATOLOGIA, INFLAMAÇÃO E DOR DA OA	16
2.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA OA	17
2.4 FARMACOTERAPIA.....	19
2.5 USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	20
2.5.1 URUCUM (<i>BIXA ORELLANA</i>)	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE ESPÉCIES VEGETAIS	24
3.2 ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	24
3.3 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	25
3.4 INDUÇÃO DE OA POR MIA	25
3.5 DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
3.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SOROLÓGICAS DE IL-10 E TNF- α POR ELISA.....	27
3.7 TESTES CLÍNICOS	28
3.7.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA - DEAMBULAÇÃO FORÇADA (<i>ROTAROD TEST</i>)	28
3.7.2 AVALIAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA (<i>VON FREY'S TEST</i>)	28
3.7.3 AVALIAÇÃO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR (<i>WEIGHT-BEARING TEST</i>).....	29
3.8 ANÁLISE RADIOLÓGICA.....	29
3.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	30
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 QUANTIFICAÇÃO DE ELAC NA FRAÇÃO BOEA DAS FOLHAS DE <i>BIXA ORELLANA</i>	32
4.2 AVALIAÇÕES CLÍNICAS	33
4.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA (<i>ROTAROD TEST</i>).....	33
4.2.2 AVALIAÇÃO DA ALODYNIA MECÂNICA (<i>VON FREY'S TEST</i>).....	35
4.2.3 TESTE DE INCAPACITAÇÃO/DISTRIBUIÇÃO DE PESO NAS PATAS TRASEIRAS (<i>WEIGHT-BEARING TEST</i>).....	36
4.3 EFEITOS DO BOEA E ELAC NA REDUÇÃO DA PROGRESSÃO DE RATOS COM AO INDUZIDA POR MIA	38
4.4 BOEA E ELAC APRESENTAM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM RATOS COM OA INDUZIDA POR MIA.....	39
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITE DE ÉTICA EM ANIMAIS	50
ANEXO 2- ARTIGO ACEITO A REVISTA BIOMEDICE & PHARMACOTHERAPY (A2; FATOR DE IMPACTO 7.5)	52
ANEXO 3 – PATENTE.....	74
ANEXO 4 – EXAME PRELIMINAR DA PATENTE	82

1. INTRODUÇÃO

A Osteoartrite (OA) é uma doença crônica, progressiva e que causa uma degeneração articular com perda de superfície da cartilagem articular, levando a um processo inflamatório e dor local, comprometendo assim integridade da articulação (BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2017). Se enquadra como uma doença reumática, cuja incidência é bastante elevada e está entre as mais comuns causas de dor crônica cometendo milhares de pessoas pelo mundo e gerando um enorme impacto psicossocial, afetando não apenas o paciente, como também sua família e sua carreira profissional (OMS). Estima-se que seja uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, responsável por 9,6 milhões de anos de vida com incapacidade. (SAFIRI *et al.*, 2017; LAIRES *et al.*, 2018) No Brasil, segundo dados da previdência social, ocupa o terceiro lugar na lista dos segurados, com 65% das causas de incapacidade. Sua fisiopatologia é bem complexa, segundo PHILPOTT e MCDOUGALL (2020), inicia-se com um processo articular inflamatório, caracterizado por uma resposta de defesa do organismo frente a um agente agressor, com subsequente surgimento de osteófitos, cujo objetivo é promover o mecanismo de reparo/cura. Esse processo inflamatório irá estimular um grupo de glicoproteínas coletivamente chamadas de citocinas, responsáveis pela coordenação, amplificação e regulação da magnitude e duração dos eventos inflamatórios e, conseqüentemente, de seus efeitos, pois são produzidas e liberadas, principalmente, pelas células do sistema imune (DJIBERSOU *et al.*, 2020; PHILPOTT e MCDOUGALL, 2020). Segundo, MARGARET *et al.*, (2015), a dor é um dos principais sinais da inflamação, sendo caracterizada por comportamentos nociceptivos e pelo envolvimento de mediadores inflamatórios periféricos e centrais, que sensibilizam os neurônios sensoriais primários e espinais, desencadeando a ativação de nociceptores. No caso da OA, esses eventos evoluem com dor tipicamente localizada na articulação e está relacionada ao movimento ou suporte de peso da(s) articulação(ões) afetada(s), com bastante prejuízo funcional em modelos animais induzidos (DJIBERSOU *et al.*, 2020). O controle no dano e dor da cartilagem articular na OA permanece um desafio para ciência em relação a esquemas terapêuticos conservadores e com menos custos e danos ao organismo.

As plantas medicinais são importantes instrumentos da assistência farmacêutica, e expressam sua necessidade através de ações normativas do Governo Federal. (NASCIMENTO *et al.*, 2016). O uso sustentável da biodiversidade, através de compostos naturais, ocasionou a adoção de várias medidas e a preservação do conhecimento tradicional, assim como o incentivo à pesquisa e desenvolvimento tecnológico na área (NASCIMENTO *et al.*, 2016). No Brasil, esses compostos naturais faturam um quarto (25%) da indústria farmacêutica (GUERRA *et al.*,

2001). Embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (PRANCE, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA *et al.* 2001). As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotada, afirmação defendida pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Entre essas plantas medicinais, está o urucum (*Bixa orellana*) sendo uma espécie da Amazônia brasileira, da família do *Bixaceae*. É uma árvore que cresce de 3 a 5 m de altura, com uma copa de árvore desenvolvida. A folha é simples, medindo 8 a 15 cm de comprimento (LORENZI e MATOS, 2002). O Brasil é um dos maiores produtores de grãos de urucum no mundo. 70 % são usados na culinária como corante natural ou como corante alimentar, e 10 % para a exportação. Além de ser um aditivo alimentar, urucum é usado na medicina popular contra doenças coronárias, gastrointestinais, queimaduras, infecções respiratórias e também como anti-térmico e problemas renais (LORENZI e MATOS, 2002). A espécie, segundo SILVA; BIZERRA e FERNANDES (2018), possui vários constituintes químicos secundários, podendo destacar os fenólicos, flavanóides e alcalóides com vasta propriedade terapêutica. Apesar da *Bixa orellana* ter várias propriedades fitoquímicas, se faz necessário novos estudos que a relacionem com a resposta inflamatória articular e dor nociceptiva em modelos experimentais em animais, como o descrito por YONG *et al.* (2013) que analisou a atividade anti-inflamatória do fração acetato de etila (BoEA) de *Bixa orellana* em modelo de edema de pata induzido por serotonina em ratos. Na ocasião, os pesquisadores confirmaram que as concentrações de 50 e 150 mg/kg de BoEA apresentaram atividade anti-inflamatória, adicionalmente, a fração de BoEA reduziu a permeabilidade vascular induzida pela serotonina (YONG *et al.*, 2013).

Na busca de novas alternativas terapêuticas, vários modelos de indução articular com similaridades da patologia em humanos surgiram, entre eles, o Monoiodoacetado de Sódio (MIA), um reagente modificante de resíduos de cisteína das proteínas, que quando administrado na articulação de animais, ocasiona a modificação nas concentrações de proteoglicanas da cartilagem articular, por levar a uma interrupção na glicólise e assim uma quebra no metabolismo dos condrócitos, tendo como consequência a degradação da articulação levando a inflamação e subsequente dor articular. (SILVA, BIZERRA e FERNANDES, 2018; FREIRE, 2017).

Devido a necessidade de encontrar novos compostos farmacológicos ativos, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade anti-inflamatório e antinociceptivo da fração

BoEA e seu composto isolado ElAc em ratos com OA induzidos por MIA, através de testes clínicos, histopatológicos, radiológicas e avaliação de citocinas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Osteoartrite: Breve histórico e Definição

O termo “artrose” (do grego “arthros” = articulação e “ose” = designa uma doença não inflamatória) foi muito utilizado para definir a patologia como uma doença articular degenerativa (BLANEY, VAN e VAN, 2016). Essa nomenclatura foi sendo revista e a literatura científica, juntamente com o avanço nos estudos e evidências científicas voltados a biologia molecular, caracterizaram o termo Osteoartrite (OA), referindo-se ao desequilíbrio entre a formação e a degradação dos componentes da matriz cartilaginosa, com bastante aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias que atuam diretamente sob os condrócitos e influenciam no mecanismo fisiopatológico, inflamação e dor da doença (BLANEY, VAN e VAN, 2016; DJIBERSOU *et al.*, 2020; MCDUGALL, 2020). Com a necessidade de definir adequadamente a OA, em 2008, na *Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* e *Food and Drug Administration (FDA)*, pesquisadores/membros, discutiram sobre prevenção, diagnóstico e tratamento da OA e houve um consenso de que a OA é uma doença usualmente progressiva das articulações sinoviais, com grande insuficiência na reparação das lesões articulares, sendo o tecido cartilaginoso, o mais afetado (DJIBERSOU *et al.*, 2020).

Sendo assim, nos dias atuais, a OA é definida como uma doença crônica, progressiva e que causa um processo degenerativo na articulação com perda de superfície da cartilagem articular, levando a um processo inflamatório e dor local, comprometendo assim, a integridade da articulação (BLANEY DAVIDSON *et al.*, 2017; DJIBERSOU *et al.*, 2020). As alterações podem ser estruturais e/ou funcionais, atingindo não somente os componentes articulares, mas a sinóvia e o líquido sinovial, como também os tecidos adjacentes incluindo tendões, ligamentos, meniscos, cápsula articular e osso subcondral (PHILPOTT e MCDUGALL, 2020). Até o momento, a OA não tem cura e o tratamento é voltado na redução da dor, restabelecimento da função articular, melhora da qualidade de vida e minimizar os efeitos danosos da patologia, assim como os efeitos colaterais de medicamentos e terapias (BURSTON *et al.*, 2016). O processo degenerativo acompanhado de inflamação e dor, culmina em limitações funcionais, impactando o indivíduo, significativamente, em suas Atividades de Vida Diária (AVD'S), relacionadas ao autocuidado e a manutenção do corpo, como, por exemplo, tomar banho, trocar de roupa, dentre outras. (KIM *et al.*, 2020)

2.2 Fisiopatologia, inflamação e dor da OA

A fisiopatologia da OA se inicia com a degradação progressiva da cartilagem articular, espessamento ósseo subcondral e formação de osteófitos, sendo que esses eventos irão gerar um processo articular inflamatório, com dano tecidual prolongado e subsequente dor crônica (PHILPOTT e MCDOUGALL, 2020).

O marco principal de degradação da cartilagem na OA é o processo inflamatório, que irá estimular um grupo de glicoproteínas coletivamente chamadas de citocinas, responsáveis pela coordenação, amplificação e regulação da magnitude e duração dos eventos inflamatórios e, conseqüentemente, de seus efeitos (DJIBERSOU *et al.*, 2020). Essas citocinas são produzidas e liberadas, principalmente pelas células do sistema imune, entre elas, citocinas pró-inflamatórias, como, *Fator de Necrose Tumoral -Alpha* (TNF- α), *Interleucina-1 β* (IL-1 β) e *Interleucina-6* (IL-6), sendo expressadas ectopicamente em condrócitos, macrófagos sinoviais e fibroblastos levando a estímulos catabólicos e ativação e sinalização de fatores de transcrição celular como, *TGF β -quinase 1 - TAK1* e *Factor Nuclear Kappa B* (NF- κ B), responsáveis por respostas inflamatórias e imunes, desempenhando um papel importante na patogênese da AO (MARGARET *et al.*, 2015). DENG *et al.* (2018) detalham os eventos como via de ativação do TAK1 e NF- κ B, estimulada por mitose, irá recrutar as proteínas quinases inflamatórias, ou seja, mediadores inflamatórios clássicos, entre eles, citocinas pró- inflamatória, como *Interleucina-1* (IL1), *Fator de Necrose Tumoral Alpha* (TNF- α) e *Receptores Toll-Like* (TLRs), com isso, essas citocinas estimulam a liberação de colagenase e proteases, ambas enzimas catalisadoras, que irão degradar as proteoglicanas pelo condrócito, sendo o marco do processo degenerativo e inflamatório na articulação (DENG *et al.*, 2018; VICENTE, 2019).

A degradação da cartilagem ativada pelas vias TAK1 e NF- κ B, irão sintetizar constantemente, citocinas pró-inflamatórias, com subsequente dor crônica decorrente do dano tecidual prolongado, devido a hipersensibilização das vias nociceptivas periférica e central (VICENTE, 2019).

2.3 Etiologia e Epidemiologia da OA

Toda articulação sinovial pode ser susceptível à OA, porém, as articulações submetidas a situações de sobrecarga mecânica e impactos repetitivos nos tornozelos, quadris e joelhos apresentam maior prevalência na ocorrência da patologia, onde, em sua etiologia, os principais fatores de risco são: gênero, idade, trauma, uso excessivo da articulação, genética e obesidade, contudo, também pode ser classificada em primária e secundária (MARTINS, 2017; CARVALHO, COSTA e SILVA, 2018). A primária é de ordem desconhecida a lesão, nesse

caso, abrange o fator hereditário, o envelhecimento e a sobrecarga nas articulações, propiciando eventos degenerativos à articulação (BONETTI, SOUZA e RESMINI, 2020). Já na secundária, são considerados vários fatores, como os traumáticos, infecções articulares, necrose avascular, doenças inflamatórias, doenças metabólicas e doenças hemorrágicas (BONETTI, SOUZA, e RESMINI, 2020; COSTA, *et al.*, 2021).

A articulação sinovial é susceptível à OA, entretanto, articulações submetidas a situações de sobrecarga e imposição de impacto como tornozelos, quadris e joelhos apresentam maior prevalência na ocorrência da patologia. Sua causa é multifatorial e não está totalmente elucidada, porém, sabe-se que fatores locais como sobrecarga ou condições biomecânicas que alteram a distribuição de forças sob a superfície articular como deformidade por traumas repetitivos na articulação, sarcopenia e desnutrição, afetam os vetores de forças aplicadas à articulação gerando processo de desgaste (SILVA, 2017; CARVALHO, COSTA & SILVA, 2018; COSTA, *et al.* (2021). As principais estruturas articulares a serem acometidas são, joelhos, quadris, mãos e coluna vertebral, causando disfunções articulares (COSTA, *et al.*, 2021). Tais disfunções possuem como característica a prevalência pela população adulta, a qual sofre em reflexo das limitações funcionais acometidas e na qualidade de vida (MARTINS, 2017).

O período mais comum de início do desenvolvimento da afecção é entre 50 e 60 anos, com um aumento exponencial de sintomas em indivíduos acima de 50 anos entre 44% e 70% de idade, já na faixa etária acima de 75 anos, esse número eleva-se a 85% (BONETTI, SOUZA, e RESMINI, 2020; COSTA, *et al.*, 2021)

Segundo, MARTINS, CARRILHO, ALVES, CASTILHO e CERRI (2016) e WIDDIFIELD *et al.* (2017); CARVALHO, COSTA, e SILVA (2018) em relação ao sexo, há uma maior prevalência pelo sexo feminino (92,31%) se comparadas a pacientes do sexo masculino (7,61%). Por se tratar de uma doença reumática, progressiva e com dor crônica, gera um impacto psicossocial enorme, afetando não apenas o paciente, como também sua família e sua carreira profissional (SALMON, *et al.*, 2016; LAIRES *et al.*, 2018). Estima-se que seja uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, responsável por 9,6 milhões de anos de vida com incapacidade. (SAFIRI *et al.*, 2017; LAIRES *et al.*, 2018)

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Seguro Nacional (INSS), ocupa o terceiro lugar na lista dos segurados, com 65% das causas de incapacidade e representa 7,5% de todos os afastamentos de trabalho, ocupando o terceiro lugar entre as causas de pagamento

de seguros da Previdência Social. Em relação ao ranking de aposentadoria, segundo dados da previdência social no Brasil, é a quarta com 6,2% a determinar as aposentadorias e a segunda doença entre as que justificam auxílio inicial e auxílio-doença. Além disso, representa uma das principais causas de incapacidade e morbidade em pessoas com 45 anos de idade (LAIRES *et al.*, 2018).

2.4 Farmacoterapia

A OA é uma doença que leva sofrimento e dor ao indivíduo, requer cuidados e orientação médica (BURSTON *et al.*, 2016). Como a patologia abrange décadas da vida de um paciente, é provável que os pacientes com OA sejam tratados com várias intervenções não farmacêuticas e farmacêuticas, muitas vezes em combinação (Diretrizes da American College of Rheumatology/Arthritis Foundation, 2019). Seguindo as orientações das DIRETRIZES (2019), recomenda-se que a conduta inicial no tratamento de indivíduos com OA seja realizado com medidas não farmacológicas que vão de intervenções educacionais, comportamentais, psicossociais e físicas. Em relação as terapias farmacológicas atuais da OA, não cabe aqui descrever todas as classes de medicamentos especificamente, pois há uma vasta gama e critérios de conduta, sendo uma decisão feita por um médico especialista, porém, são focadas na diminuição da dor, na melhora da função com analgésicos, anti-inflamatórios não Hormonais (AINH) de uso oral e tópico, intra-articular e até mesmo artroscopia. Para os analgésicos chamados opióides fracos, recomenda-se o uso em associação com praticar atividades físicas (Diretrizes da American College of Rheumatology/Arthritis Foundation, 2019). AINHs orais continuam sendo a escolha padrão no tratamento farmacológico da OA, e seu uso é fortemente recomendado, sendo sua eficácia bastante comprovada a curto prazo, porém, as Diretrizes não têm abordado os méritos relativos de diferentes AINHs, há evidências sugerindo que certos agentes podem ter perfis de efeitos colaterais mais favoráveis do que outros (Diretrizes da American College of Rheumatology/Arthritis Foundation, 2019).

Com relação as intervenções intra-articulares, as infiltrações são em situações específicas e o médico reumatologista poderá optar em realizar o uso de corticóides (CARVALHO, COSTA e SILVA, 2018). O efeito é imediato, mas busca-se reduzir a inflamação intensa, para permitir adesão a tratamento de mais longo prazo (CARVALHO, COSTA e SILVA, 2018). Outra conduta realizada é a viscosuplementação, onde o médico irá infiltrar uma substância derivada ou parecida com o ácido hialurônico com o objetivo de reduzir bastante a dor em até 60% dos pacientes (CARVALHO, COSTA e SILVA, 2018; Diretrizes da American College of Rheumatology/Arthritis Foundation, 2019). Esse ácido hialurônico é um dos componentes do

líquido sinovial, líquido existente nas articulações, porém, isso não causará restauração da cartilagem (Diretrizes da American College of Rheumatology/Arthritis Foundation, 2019). As diretrizes seguem relatando que o tratamento é duradouro, entre seis meses a um ano, desta forma, a conduta é preconizar o monitoramento regular para que se evite o desenvolvimento de potenciais efeitos adversos gastrointestinais, cardiovasculares e renais e potenciais interações medicamentosas (Diretrizes da American College of Rheumatology/Arthritis Foundation, 2019).

2.5 Uso de plantas medicinais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que as plantas medicinais são importantes instrumentos da assistência farmacêutica e que seus compostos ativos são usados como agentes terapêuticos, sendo assim, expressando uma necessidade através de ações normativas do Governo Federal (BELEZA, 2016). O uso sustentável da biodiversidade, ocasionou a adoção de várias medidas e a preservação do conhecimento tradicional, assim como o incentivo à pesquisa e desenvolvimento tecnológico na área (Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/Ministério da Saúde, 2016). No Brasil, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, e a utilização dessas fontes naturais tem um papel importante nos cuidados primários de saúde, principalmente nas comunidades de difícil acesso a medicamentos. A criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) vem para reforçar o uso racional e seguro da fitoterapia no Brasil, que busca objetivar a ampliação das opções terapêuticas e melhorias da atenção à saúde aos usuários do SUS (Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/Ministério da Saúde, 2016).

2.5.1 Urucum (*Bixa orellana*)

Entre as diversas fontes naturais de plantas medicinais, está o urucum (*Bixa orellana*) sendo uma espécie da Amazônia brasileira, da família do *Bixaceae* (FREIRE, 2017). Uma planta de espécie vegetal arbustiva, rústica e conhecida como urucuzeiro, que teve origem na América Tropical, possui um ciclo de vida longo, ou seja, é uma planta perene (SILVA, 2019). É uma árvore que cresce de 3 a 5 m de altura, com uma copa de árvore desenvolvida. A folha é simples, medindo 8 a 15 cm de comprimento (FREIRE, 2017) (Figura 1).

Figura 1- Urucum

Fonte: Disponível na internet.

Segundo, FREIRE (2017), sua classificação botânica é: Subdivisão: Angiosperma; Classe: Dicotyledoneae; Ordem: Parietales; Sub-ordem: Cistianeae; Família: *Bixaceae*; Gênero: *Bixa*; Espécies: *Bixa orellana* (tipo mais cultivado), *Bixa arbórea*, *Bixa Americana*, *Bixa urucurana*, *Bixa pupurea*, *Bixa upatensis*, *Bixa tinetoria*, *Bixa oviedi*. Com relação a sua nomenclatura existe uma variedade de denominações, entre eles urucu, em tupi “*uru-ku*”, cujo significado é vermelho, *rocou* e *rocuyer* (República Dominicana e Guiana francesa), *rocuyer* (França), *urukú* (Paraguai), *atole* (Peru), *achiote* (Colômbia), *bija* (Cuba), *achiote*, *bija*, *onoto* (Venezuela), e ainda *changuaricá*, *pumacuá*, *K'uzub*, são os nomes dados no México (FREIRE, 2017). No Brasil é popularmente chamado de urucum e açafrão, sendo um dos maiores produtores de grãos de urucum no mundo (CAIMARI *et al.*, 2015). Em relação a essa produção, 70% são usados na culinária como corante natural ou como corante alimentar e 10% para a exportação (CAIMARI *et al.*, 2015). Além de ser um aditivo alimentar, urucum é usado na medicina popular contra doenças coronárias, estômago e intestinos afetos, queimaduras, infecções respiratórias e também como anti-térmico e problemas renais (CAIMARI *et al.*, 2015).

De acordo com SILVA (2019), o urucum (*Bixa orellana*), possui, em sua composição nutricional, cerca de 40 a 45% de celulose, com um teor de 17,5% de lipídeos distribuídos na forma de ácido linolênico, alfa linoléico e oleico, sua proteína é composta por 13% a 16% e 10,6 % de aminoácidos, suas cinzas estão em torno de 5,4% contendo alto conteúdo de fósforo, ferro e zinco, já o teor de seus açúcares são de 3,5 a 5,5%, sua quantidade de pigmentação é de 1,0 a 4,5%. Possui cerca de 3% de óleo fixo e de 0,3 a 0,9% de óleo essencial (SILVA, 2019).

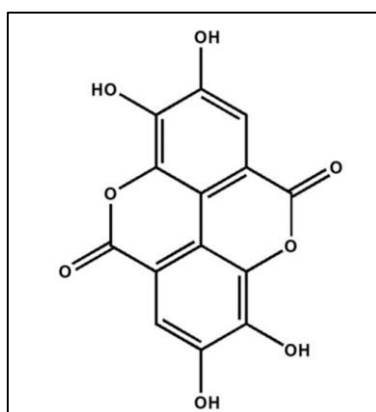
A semente também contém *bixina* e *norbixina*, apresenta também outros carotenos em menores quantidades, são eles, *isobixina*, *beta caroteno*, *criptoxantina*, *luteína*, *zeaxantina* e a *orellina* (SILVA, 2019).

A *Bixa orellana* vem sendo utilizado de diversas formas, principalmente na culinária para realçar a cor dos alimentos e nos dias de hoje continua sendo utilizado pelos indígenas para a pintura do corpo, para proteger contra insetos e aplicação medicinal (SOMACAL *et al.*, 2015). Em relação à aplicação medicinal, a *Bixa orellana* vem sendo muito bem esplanada e estudada, pelo fato de apresentar várias funções biológicas com efeito anti-inflamatório em feridas, cura de bronquites e queimaduras, efeito laxativo, expectorante, antibiótico, além de cardiotônico e hipotensores (SOMACAL *et al.*, 2015; SILVA, 2019).

Existe uma expectativa muito promissora para o Brasil se destacar no cenário mundial como maior exportador de urucum devido sua produção em grande escala, sendo os estados do Acre, Amazonas, Pará, Bahia, Ceará, Paraíba, Maranhão e Piauí coo maiores produtores (SOMACAL *et al.*, 2015; SILVA, 2019). Atualmente, outros estados, como Rio de Janeiro e São Paulo têm se dedicado no cultivo deste vegetal (SILVA, 2019). Apesar de ser amplamente estudada, as pesquisas vêm crescendo, particularmente, referentes aos seus compostos fitoquímicos, ou seja, conhecer seus constituintes químicos e avaliar a presença de inúmeras metabólicos em sua composição para formulação para propriedades terapêuticas (SILVA, 2019).

A *Bixa orellana* possui vários constituintes químicos, podendo destacar os alcalóides e flavanóides (GARCÍA *et al.*, 2011; MEDINA-FLORES *et al.*, 2016). Em suas folhas estão presentes também vários compostos secundários, entre eles está o Ácido Elágico, (estrutura do núcleo central do ácido elágico identificado na figura 2), um dos compostos ativos com potencial atividade farmacológica (MEDINA-FLORES *et al.*, 2016)

Figura 2 - Estrutura básica do Composto Isoloda da *Bixa Orellana* (Ácido Elágico)



Fonte: MORAES-NETO *et al.*, 2022

Até onde se sabe, estudos voltados para *Bixa Orellana* e efeitos anti-inflamatórios e antinocioceptivos em articulações são promissores e veem crescendo exponencialmente, sendo assim, nosso estudo é de ampla relevância, pois teve como objetivo investigar o potencial efeito anti-inflamatório e antinocioceptivo da fração acetato de etila (BoEA) e ácido elágico (ElAc) das folhas de *Bixa orellana* em modelo experimental de OA induzida por MIA, com um intuito de desenvolver um fitoterápico de baixo custo, boa eficácia, e sem causar danos ao organismo de pacientes acometidos pela OA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Processamento de Espécies Vegetais

As folhas de *Bixa orellana* foram coletados nas coordenadas 2°58'08" S, 44°21'98" W – Localizador: 689QCQ9J+M2 (Junho e Julho de 2021) e identificado no herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (São Luís, Brasil, comprovante de espécime 1147, SISGen AA8EBE7). As folhas passaram pelo processo de secagem a 40°C em estufa com circulação de ar e depois pulverizadas em moinho elétrico para obtenção do pó. Em seguida, 688 g do material vegetal foi submetido ao processo de extração por maceração, usando o solvente extrator etanol PA (99%) e água (70:30 v/v), sob agitação constante por um período de 24h. Após a extração, o material foi rotoevaporado a 40° C, em seguida liofilizado e obtido o extrato bruto hidroetanólico (BoHE). Foi obtido 146,1 g do extrato bruto e em seguida ressuspensos em metanol-água na proporção 7:3, a mistura obtida foi filtrada. Em seguida o filtrado metanol-água resultante foi colocado em funil de separação, onde foi Particionado com Acetato de Etila (PAC) e o material foi novamente levado para rotoevaporador a 40° C, sendo obtida a fração acetato de etila (BoEA).

3.2 Análise para quantificação de ácido elágico na fração acetato de etila

A fim de otimizar as condições cromatográficas para a quantificação do ácido elágico (ElAc) presente na fração, a BoEA foi submetida a análise usando o método de detecção de matriz de fotodiodos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA), $\lambda = 254$ nm, (Shimadzu, Kyoto, Japan). O ácido elágico na fração BoEA foi quantificado por comparação ao composto padrão ácido elágico (Sigma-Aldrich; San Luis, MO, USA).

A preparação da amostra consistiu de uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida, utilizando-se um cartucho Phenomenex Strata C18 (500 mg/6 mL), previamente ativado com 5 mL de metanol e equilibrado com 5 mL de metanol:água (95:5, v/v). Uma solução de 2 mL da fração acetato de etila em metanol:água (95:5, v/v), em concentração de 5 mg/mL⁻¹, foi eluída com a mesma fase móvel utilizada para equilíbrio do cartucho e coletada em balão volumétrico de 5 mL, tendo seu volume completado ao final da eluição. Ao final, a solução foi filtrada em um filtro Millex com tamanho de poro de 0,22 μ m. Aliquotas de 10 μ L desta solução foram injetadas no HPLC. Várias condições foram avaliadas para que se obtivesse a melhor separação dos picos majoritários (**Figura 3**).

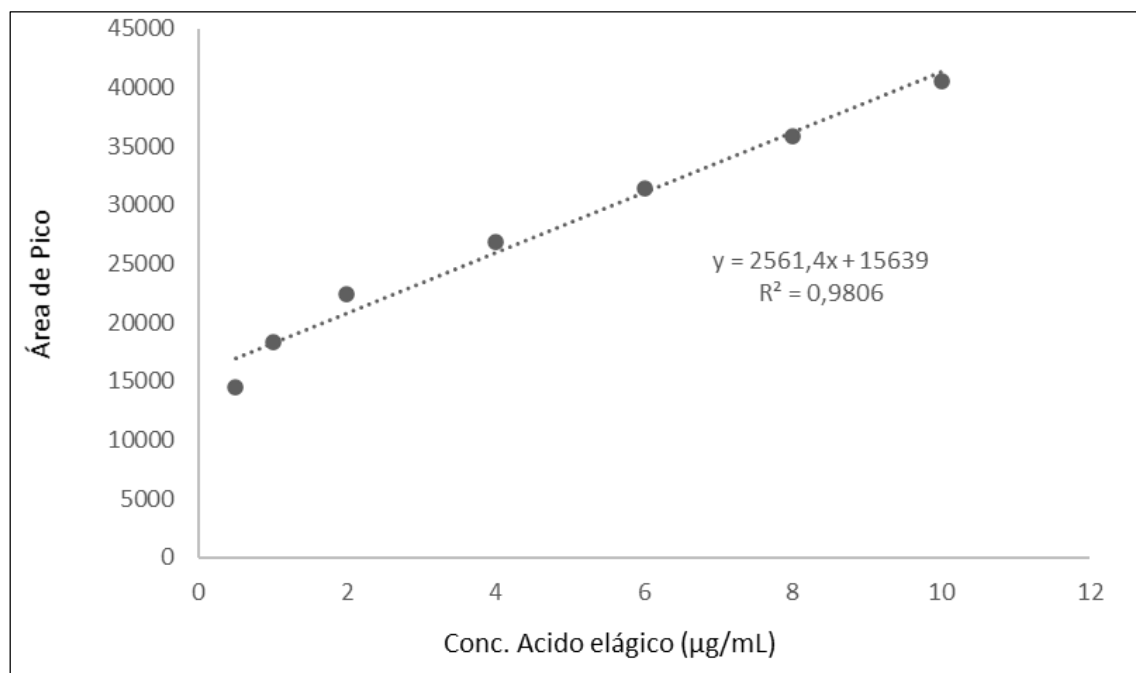


Figura 3 - Curva analítica obtida pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de solução padrão Ácido Elágico.

3.3 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados 25 ratos *Wistar* fêmeas (*Rattus Norvegicus*), com 8 semanas de idade, pesando 250-300 g, obtidos do Biotério Central da UFMA (Biotério Central). Ao longo de todo período experimental, os ratos foram alimentados com ração padrão e água *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade (40–60%) e doze horas ciclo claro-escuro. Todos os protocolos de avaliação experimental foram aprovados e autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), sob o protocolo de aprovação 23115.031386/2019-28. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as Diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) para o Uso de Animais em Pesquisa.

3.4 Indução de OA por MIA

Para a realização das induções da OA, os animais foram previamente sedados com o composto de cloridrato de ketamina[®] 10% (90 mg/kg) para em seguida serem anestesiados por meio de Cloridrato de xilazina[®] 2% (5 mg/kg) em região intraperitoneal. Após confirmação do prodedimento anestésico, com o joelho flexionado em um ângulo de 90° foi aplicado uma solução tópica de iodopovidona a 10% para assepsia local e induzido a OA com única administração intra-articular de MIA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no joelho direito com volume máximo de 2 mg/25 µL na articulação fêmur tíbio-patelar, através do ligamento

patelar (SILVA; ANDERSEN E TUFIK, 2008).

3.5 Desenho experimental

No dia 0 (Zero) foi induzido a OA por MIA, em uma única injeção intra-articular de 2 mg/kg (n=25). Em seguida, os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais e após 4 dias de indução, os grupos iniciaram os tratamentos via gavagem de 12/12 horas, individualmente para cada animal. Para efetivar o procedimento utilizou-se uma agulha de aço inox, com cânula de 1,2 milímetros (mm) de diâmetro, esfera de 2,3mm, raio de 40mm e 54mm de comprimento, própria para gavagem em ratos. A esta agulha foi acoplada uma seringa de 10 mililitros (mL). A gavagem foi realizada administrando-se 1 mL de sorbitol, indometacina ou frações dependendo de cada grupo experimental. O valor do volume era definido de acordo com a pesagem do animal realizado antes do procedimento. O Grupo Clean: Sem indução e sem tratamento (n=3); Grupo CTL - com OA e tratado com sorbitol 10% (n=3); Grupo Sham: Sem OA e sem tratamento (n=3); Grupo CTL +: com OA e tratado com indometacina na dose de 2,5 mg/kg/dia (n=4); Grupos BoEA: com OA e tratados nas doses de 50 mg/kg/dia(n=4) e 100 mg/kg/dia (n=4) e Grupo ElAc: com OA e tratado na dose de 50 mg/kg/dia (n=4). Nos dias , 4, 7, 14, 21 e 28 após a indução, foram realizadas as análises clínicas relacionadas aos parâmetros de atividade motora, alodinia mecânica, incapacidade articular. No 29º dia, foi realizada eutanásia por anestesia profunda em via intraperitoneal na dosagem de 0,3 ml de Xilazina (80mg/kg) + 0,3 ml de Ketamina (10mg/kg). Todo material biológico foi retirado por punção da aorta. Foram coletados aproximadamente 08-10 mL de sangue em tubos contendo EDTA e, em seguida, centrifugadas a 500 xg durante 10 minutos. O soro foi aliquoteado e congelado em freezer – 80°C para análise posteriores de citocinas (**Figura 4**).

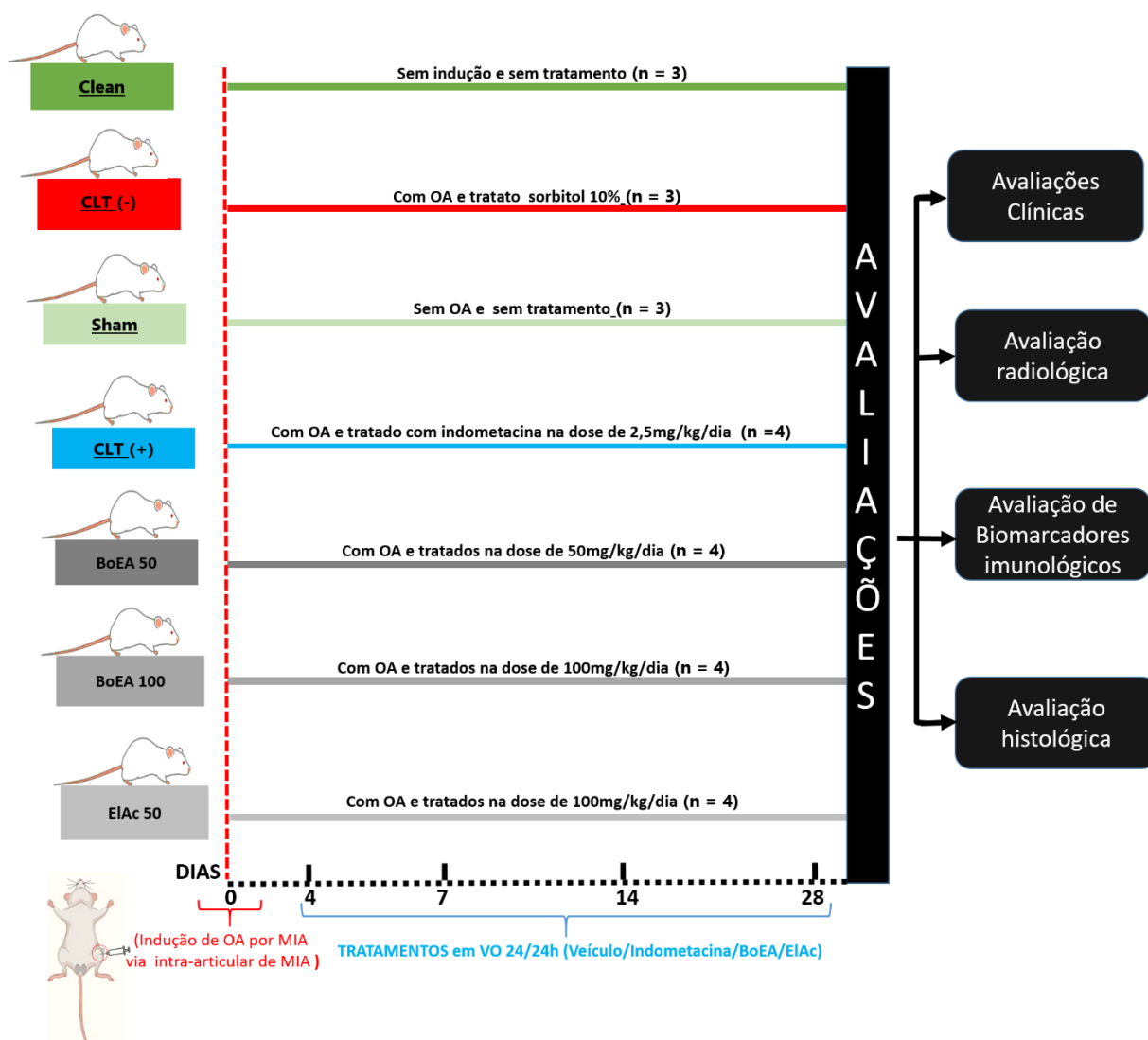


Figura 4. Desenho experimental

3.6 Determinação das concentrações sorológicas de IL-10 e TNF- α por ELISA

O método de ELISA (ensaio imunoenzimático) é um ensaio imunoenzimático, por princípio de interação antígeno-anticorpo. A técnica foi realizada para quantificar a concentração das citocinas *Interleucina-10* (IL-10) e TNF- α do material biológico. Desse material, foram coletados aproximadamente 08-10 mL de sangue em tubos contendo EDTA e, em seguida, centrifugadas a 500 xg durante 10 minutos. O soro foi aliquoteado e congelado em freezer – 80°C. Para análise das citocinas, o material biológico foram coletados o soro sanguíneo dos tubos secos com gel separador e armazenados em criotubos em ultrafreezer a -80°C. As amostras séricas dos grupos foram analisadas quantitativamente por ensaio imunoenzimático sanduíche para citocinas TNF- α e IL-10, seguindo as instruções técnicas dos kits e equipamentos de dosagem de citocinas de acordo com o manual de instrução do fabricante

(R&D Systems®-Minneapolis, MN, EUA). Esse método foi utilizado usando anticorpos monoclonais (MAbs). Após esse procedimento, os anticorpos foram marcados adicionando uma enzima através de reações cromogénicas. Para a quantificação dos volumes de IL-10 e TNF- α foram realizados por calorimetria medindo a absorvância proporcional a concentração de cada citocina estudada. Uma curva de calibração foi traçada e as concentrações das citocinas foram determinadas por interpolação a partir da curva de calibragem. Todas as concentrações de IL-10 e TNF- α foram determinadas pelo método de enzimaímunoensaio utilizando o aparelho de leitura de microplacas com sistema de 8 canais de ópticos fotométricos para medição da densidade óptica de luz vertical do modelo TP Reader Basic (THERMOPLATE®).

3.7 Testes Clínicos

3.7.1 Avaliação da atividade motora - deambulação forçada (*RotaRod Test*)

Os animais foram colocados em um Rotarod (IITC Life Science, CA, USA), um dispositivo semelhante a um rotor, girando a uma velocidade de 4 a 40 rpm por um período de 300 s. Foram realizados dois testes básicos de treinamento seguidos de duas avaliações gravadas. Após a indução, foram realizadas três avaliações e registrada a latência média. Os animais tiveram um período de descanso de 15 min entre as avaliações. Os dados são expressos como valores de caminhada e foram codificados por um único visualizador. A avaliação foi realizada através de análise observacional relacionando a uma escala numérica que varia de 1 a 5, onde, 1 = uso de membro normal; 2 = mancando leve; 3 = mancando grave; 4 = desuso intermitente de membro afetado; 5 = desuso completo de membro (TONUSSI e FERREIRA, 1992).

3.7.2 Avaliação da alodinia mecânica (*Von Frey's test*)

A avaliação foi realizada com um analgesímetro digital (Modelo Insight, São Paulo, Brasil), composto por um transdutor de pressão conectado a um medidor de potência digital com medidas expressas em gramas (g). A precisão do dispositivo foi de 0,1 g. O dispositivo foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g e utilizamos os filamentos de 4 g, 10 g e 300 g mantendo uma precisão de 0,1 g com força de até 300 g. O transdutor de pressão foi conectado à perna do animal por meio de uma ponteira de polipropileno descartável de 0,5 mm de diâmetro adaptada para esse fim (CHAPLAN, 1994). O teste foi realizado dez vezes consecutivas em intervalos de dois minutos até que fossem feitas três leituras semelhantes.

3.7.3 Avaliação da incapacitação articular (*Weight-Bearing test*)

A distribuição de peso através do joelho direito e esquerdo foi avaliada usando um Incapacitance Meter® (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, EUA) para medir a distribuição de WB nos dois membros pélvico. A força exercida por cada membro posterior foi medida e analisada em gramas, mas relatada em porcentagem do peso corporal total (%BW) para normalizar os dados. Os ratos foram deixados a aclimatar-se ao aparelho de teste e quando estacionários, as leituras foram feitas durante um período de 3 s. Triplicatas foram tiradas simultaneamente para cada membro em cada ponto de tempo (SERVIN *et al.* 2020).

Para avaliar o uso do membro afetado, os animais foram colocados em uma câmara de vidro angulada com cada pata traseira apoiada em diferentes plataformas. O peso exercido em cada perna traseira foi medido em gramas por cinco segundos e a medição final foi uma média de três. As mudanças na distribuição de peso foram calculadas usando a seguinte fórmula:

$$\text{Distribuição de peso (\%)} = \text{APW}/(\text{APW} + \text{CPW}) \times 100 \quad (1)$$

Onde APW representa o peso da pata afetada e CPW representa o peso da pata contralateral.

3.8 Análise Radiológica

As imagens radiológicas foram realizadas em dois planos, ântero-posterior e látero-lateral, em aparelho de Raio-X Digital Portátil com sensor de captura de imagem (Diox®). As imagens foram analisadas por um profissional, médico veterinário, especialista em imagens animais. Após as análises de todos os animais obteve-se um score de cada joelho de acordo com o método Kellgren-Lawrence (KL) para graduação da artrose (0-normal, 1- duvidoso, 2-mínimo, 3-moderado e 4-severo), e a média foi calculado para comparação (KEYES, *et al.*, 1992). Como demonstrado na **Tabela 1**

Tabela 1. Critérios de Scores para avaliação das imagens radiológicas

CLASSIFICAÇÃO	ACHADOS RADIOLÓGICOS
Nota 0	Sem Artrose: Radiologia Normal.
Grau I	Artrose Duvidosa: Estreitamento articular duvidoso, possível osteófito marginal.
Grau II	Artrose Mínima: Possível estreitamento, osteófito definido.
Grau III	Artrose Moderada: Estreitamento definido, osteófitos múltiplos, alguma esclerose subcondral, possível deformidade óssea.
Grau IV	Artrose Grave: Estreitamento articular acentuado, esclerose subcondral grave, grandes osteófitos, deformidade definida.

Fonte: Adaptado de KEYES, *et al.* [23].

3.9 Análise Histopatológica

No 29º dia foi realizada eutanásia dos animais e foram coletadas as articulações fêmur tíbio-patelar para serem fixadas em formoldeído 10% + PBS tamponado. Em seguida o material foi preparado para o processo de descalcificação em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 20% por 20 dias. Posteriormente foram submetidos ao protocolo de inclusão em blocos de parafina, cortados em seções de 5 µm e as matrizes de cartilagem orgânica foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (H&E). A análise foi realizada de forma cega por um histopatologista. O sistema de avaliação histopatológica das cartilagens, seguiu os protocolos adaptados de acordo com as diretrizes da Osteoarthritis Research Society International (OARSI; PRITZKER *et al.*, 2006). Os parâmetros são relacionados aos estágios da OA com base na extensão da superfície da cartilagem articular, área ou volume envolvido na OA local. O grau de OA é com base na extensão da patologia na profundidade da cartilagem e os pontos são atribuídos variando de 0 (superfície intacta) a 6 (perda de espessura total da cartilagem e deformação óssea), como demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Critérios de Scores para avaliação histopatológica.

GRAU	PARÂMETROS AVALIATIVOS
GRAU 0: Superfície intacta, cartilagem morfologia intacta	- Matriz: arquitetura normal Células: intactas, orientação apropriada
GRAU 1: Superfície intacta	- Matriz: zona superficial intacta, edema e/ou fibrilação superficial (abrasão), condensação focal da matriz superficial Células: morte, proliferação (aglomerados), hipertrofia, zona superficial - A reação deve ser mais do que apenas fibrilação superficial
GRAU 2: Descontinuidade de superfície	- Descontinuidade da matriz na zona superficial (fibrilação profunda) - Desorientação das colunas dos condrócitos: morte, proliferação (aglomerados), hipertrofia
GRAU 3: Fissuras Verticais (fissuras)	- Fissuras verticais da matriz na zona média, fissuras ramificadas - Células: morte, regeneração (aglomerados), hipertrofia, domínios cartilaginosos adjacentes às fissuras
GRAU 4: Erosão	- Perda da matriz da cartilagem: delaminação da camada superficial, formação de cisto na camada média - Escavação: perda da matriz camada superficial e zona média
GRAU 5: Desnudamento	- Superfície: osso esclerótico ou tecido reparador incluindo fibrocartilagem dentro da superfície desnudada. - Microfratura com reparo limitado à superfície óssea
GRAU 6: Deformação	- Remodelação óssea (mais do que apenas formação de osteófitos). Inclui: microfratura com reparo fibrocartilaginoso e ósseo estendendo-se acima da superfície anterior

Fonte: Adaptado de PRITZKER, *et al* [24].

3.10 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizado com o auxílio do *Software* GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, EUA). Primeiramente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk apresentando um ($p > 0,05$) para testes paramétricos. Todos os experimentos foram realizados independentemente pelo menos três vezes, e os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP). As comparações de grupo foram avaliadas com o teste t de *Student* ou ANOVA de uma via para comparação de várias colunas, seguido do teste de Post-hoc *Bonferroni*. Um valor de $P < 0,05$ (bicaudal) foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Quantificação de ElAc na fração BoEA das folhas de *Bixa orellana*

Por meio das análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PDA) foi possível identificar a presença do ácido elágico, pico com tempo de retenção (R_t) médio em 37.82 min. A identificação foi realizada a partir da comparação com o padrão de ácido elágico e seu espectro na região do ultravioleta. Foi realizada a separação com coluna Phenomenex Luna C18 (25 cm x 4.6 mm x 5 μ m) , e gradiente de fase móvel composta água (A):metanol (B) contendo 0,01% de FA (ácido fórmico) e monitoramento em 254 nm. O gradiente foi escalonado nas seguintes condições: 5% de B em 2 min, 5-25% de B de 2-10 min, 25-40% de B de 10-20 min, 40-50% de B de 20-30 min, 50-60% de B de 30-40 min, 60-70% de B de 40-50 min e 70-100% de B de 50-60 min. Nas condições empregadas, obteve-se separação de linha base para os principais componentes da amostra. A curva analítica apresenta boa linearidade no intervalo de concentração estudado e coeficientes de correlação (R^2) com valor de 0,98, o que indica que há uma boa correlação entre as áreas de picos e as concentrações estudadas. A determinação da concentração de ElAc foi realizada diretamente na fração acetato de etila, obtida a partir do extrato de *Bixa orellana*. Desta maneira tentou-se chegar a resultados mais representativos com relação à real composição do metabólito secundário e assim evitar possíveis erros sistemáticos. Através das análises em CLAE – DAD e construção da curva de quantificação foi possível mensurar o ElAc livre presente na BoEA, com um teor de 59,35 mg de ElAc contido em 1 g da fração, o que equivale a um percentual de 5,93% (**Figura 5**).

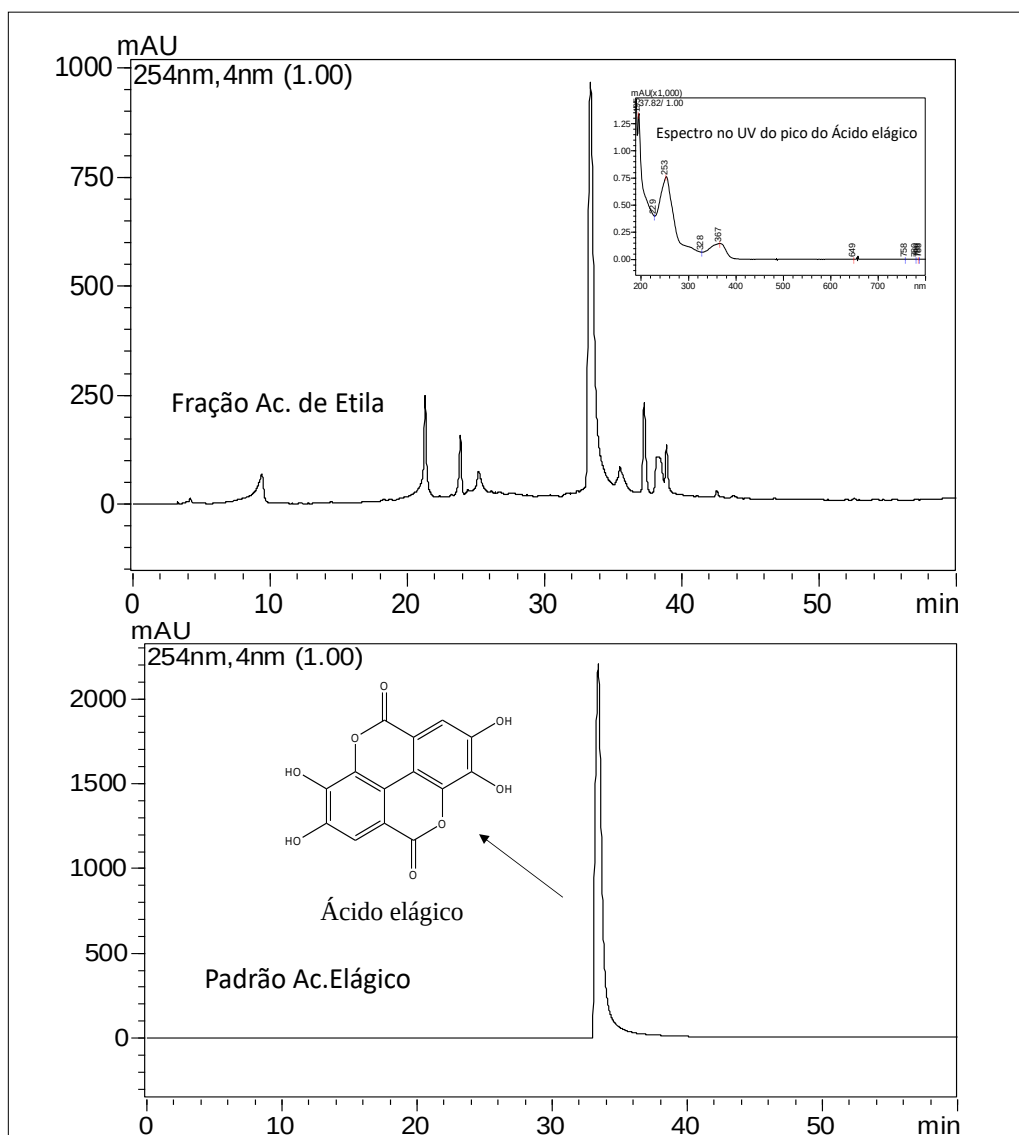


Figura 5. Cromatograma da fração acetato de etila de *Bixa orellana* e do padrão ácido elágico. Coluna Phenomenex® Luna C18 (250 x 4,6mm i.d.; 4µm), fluxo 1,0 ml/min-1, Solventes: A=H₂O, B=MeOH ambos com FA 0,01%.

4.2 Avaliações Clínicas

4.2.1 Avaliação da Atividade Motora (*Rotarod test*)

Avaliando a deambulação dos animais, observamos no D4 uma diminuição no escore de caminhada forçada, conforme esperado. A **figura 6**, mostra a avaliação da atividade motora por meio da deambulação forçada, com isso, analisou-se o comportamento do tratamento em relação a causa/efeito dos grupos e em vários momentos do experimento. Todos os animais apresentaram scores semelhantes antes da indução, sem valores significativos (5 ± 0 ; $p > 0,9999$). No 4º dia de indução e tratamento, observou-se marcha clinicamente diferente com diferença significativa dos grupos de tratamento CTL- (1 ± 0 ; $p = 0,0001$); CTL+ ($4,6 \pm 0,48$; $p = 0,002$); BoEA 50 mg/kg ($4,2 \pm 0,40$; $p = 0,002$); BoEA 100 mg/kg ($4,6 \pm 0,48$; $p = 0,002$) e

ElAc 50 mg/kg ($4,6 \pm 0,48$; $p=0,002$) quando comparados com os grupos Clean (5 ± 0) e Sham (5 ± 0). Esse comportamento se manteve até o 14º dia de tratamento.

A partir do 21º dia de tratamento, os grupos, Clean (5 ± 0 ; $p=0,0001$), Sham (5 ± 0 ; $p=0,0001$), CTL+ (4 ± 0 ; $p=0,0001$), BoEA 50 mg/kg ($4 \pm 0,89$; $p=0,0001$), BoEA 100 mg/kg ($4,2 \pm 0,4$; $p=0,0001$) e ElAc 50 mg/kg ($4,2 \pm 0,4$; $p=0,0001$) apresentaram marcha clinicamente diferente quando comparados com o CTL- (2 ± 0). Já no 28º dia de tratamento, observou-se marcha clinicamente simétrica e semelhante para os animais CTL+ ($4,4 \pm 0,48$; $p=0,0864$) e BoEA 100 mg/kg ($4,6 \pm 0,48$; $p=0,5153$), quando comparados aos do grupo Sham (5 ± 0).

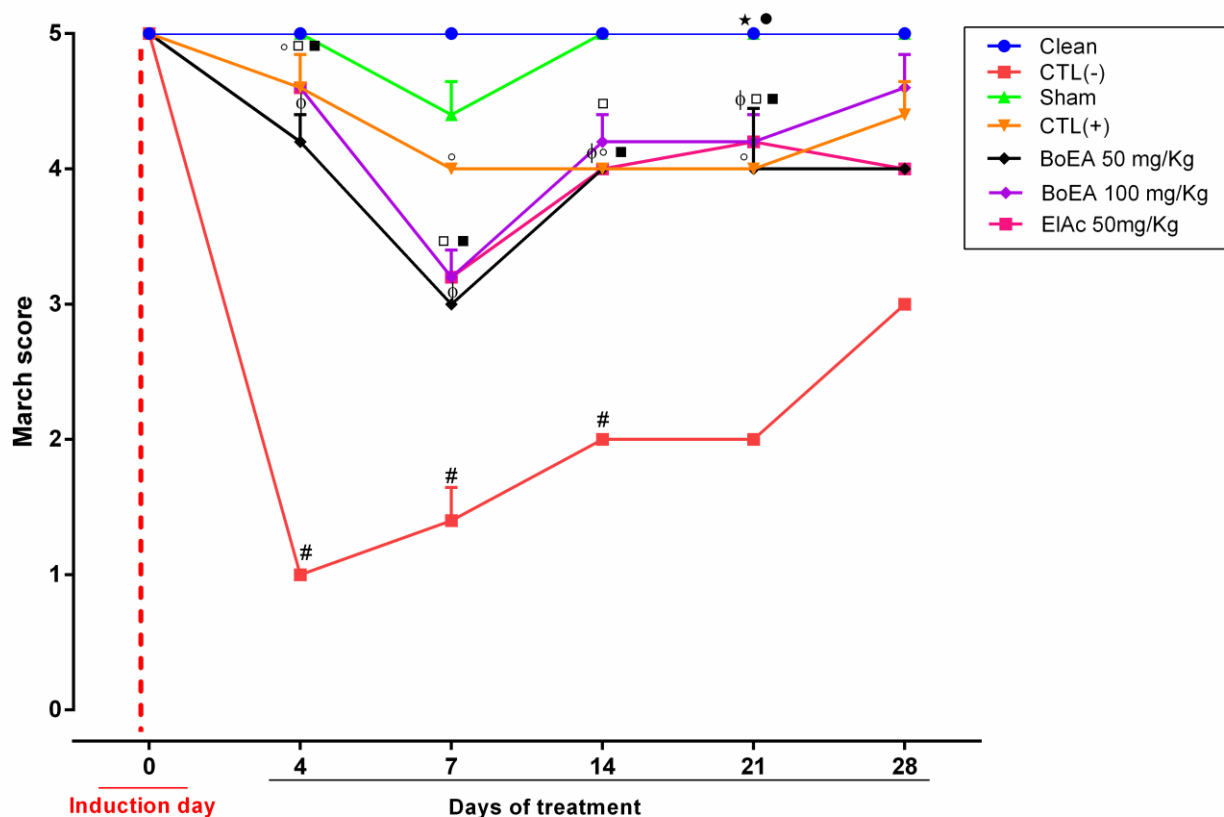


Figura 6 - Efeito da fração BoEA e ElAc na atividade motora (deambulação forçada) de ratos com OA induzida por MIA, usando o escore de Rotarod test. Os animais receberam sorbitol (CTL-), indometacina (CTL+), animais sem intervenção, controle experimental (Sham), BoEA (50 mg/kg e 100 mg/kg) e ElAc (50 mg/kg) de D4 a D28, e foram avaliados nos dias 7, 14, 21 e 28, após a indução da OA. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão das médias (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguida pelo teste *Post-hoc* de Bonferroni. # $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos CTL- versus Clean nos dias 4, 7, 14. $\circ$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos CTL+ versus Clean nos dias 4, 7, 14 de indução. ϕ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos BoEA 50 mg/kg versus Clean nos dias 4, 7, 14. $\square$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos BoEA 100 mg/kg versus Clean nos dias 4, 7, 14. $\blacksquare$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos ElAc 50 mg/kg versus Clean apresentou diferença estatisticamente nos dias 4, 7, 14. Os grupos que realizaram tratamento, CTL+; BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg e ElAc 50 mg/kg quando comparados com o CTL- apresentam diferença estatisticamente significativa no 21º de indução ($\circ$ $p \leq 0,05$); (ϕ $p \leq 0,05$); ($\square$ $p \leq 0,05$); ($\blacksquare$ $p \leq 0,05$), respectivamente. Abreviações: Clean, Saudável; CTL(-), Controle negativo; Sham, Simulou indução; CTL+, Controle positivo; BoEA, Fração Acetato de etila de *Bixa orellana*; ElAc, Ácido elágico.

4.2.2 Avaliação da alodinia mecânica (*Von Frey's test*)

Todos os animais iniciaram com respostas semelhantes no teste de alodinia mecânica (limiar de retirada da pata), sem diferença estatística para todos os grupos (300 ± 0 ; $p > 0,9999$). No 4º dia de indução e tratamento observou-se uma redução significativa do limiar de retirada de pata dos grupos, CTL- (2 ± 0 ; $p < 0,0001$); CTL+ (2 ± 0 ; $p < 0,0001$); BoEA 50 mg/kg (4 ± 0 ; $p < 0,0001$); BoEA 100 mg/kg ($7 \pm 2,44$; $p < 0,0001$) e ElAc 50 mg/kg ($124,8 \pm 143,6$; $p = 0,01$), demonstrando diminuição no limiar de retirada de pata. Essa diminuição do limiar nociceptivo se manteve ao longo do experimento até o 21º dia de tratamento. Em relação a causa/efeito, observou-se que no 28º dia de tratamento, os grupos BoEA 50 mg/kg (300 ± 0); BoEA 100 mg/kg (300 ± 0) e ElAc 50 mg/kg (300 ± 0) tiveram respostas semelhantes ao grupo Clean (300 ± 0), sem apresentarem diferenças estatísticas entre eles, e diferentes quando comparados ao grupo CTL- com valores significativamente diferentes (10 ± 0) (**Figura 7**).

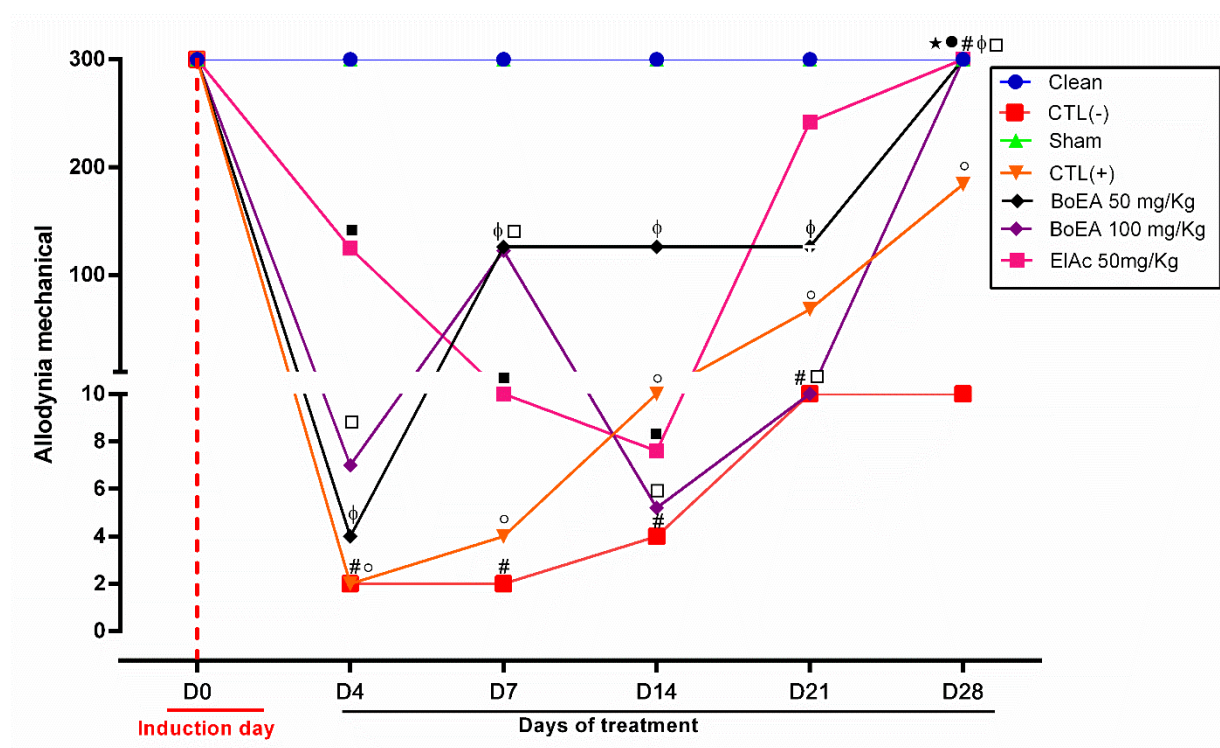


Figura 7 – Efeito da fração BoEA e ElAc na alodinia mecânica (limiar de retirada da pata) de ratos com OA induzida por MIA, usando o escore de *Von Frey's test*. Os animais receberam sorbitol (CTL-), indometacina (CTL+), animais sem intervenção, controle experimental (Sham), BoEA (50 mg/kg e 100 mg/kg) e ElAc (50 mg/kg) de D4 a D28, e foram avaliados nos dias 7, 14, 21 e 28, após a indução da OA. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão das médias (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguida pelo teste *Post-hoc* de Bonferroni. # $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos CTL+ versus Clean nos dias 4, 7, 14 e 21. ϕ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos BoEA 50 mg/kg versus Clean nos dias 4, 7, 14 e 21. $\square$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos BoEA 100 mg/kg versus Clean nos dias 4, 7, 14 e 21. $\blacksquare$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos ElAc 50 mg/kg versus Clean nos dias 4, 7, 14 e 21. Os grupos que realizaram tratamento, CTL+; BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg e ElAc 50 mg/kg quando comparados com o CTL- apresentam diferença estatisticamente significativa no 28º de indução ($\circ$ $p \leq 0,05$); (ϕ $p \leq 0,05$); ($\square$ $p \leq 0,05$) e ($\blacksquare$ $p \leq 0,05$),

respectivamente. Abreviações: Clean, Saudável; CTL(-), Controle negativo; Sham, Simulou indução; CTL+, Controle positivo; BoEA, Fração Acetato de etila de *Bixa orellana*; ElAc, Ácido elágico.

4.2.3 Teste de Incapacitação/distribuição de peso nas patas traseiras (*Weight-Bearing test*)

Todos os grupos tiveram apoio simétrico em ambos os membros posteriores no início do experimento com a pontuação inicial de $(49,23 \pm 0,07)$ mostrando ausência de desconforto articular. No 4º dia, após a indução, houve diferença estatística do grupo Clean $(46,97 \pm 0,14; p < 0,0001)$ quando comparados com os grupos CTL- $(32,90 \pm 1,6; p < 0,0001)$; ElAc 50 mg/kg $(45,04 \pm 6,6; p = 0,03)$ e BoEA 100 mg/kg $(39,58 \pm 4,03; p = 0,03)$, demonstrando sinais de desconforto articular, devido a incapacidade de distribuição de peso simétrico. Em relação a causa/efeito do tratamento, observou-se, no 7º dia de tratamento, uma diferença significativa dos grupos Clean $(43,62 \pm 6,49; p < 0,0001)$; Sham $(45,73 \pm 0,07; p < 0,0001)$; CTL+ $(40,36 \pm 3,49; p < 0,0001)$; BoEA 50 mg/kg $(32,70 \pm 1,32; p = 0,0274)$; BoEA 100 mg/kg $(34,38 \pm 3,15; p = 0,0004)$ e ElAc 50 mg/kg $(43,46 \pm 4,24; p < 0,0001)$ quando comparados com o grupo CTL- $(24,09 \pm 2,00)$, demonstrando ausência de desconforto articular, devido a melhor assimetria na distribuição de peso para ambas as patas (induzida e não induzida). Esse comportamento se manteve no 14º dia de tratamento apenas para os grupos BoEA 50 mg/kg $(43,50 \pm 3,94; p = 0,01)$ e BoEA 100 mg/kg $(43,73 \pm 2,29; p = 0,007)$ quando comparados com o grupo CTL- $(35,27 \pm 3,11)$, demonstrando um evento causa/efeito positivo para ambos os grupos de tratamento. Já no 21º dia de tratamento, ao compararmos o grupo CTL- $(33,91 \pm 0,86)$, com os demais grupos, apenas os grupos Clean $(42,64 \pm 0,53; p = 0,02)$; Sham $(50,31 \pm 1,79; p < 0,0001)$; BoEA 100 mg/kg $(51,18 \pm 2,57; p < 0,0001)$ e ElAc 50 mg/kg $(47,77 \pm 4,35; p < 0,0001)$ apresentaram valores significamente diferentes, apresentado menor desconforto articular realizado nos testes (**Figura 8**).

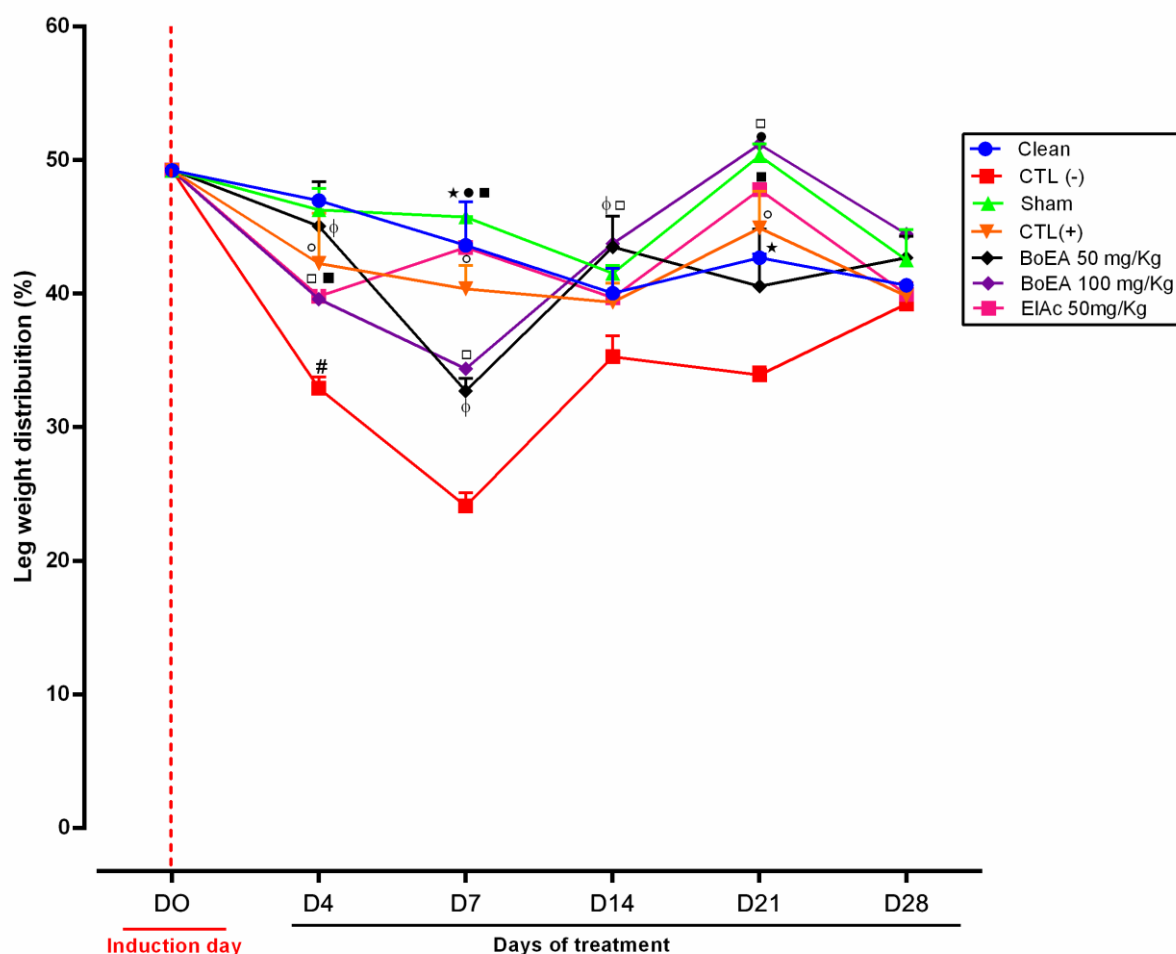


Figura 8 - Efeito da fração BoEA e ElAc na incapacidade articular (distribuição de peso das pernas) de ratos com AO induzida por MIA através do *Weight-Bearing Test*. Os animais receberam sorbitol (CTL-), indometacina (CTL+), animais sem intervenção, controle experimental (Sham), BoEA (50 mg/kg e 100 mg/kg) e ElAc (50 mg/kg) de D4 a D28, e foram avaliados nos dias 7, 14, 21 e 28, após a indução da OA. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão das médias (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de duas vias seguida pelo teste *Post-hoc* de Bonferroni. # $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos veículo *versus* saudável no 4º dia. o $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos CTL+ *versus* Clean no 4º dia. ϕ $p \leq 0,01$, quando comparados os grupos grupo BoEA 50 mg/kg *versus* Clean no 4º dia. $\square$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos grupo BoEA 100 mg/kg *versus* Clean no 4º dia. $\blacksquare$ $p \leq 0,05$, quando comparados os grupos ElAc 50 mg/kg *versus* Clean no 4º dia. Os grupos que realizaram tratamento, CTL+; BoEA 100 mg/kg e ElAc 50 mg/kg quando comparados com o CTL- apresentam diferença estatisticamente significativa no 28º de indução (o $p \leq 0,05$); ($\square$ $p \leq 0,01$) e ($\blacksquare$ $p \leq 0,05$), respectivamente. Abreviações: Clean, Saudável; CTL(-), Controle negativo; Sham, Simulou indução; CTL+, Controle positivo; BoEA, Fração Acetato de etila de *Bixa orellana*; ElAc, Ácido elágico.

4.3 Efeitos do BoEA e ElAc na redução da progressão de OA induzida por MIA

Os exames radiográficos e histológicos dos joelhos dos ratos mostraram diferenças no Kellgren-Lawrence Score e no OARSI indicando o grau de dano articular. A análise radiológica nos grupos Clean e Sham mostrou pontuação grau 0, com faces articulares lisas e regulares com opacidade habitual, presença de estrutura mineralizada no espaço intra-articular do joelho em correspondência ao aspecto cranial e caudal do menisco, patela sobrepondo seu respectivo sulco troclear, sem sinais de alterações inflamatórias e placas fissurais abertas, compatíveis com a idade do animal (**Figura 9: 1A-1B**). Os grupos BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg; ElAc 50 mg/kg e CTL+ apresentaram escore grau 3, com leve estreitamento do espaço intra-articular e

leve esclerose do osso subcondral (**Figura 9: 1C-1D-1E-1F**). O grupo CTL- apresentou alto escore grau 4, com presença de osteófitos marginais exuberantes, estreitamento dos espaços intra-articulares, esclerose óssea subcondral, áreas de erosão da cartilagem, perda parcial do aspecto habitual das estruturas, aumento do volume sinovial e luxação patelar medial (**Figura 9: 1G**). Na análise histológica, os grupos Clean e Sham apresentaram pontuação nota 0, com superfície regular, linha de marcação preservada, condrócitos viáveis com presença de núcleo para os grupos (**Figura 9: 2A-3A-2B-3B**). Os grupos BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg; ElAc 50 mg/kg e CTL+ apresentaram escore grau 1 com superfície irregular, sem erosão, presença da linha de marcação e condrócitos viáveis com presença de núcleos de diferentes tamanhos (**Figura 9: 2C-3C-2D-3D-2E- 3E-2F-3F**). O grupo CTL- apresentou grau 4, apresentando escavação com perda da camada superficial da matriz e zona intermediária, perda da linha de marcação (**Figura 9: 2G-3G**).

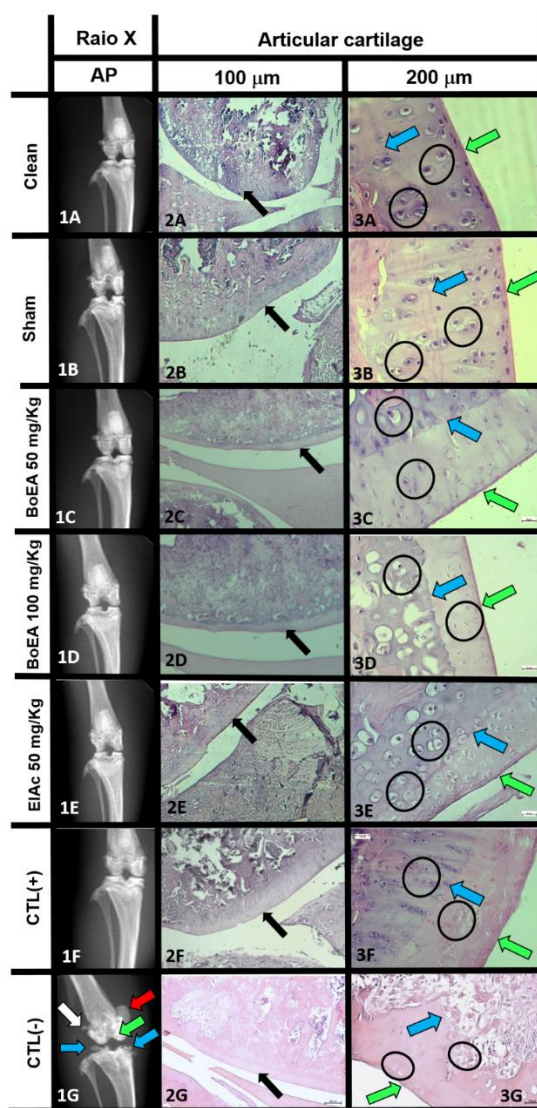


Figura 9. Comparação radiológica e histopatológica da cartilagem articular fêmur tíbio-patelar do joelho direito de ratos induzida por MIA após 28 dias de tratamento com BoEA e ElAc para OA induzido por MIA. (1A-1G) Representação de imagens radiográficas Ântero posterior da articulação do joelho direito. **(2A-2G)** Representação histológica de corte medial da articulação do joelho direito, magnificação de 40X, os cortes foram corados com H&E. **(3A-3G)** Representação histológica de corte medial da articulação do joelho, magnificação de 4X, os cortes foram corados com H&E. A análise radiológica nos grupos Clean e Sham mostraram grau 0, com faces articulares lisas e regulares com opacidade habitual, presença de estrutura mineralizada no espaço intrarticular de fêmur tíbio-patelar em correspondência ao aspecto cranial e caudal do menisco, patela sobrepondo seu respectivo sulco troclear, sem sinais de alterações inflamatórias e placas fisárias abertas, compatíveis com a idade do animal **(Figura 9: 1A-1B)**. Os grupos BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg; ElAc 50 mg/kg e CTL+ apresentaram score grau 3, com discreto estreitamento do espaço intrarticular e discreta esclerose de osso subcondral **(Figura 9: 1C-1D-1E-1F)**. O grupo CTL- apresentou escore alto grau 4, com presença de osteófitos marginais exuberantes, estreitamento dos espaço intrarticulares, esclerose de osso subcondral, áreas de erosão na cartilagem, perda parcial do aspecto habitual das estruturas, aumento de volume sinovial e luxação medial de patela **(Figura 9: 1G)**. Nas análises histológicas os grupos Clean e Sham apresentaram escore Grau 0, com superfície regular, linha de Mark preservada, condrócitos viáveis com presença de núcleo para os grupos **(Figura 9: 2A-3A-2B-3B)**. Os grupos BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg; ElAc 50 mg/kg e CTL+ apresentaram Grau 1 com superfície irregular, sem erosão, presença da linha de Mark e condrócitos viáveis com presença de núcleos e tamanhos diferentes **(Figura 9: 2C-3C-2D-3D-2E-3E-2F-3F)**. O grupo CTL- apresentou escavação com perda da matriz camada superficial e zona média, perda de linha de Mark **(Figura 7:2G-3G)**. **Imagens radiológicas: Seta branca** – presença de osteófitos marginais exuberantes: **Seta verde** – presença de esclerose de osso subcondral: **Seta azul** – áreas de erosão na cartilagem: **Seta vermelha** – presença de luxação medial de patela. **Imagens histológica: Seta preta** - localização da cartilagem. **Seta verde** - zona superficial da cartilagem. **Seta azul** - linha de Mark. **Círculos pretos** - células condrócitos pré e pós a linha de Mark. As alterações degenerativas na Osteoartrite (OA) foram classificadas pelas diretrizes da Osteoarthritis Research Society International (OARSI, 2006). Abreviações: Clean, Saudável; CTL(-), Controle negativo; Sham, Simulou indução; CTL+, Controle positivo; BoEA, Fração Acetato de etila de *Bixa orellana*; ElAc, Ácido elágico; H&E, Hematoxilina-Eosina.

4.4 BoEA e ElAc apresentam atividade anti-inflamatória em ratos com OA induzida por MIA

As citocinas realizam papéis importantes na manutenção da inflamação crônica e dano tecidual durante a progressão da OA. Desta forma, examinamos os efeitos da BoEA e ElAc nos níveis séricos de TNF- α e IL-10 em modelo de OA induzida por MIA.

Para avaliar a produção de citocinas TNF- α e IL-10 foi utilizada a técnica de ELISA. Os níveis de citocina pró-inflamatória TNF- α após 28 dias de tratamento foram maiores no grupo CTL- do que no grupo Clean, porém foram suprimidos nos grupos tratados com BoEA e ElAc em comparação com o grupo CTL- e sendo similares ao grupo tratado com CTL+. Esses resultados sugerem que, tanto BoEA quanto o ElAc podem exibir proteção da cartilagem articular. Em relação aos níveis de citocina anti-inflamatória IL-10 após 28 dias de tratamento, observou-se nos grupos tratados com BoEA, ElAc e Indometacina, apresentaram maiores níveis de IL-10 quando comparados como o CTL- mostrando um controle maior do processo inflamatório para esses grupos e com isso, um controle no dano da cartilagem articular **(Figura 10 (A) e 11(B))**.

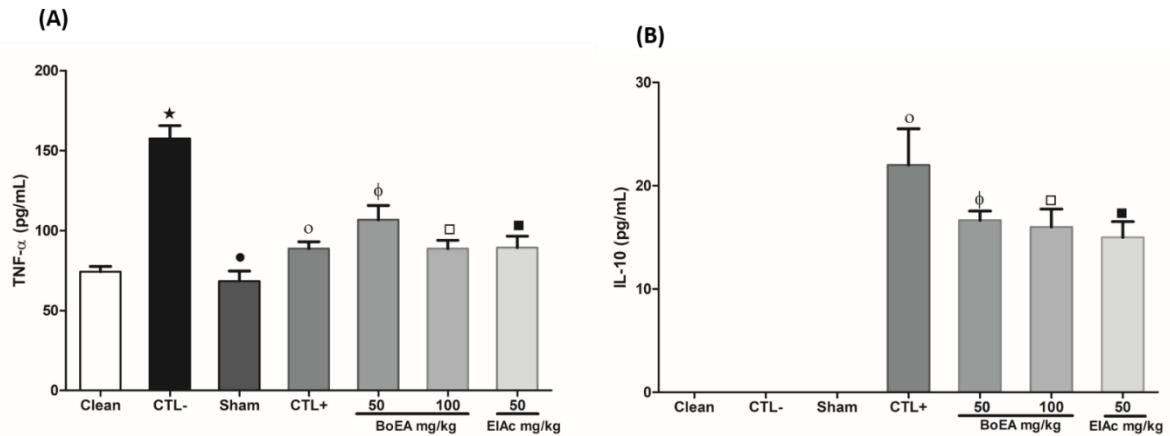


Figura 10(A) e 11(B). Análise de citocinas TNF- α e IL-10 em Osteoartrite induzida por Monoiodoacetato de Sódio (MIA) em *Rattus norvegicus* após tratamento com BoEA e ElAc. Os níveis de citocinas TNF- α e IL-10 no soro foram determinados pelo método ELISA sanduíche. **(A)** Os níveis de TNF- α foram estatisticamente significativos comparando o grupo Clean *versus* CTL- (* $p=0,0001$). O CTL- *versus* Sham apresentou diferença estatisticamente significativa (• $p=0,0001$). O CTL- *versus* CTL+ (○ $p=0,0001$). CTL- *versus* BoEA 50 mg/kg (φ $p=0,001$). CTL- *versus* BoEA 100 mg/kg (□ $p=0,0001$). CTL- *versus* ElAc 50 mg/kg (▪ $p=0,0001$). **(B)** Os níveis de IL-10 foram significativos comparando CTL- *versus* CTL+ (○ $p=0,0001$). CTL- *versus* BoEA 50 mg/kg (φ $p=0,001$). CTL- *versus* BoEA 100 mg/kg (□ $p=0,0001$). CTL- *versus* ElAc 50 mg/kg (▪ $p=0,0001$). Os dados são apresentados como $\pm$ e desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando ANOVA e com *Post-hoc* teste Bonferroni, com significância de $p<0,05$. Abreviações: Clean, Limpo; CTL-, Controle negativo; CTL+, Controle positivo BoEA, Fração Acetato de etila de *Bixa orellana*; ElAc, Ácido elágico

5. DISCUSSÃO

A osteoartrite (OA) é um processo degenerativo crônico da articulação que é causado por modificações nas concentrações de proteoglicanos da cartilagem articular, o que leva à interrupção da glicólise e, assim, à quebra do metabolismo dos condrócitos. Isso resulta na degradação da cartilagem articular e leva a um processo inflamatório e subsequente dor articular (SILVA, ANDERSEN e TUFIK, 2008; TONUSSI E FERREIRA, 1992). O processo inicial de degradação da cartilagem articular ocorre pela ativação de vias catabólicas, incluindo TGF- β quinase 1 (TAK1), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), pois estimulam citocinas pro-inflamatórias, com subsequente destruição nas articulações (VINCENT, 2019). O presente estudo mostrou que doses de longo prazo dos compostos BoEA e ElAc foram capazes de induzir ação anti-inflamatória e antinociceptiva nos ensaios clínicos. A piroptose é uma via de sinalização de morte celular programada mediada por inflamassoma necessária para a caspase-1 e desempenha um papel importante na patogênese da OA, uma vez que inflamação, nociceptividade e apoptose estão associadas ao progresso da patologia, na qual os agentes anti-inflamatórios desempenham o papel de prevenção desses eventos e, conseqüentemente, do desenvolvimento da OA (SATOSHI, *et al.*, 2022; ZU, *et al.*, 2019; KWON *et al.* 2018; SUN, *et al.*, 2021; ANSARI, *et al.*, 2018; GUIDOTTI, *et al.* 2020; ZHENG, XINAN e MINGLI, 2021 e CHEN, KROEMER e KEPP, 2020).

Os compostos de BoEA e ElAc demonstraram inibir a inflamação e promover ação antinociceptiva através do teste Rotarod após o 21º dia de tratamento (em todas as doses dos compostos) e os resultados foram semelhantes aos do medicamento padrão utilizado no tratamento. Os mesmos resultados foram encontrados no teste de descarga de peso e melhorias na incapacidade induzida pela OA foram observadas a partir do 7º dia de tratamento. Quanto ao limiar de sensibilidade dolorosa, através do teste de Von Frey, os compostos de BoEA e ElAc foram eficientes após o 21º dia de tratamento. Assim, diante dos testes clínicos realizados, demonstramos que os compostos de BoEA e ElAc atuaram nos mecanismos que inibem a inflamação e promovem ação antinociceptiva, podendo ser importantes para a progressão da OA. O estudo de ZU *et al.* 2019, mostraram o papel essencial da resposta inflamatória e da nociceptividade mediada por MAPKs/NF- κ B e apoptose celular no desenvolvimento da OA, e demonstraram que o extrato de *Epimedium* inibiu a lesão de condrócitos através da resposta inflamatória mediada por MAPKs/NF- κ B e piroptose celular. Os autores relatam que a piroptose é um tipo de ativação de morte celular programada e importante em eventos

inflamatórios e nociceptivos pois regulam positivamente a expressão de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 através das vias de sinalização de NF- κ B e MAPA. DENG *et al.*, 2018, relatam que a degradação da cartilagem e os eventos nociceptivos iniciam com a ativação de vias catabólicas, como a TAK, que recrutam proteínas quinases inflamatórias e ativam, por meio de mitógenos e sinalização, a via do NF- κ B. Uma vez ativados, os mediadores inflamatórios clássicos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α e receptores Toll-like, estimularão a liberação de collagenase e proteases que degradam proteoglicanos através dos condrócitos, que é o marco do processo inflamatório degenerativo e processo nociceptivo da articulação (YUJIE, *et al.*, 2018; SAFIRI, *et al.*, 2019; LAIRES, *et al.*, 2018 e VICENT, 2019).

O presente estudo também mostrou que a administração de compostos da fração *Bixa orellana* nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, bem como do ácido elágico na concentração de 50 mg/kg, foram determinantes na inibição das vias de sinalização catabólica de inflamação nos joelhos de animais com OA induzida por MIA, evidenciada pela diminuição dos níveis séricos de TNF- α detectada após 28 dias de tratamento. Sugere-se que esses parâmetros imunomoduladores ocorreram em decorrência da administração dos compostos BoEA e ElAc, e interferem positivamente pela inibição de vias de sinalização oxidativa envolvidas no processo inflamatório e degenerativo da cartilagem articular, o que é um marco em nosso estudo.

Outro fator determinante e importante encontrado em nosso estudo foi evidenciado pelo efeito significativo de BoEA e ElAc na regulação positiva da citocina antiinflamatória IL-10, onde observamos aumento na síntese desta citocina. A IL-10 desempenha papel importante na remodelação cartilaginosa, pois, segundo SUN *et al.*, 2021; ANSARI *et al.*, 2018 e GUIDOTTI *et al.*, 2020, inibe os osteoclastogênios e regula a ação das metaloproteinases de matriz (MMPs), sendo ambos os eventos responsáveis pela degradação da matriz cartilaginosa.

Assim, quanto à ação anti-inflamatória e antinociceptiva, observamos que o tratamento com BoEA e ElAc induziu a produção de IL-10, promovendo atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, evitando assim o avanço na degeneração desta cartilagem através a regulação de MMPs e condroclastos. De acordo com KWON *et al.* 2018, a degeneração da cartilagem articular está relacionada a estímulos promovidos pela ativação de vias catabólicas e leva ao processo inflamatório, que, por sua vez, exacerba a nociceptividade e a destruição articular. Os autores concluem relatando que a IL-10 melhora a gravidade nociceptiva e pode até ser usada como adjuvante na terapia da dor. No presente estudo, esta regulação e equilíbrio recíproco

entre a produção de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (TNF- α e IL-10) nas articulações em modelo experimental de AO induzida por MIA interveio na melhora da cartilagem articular, mostrando que estas compostos podem ser usados para regular a resposta inflamatória e a nociceptividade da articulação.

Em relação às imagens radiológicas e histopatológicas do presente estudo, estas mostraram que após a indução da OA por MIA, foram observadas no grupo não tratado a presença de osteófitos marginais exuberantes, esclerose óssea subcondral, áreas de erosão da cartilagem e luxação patelar medial. Assim, embora BoEA e ElAc não tenham sido capazes de prevenir o surgimento de OA, os animais que foram tratados com os compostos fitoquímicos tiveram a progressão do dano articular reduzida em relação ao grupo não tratado, ou seja, apresentaram menores graus de alterações articulares de acordo com a classificação das pontuações (PRITZKER, et. al., 2006).

Mais estudos são necessários para melhor compreender os mecanismos de sinalização envolvidos nestes efeitos, uma vez que estes fatores catabólicos ativam uma série de vias que desempenham um papel importante na patogênese da OA.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, os efeitos da BoEA e ElAc foram capazes de reduzir a dor, inibir atividade das vias catabólicas e consequentemente, a inflamação por meio de regulação e equilíbrio recíproco de citocinas anti-inflamatórias e pro-inflamatórias em ratos com OA induzida por MIA. Os tratamentos com BoEA e ElAc também atenuaram a degeneração da cartilagem evidenciadas pelas imagens radiológicas e histológicas. Portanto, os compostos fitoquímicos BoEA e ElAc exercem efeitos benéficos na AO induzida por MIA e se mostram promissores como agentes terapêuticos ou adjuvantes para o tratamento fitoterápico em OA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI M.Y., KHAN N.M., AHMAD, I., HAQQI, T.M., 2018. Parkin clearance of dysfunctional mitochondria regulates ROS levels and increases survival of human chondrocytes. **Osteoarthr.Cartil.** 26-8, 1087-1097.
- BELEZA, J. A. M. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Primária à Saúde: Contribuição para Profissionais Prescritores.** 2016. Pós-graduação (Especialização) em Gestão da Inovação de Medicamentos da Biodiversidade na modalidade EAD, 2016.
- BLANEY DAVIDSON, E.N., VAN CAAM, A.P.M. & VAN DER KRAAN, P.M. Osteoarthritis year in review 2016: biology. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, n. 2, pp.175–180, 2017
- BONETTI, D. F., SOUZA, L. & RESMINI, M. B. Avaliação do perfil epidemiológico de pacientes atendidos no ambulatório de reumatologia das clínicas integradas de uma universidade. **Revista Saúde**, 46(1), 1-12, 2020.
- BURSTON J.J.; *et al.* anti-nociceptive effects of monoacylglycerol lipase inhibition in a model of osteoarthritis pain. **Br J Pharmacol.**, 173(21):3134–44, 2016.
- CAIMARI, A., CRESCENTI, A., PUIGGROS, F., BOQUE, N., AROLA, L., & DEL BAS, J. M. The intake of a high-fat diet and grape seed procyanidins induces gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells of hamsters: capturing alterations in lipid and cholesterol metabolisms. **Genes & Nutrition**, 10(11), 438p, 2015.
- CARVALHO, F. M. COSTA, M. C. & SILVA, T. C. D. Doenças reumáticas no Brasil: revisão de estudos epidemiológicos. **Efdeportes.Com, Revista Digital**, 184(18), 1-1, 2018.
- CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, jul. 1994.
- CHEN G, KROEMER G, KEPP O. Mitophagy: an emerging role in aging and age-associated diseases. **Front Cell Dev Biol.** 2020,8, 200.
- DENG, Y. *et al.* Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF-κB regulates osteoarthritic cartilage degradation. **NATURE COMMUNICATIONS.** 9:4564, 2018.
- DJIBERSOU D.G., GALANI B.R.T., CHUISSEU P.D.D., NJINTANG N.Y. Anti-oxidant and anti-inflammatory potential of aqueous extracts of leaves, barks and roots of *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) on acetaminophen-induced liver damage in mice. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Vol. 10, No. 4, Jul-Aug 2020.
- FREIRE S. M. M. **Qualidade do Urucum (*Bixa orellana* L.) produzido pelos agricultores familiares do agreste paraibano.** 2017. Trabalho de Conclusão do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, da Universidade Federal da Paraíba, 2017.
- GARCÍA, M. L.; MONZOTE, MONTALVO, A.M.; SCULL, R. Effect of *Bixa orellana* against *Leishmania amazonensis*. **Forsch Komplementmed**, 18(6), p. 351-353, 2011.

GRIPP, E.L.P., CARNEIRO L.U., PEREIRA I.S.P., VEGA M.R.G., MARINHO B.G. Evaluation of analgesic properties of *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith LC. **Brazilian Journal of health Review**, 3: 382-395, 2020.

GUIDOTTI S., D'ADAMO S, CETRULLO S. *et al.* A espermidina resgata a resposta autofágica desregulada ao estresse oxidativo dos condrócitos osteoartríticos. **Bio Radical Livre Med.** 2020, 153-159, 172.

HOLLY T. PHILPOTT AND JASON J. M. Combatting joint pain and inflammation by dual inhibition of monoacylglycerol lipase and cyclooxygenase-2 in a rat model of osteoarthritis. **Philpott and McDougall Arthritis Research & Therapy**, 22:9, 2020.

KALFF K.M *et al.* Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **European Journal of Pharmacology**, Vol 641, Issues 2–3, Pages 108-113, 2010.

KEYES, *et al.* The radiographic classification of medial gonarthrosis. The radiographic classification of medial gonarthrosis. *Correlation with operation methods in 200 knees.* **Acta Orthop Scand.** V63(5): p. 497-501, 1992.

KIM, MI-JI; KANG, BYEONG-HUN; PARK, SOO-HYUN; KIM B.; LEE, GYEONG-YE; SEO, YOUNG-MI; PARK KI-SOO AND YOO, JUN-IL. Association of the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) with Muscle Strength in Community-Dwelling Elderly with Knee Osteoarthritis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 17, 2260, 2020.

KWON J.; SEUNG H.L.; HYUN-S., KYUNG A; JEONG W., KEUN H.C., CHANG-YONG L.; SEOK J.K.; SUNG-HWAN P.; DONG-YUN S. AND MI-LA C. Kartogenin inhibits pain behavior, chondrocyte inflammation, and attenuates osteoarthritis progression in mice through induction of IL-10. **Scientific Reports.** 2018, 8-1, 3832.

KOLASINSKI S. L. *et al.* Diretrizes da American College of Rheumatology/ Arthritis Foundation 2019 para o tratamento da osteoartrite da mão, quadril e joelho, 2019.

LAIRES P. A.; CANHÃO H.; RODRIGUES A. M.; EUSÉBIO M.; GOUVEIA M.; BRANCO J. C. The impact of osteoarthritis on early exit from work: results from a populationbased study. **BMC Public Health**, Dec 11;18(1):472, 2018.

LANGFORD, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, 9 jun. 2010.

MORAIS, S. V. *et al.* Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Vol., 31 (11) – 765, 2016.

MARGARET J. P., JEFFREY S. K AND HEE-JEONG I.M. Assessment of Knee Joint Pain in Experimental Rodent Models of Osteoarthritis. **Methods Mol Biol.**, 1226: 175–181. 2015.

MARTINS, J. B. **Treinamento físico moderado em esteira modula biomarcadores articulares e melhora o desempenho funcional em ratos com osteoartrite de joelho induzida.** 2017. Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na área de concentração em Ciências Fisiológicas, 2017.

MARTINS, M. de A., Carrilho, F. J., Alves, V. A. F., Castilho, E. A. de, & Cerri, G. G. Clínica Médica: doenças endócrinas e metabólicas, doenças ósseas, doenças reumatológicas. **Manole**, 2016.

MASCARIN, L.Z. **Padronização do modelo de incapacitação articular induzida por monoiodoacetato de sódio para estudo pré-clínico da Osteoartrite.** 2015. Dissertação de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

MCGRATH J.C.; DRUMMOND G.B.; MCLACHLAN EM; KILKENNY C.; WAINWRIGHT C.L. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v.160. pag. 1573–1576, 2010.

MEDINA-FLORES, D.; ULLOA-URIZAR, G.; CAMERE-COLAROSI, R.; CABALLEROGARCÍA, S.; MAYTA-TOVALINO, F.; DEL VALLE-MENDOZA, J. Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 6(5), p. 400-403, 2016.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 4, 2016.

MORAES-NETO, R. N.; COUTINHO, G. G.; ATAÍDE, A. C. S.; REZENDE, A. O.; NASCIMENTO C. E. C.; ALBUQUERQUE, R. P; ROCHA, C. Q.; RÊGO, A. S.; CARTÁGENES, M. S. S.; SILVA, A. L. A; SANTOS, I. V. F.; SANTOS, C. B. R.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, R. M.; NETO, V. M.; SOUSA, E. M.; and CARVALHO, R. C.; Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* and Its Component Ellagic Acid Exert Antibacterial and Anti-Inflammatory Properties against *Mycobacterium abscessus* subsp. *Massiliense*. **Antibiotics**. v. pag. 11, 817 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** 2002, Genebra, 67 p.

PACHECO S.D.G., GASPARIN A.T., JESUS C. H. A., SOTOMAIOR B.B., VENTURA A.C.S.S.B., REDIVO D.D.B., CABRINI D.A., DIAS J. F. G., MIGUEL M.D., MIGUEL O.G., CUNHA J.M. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Bixin*, a Carotenoid Extracted from the Seeds of *Bixa orellana*. **Planta Medica**, 85: 1216–1224, 2019.

PHILPOTT H. T. e MCDOUGALL J. J. Combatting joint pain and inflammation by dual inhibition of monoacylglycerol lipase and cyclooxygenase-2 in a rat model of osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, 22:9, 2020.

Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica– Brasília: **Ministério da Saúde**, 2016.

PRITZKER, K. P. H.; GAY, S.; JIMENEZ, S. A.; OSTERGAARD, K.; PELLETIER, J. P.; REVELL, P. A.; SALTER, D.; PATHXXX, F. R. C. AND VAN DEN BERG, W. B. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and Cartilage**, Vol. 14, N. 1, 2006.

RODRIGUES, T.A., SAMPAIO JUNIOR A.J.B., NUNES, I.D.P. CARTÁGENES M.S.S. AND GARCIA J.B.S. Effect of strontium ranelate on pain behavior in an experimental model of osteoarthritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 50(9), 2017.

ROEHRSUMA, M.; CONTEB, L.; SILVAB, D. T.; DUARTEUMA, T.; MAURERB, L. H.; CARVALHOC, J. A. M.; MORESCOC, R. N.; SOMACALUMA, S.; EMANUELLIU, T. Anatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects. **Food Research International**. 100; 771–779, 2017.

SAFIRI S.; KOLAH A. A.; HOY D.; SMITH E.; BETTAMPADI D.; MANSOURNIA M. A. *et al.* Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study. **Ann Rheum Dis. Ann Rheum Dis**, 78(11):1463–71, 2019.

SALMON J.H.; RAT A. C.; SELAM J.; MICHEL M.; ESCHARD J. P.; GUILLEMIN F., *et al.* Economic impact of lower-limb osteoarthritis worldwide: a systematic review of cost-of-illness studies. **Osteoarthr Cartil.**, Sep 1;24(9), 2016.

SERVIN, E. T. N.; CZECHKO, N. G.; MALAFAIA, O.; TORRES, O. J. M.; LIMA, F. C. V. M.; SILVA, G. E. B.; CARTÁGENES, M. S. S.; GARCIA, J. B. S. Effect of Arrabidaea Chica Verlot Hydroalcoholic Extract on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis of Rat Knees. **Brazilian Journal of health Review**, v. 3, n. 3, p.7038-7057 may./jun, 2020.

SILVA, A.; ANDERSEN, M.L; TUFIK, S. Padrão de sono em um modelo experimental de osteoartrite. *Dor*. 2008,140, 446-455.

SILVA, T. H. M. **Estudo do efeito hipocolesterolêmico da torta de bixina (*Bixa orellana*) e suas alterações metabólicas em ratos fisher**. 2019. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.

SOMACAL, S., FIGUEIREDO, C.G., QUATRIN, A. *et al.* **Mol Cell Biochem.**, 403: 243, 2015.

SILVA F. A., BIZERRA A. M. C., FERNANDES P. R. D. Testes Fitoquímicos em Extratos Orgânicos de *Bixa orellana* L (Urucum). **HOLOS**, Ano 34, Vol. 02, 2018.

SUN, K., XINGZHI J., JIACHAO G., XUDONG Y. AND FENGJING G. Mitophagy in degenerative joint diseases. **Taylor & Francis**. 2021, 17-9, 2082-2092.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421–427, 1992.

VIANA J. L., ZAGMIGNAN A., LOBATO L. F.L., ABREU A. G., SILVA L. C. N., SÁ J. C., MONTEIRO C. A., LAGO J. H. G., GONÇALVES L. M., CARVALHO R. C., NETO L. G.L. and SOUSA E. M. Hydroalcoholic Extract and Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* Leaves

Decrease the Inflammatory Response to *Mycobacterium abscessus* Subsp. *Massiliense*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018.

VINCENT, T. L. Mechanoflamation in osteoarthritis pathogenesis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. 49, 3, Supplement, 2019.

WIDDIFIELD, J., TU, K., CARTER THORNE, J., BOMBARDIER, C., MICHAEL PATERSON, J., LIISA JAAKKIMAINEN, R., WING, L., BUTT, D. A., IVERS, N., HOFSTETTER, C., LYDDIATT, A., AHLUWALIA, V., & BERNATSKY, S. Patterns of Care Among Patients Referred to Rheumatologists in Ontario, Canada. **Arthritis care & research**, 69 (1), 104–114, 2017.

WILLIAMS, A. C. DE C. Facial expression of pain: an evolutionary account. **The Behavioral and brain sciences**, v. 25, n. 4, p. 439- 55; discussion 455-88, ago. 2002.

SATOSHI Y., YUYA K. , SHIGEO H., SUMIHISA O., JUNICHI N., SHUICHI M., TAKANE S., TSUTOMU A., YUKI S., YOHEI K. AND SEIJI O. Intra-articular injection of monoiodoacetate induces diverse hip osteoarthritis in rats, depending on its dose. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2022, 23, 494.

SOTOCINA, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744-8069-7–55, 5 ago. 2011.

YONG Y.K., SULAIMAN N., HAKIM M.N., LIAN, G.E., ZAKARIA Z.A., OTHMAN F. Suppressions of serotonin-induced increased vascular permeability and leukocyte infiltration by *Bixa orellana* leaf extract. **Biomedine Research International**. 2013.

YUJIE D., JINQIU L., WENLING L., WU D., XU Z. WENXUE T., KIWAIKEVIN H. LIN Q., HAI S. AND KINGLUN K., M. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF-κB, regulates osteoarthritic cartilage degradation. **Nat Communi**. 2018, 9:4564

ZHENG T., XINAN Z. AND MINGLI S. Phytochemicals Mediate Autophagy Against Osteoarthritis by Maintaining Cartilage Homeostasis. **Frontiers in Pharmacology**. 2021.

ZU, Y; YUE M.; QIANG L., SHU-TING Z. AND HONG-JUAN Y. Icariin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. 2019.

ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Animais



CIAEP: 02.0341.2019 UNIVERSIDADE

FEDERAL DO MARANHÃO

CERTIFICADO (02/2022)

Certificamos que a proposta intitulada: “**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI- INFLAMATÓRIA DA *Bixa orellana* EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS**”, Processo n. 23115.004774/2021-69, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 24 de fevereiro de 2021.

We certify that the proposal: “**ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Bixa orellana* IN EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTHRITIS IN RATS**”, Process n. 23115.004774/2021-69, under the responsibility of **Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, 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 Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of February 24, 2021.

PROPOSTA

Finalidade:	Pesquisa	Área:	Ciências da Saúde
Vigência:	10/03/2021 a 31/03/2023		

ANIMAIS

Origem:	Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão.
---------	---

Espécie:	Ratos	Sexo:	Machos	Idade: 60 dias
				Peso: 250 a 300g
Linhagem/Raça:	Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)			

AMOSTRA

75

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências

Bruno Araújo Serra Pinto

Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.

São Luís, 25 de janeiro de 202

Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto

Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais



Documento assinado digitalmente

Bruno Araujo Serra Pinto

Data: 25/01/2022 10:37:48-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

ANEXO 2- Artigo Aceito a revista Biomedice & Pharmacotherapy (Fator de Impacto 7.5)

Title: *Bixa orellana* ethyl acetate fraction and its isolated compound ellagic acid attenuate the progression of MIA-induced osteoarthritis in rat knees



Luis Ângelo Macêdo Santiago^{a*}, Ana Caroline Santos Ataíde^b, Danilo de Araújo Morais^c, Aldilene da Silva Lima^e, Nathália dos Santos Martins^f, Adriana Vivian Costa Araújo Dourado^g, Rachel Melo Ribeiro^b, Lídio Gonçalves Lima-Neto^{a,c}, Joicy Cortez de Sá Sousa^c, Cláudia Quintino da Rocha^e, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes^d, Rafael Cardoso Carvalho^b and Eduardo Martins de Sousa^{a,c}

^a Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the Bionorte Network, - BIONORTE - Federal University of Maranhão, Maranhão-UFMA, São Luis 65080-805, Brazil;

^b Graduate Program in Health Sciences - Federal University of Maranhão-UFMA, São Luis 65080-805, Brazil;

^c Graduate Program in Microbial Biology, CEUMA University—UniCEUMA, São Luís 65075-120, Brazil;

^d Experimental Laboratory for the Study of Pain-Federal University of Maranhão-UFMA, São Luis 65080-805, Brazil;

^e Graduate Program in Chemistry, Federal University of Maranhão-UFMA, São Luis 65080-805, Brazil;

^f Chapadinha Science Center, Federal University of Maranhão-UFMA, Chapadinha 65500-00, Brazil;

^g Dianosi Veterinary Image, São Luis 65071-640, Brazil.

* These authors contributed equally to this work.

***Correspondence Author: Luis Ângelo Macêdo Santiago**, Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the Bionorte Network, - BIONORTE, Maranhão - Federal University of Maranhão - UFMA, São Luis, Maranhão 65080-805, Brazil; Tel/Fax: 55 (98) 3272-8731; E-mail: luis.angelo@ufma.br

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a pathology that is characterized by progressive erosion of articular cartilage. In this context, medicinal plants have become relevant tools regarding their potential role in the prevention and treatment of OA, being safe and effective. The aim of this work was investigate the therapeutic efficacy of the ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* leaves (BoEA) and ellagic acid (ElAc) for the therapeutic treatment of OA induced by monosodium iodoacetate (MIA) in rats. The plant material was extracted via maceration with 70% hydroalcoholic solvent (BoHE). The ethyl acetate (BoEA) fraction was by solvents in increasing order of polarity. The ElAc was identified and isolated in BoEA using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and analytical curve. The OA was induced using MIA in the right knee at the knee joint. Doses of BoEA and ElAc were administered daily (every 24 h, orally) at concentrations of 50, 100 and 50 mg/kg, respectively, for 28 days after induced OA. We evaluated the animals through clinical and radiological examinations every 7 days and, on the 29th day, the animals were euthanized, the joints being removed for histopathological analysis and the serum for cytokine analysis. BoEA and ElAc compounds reduced inflammation and nociception in OA and were as effective as indomethacin in clinical parameters of joint discomfort and allodynia in rats, in addition to showing improvements in radiological and histopathological images, acting on the progress of cartilage deterioration, proving properties related to anti-inflammatory and analgesic processes, being important allies for new therapeutic interventions for the treatment of OA.

Keywords: Cartilage damage, joint degeneration, pain, antinociception, analgesia.

Abbreviations: *Bixa orellana* ethyl acetate fraction, BoEA; Ellagic acid, ElAc; High-performance liquid chromatography photodiode array detection method, HPLC; Hydroaethanolic solvent, BoHE; Interleukin-1, IL1; Interleukin 10, IL-10; Mitogen-activated protein kinases, MAPKs; Nuclear factor kappa-B, NF- κ B; Osteoarthritis, OA; Osteoarthritis Research Society International, OARSI; Proten kinase 1, TAK1; Regulates the action of matrix metalloproteinases, MMPs; Sodium monoiodoacetate, MIA; Toll-like receptors, TLRs; Tumor necrosis factor alpha, TNF- α .

1 INTRODUCTION

It is estimated that osteoarthritis (OA) is one of the main causes of motor disability worldwide, and is responsible for 9.6 million lives with mobility disability; thus, generating a great socioeconomic impact and affecting the quality of life of many, in addition to generating high costs for health services [1]. It begins as an inflammatory process that leads to the destruction of cartilage. This is stimulated by a group of glycoproteins collectively called cytokines, which are responsible for the coordination, amplification and regulation of the magnitude and duration of inflammatory events and, consequently, of their effects [1-4]. Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and Toll-like receptors (TLRs), stimulated by NF- κ B and MAPK signaling pathways, promote

cartilage destruction and subsequent inflammatory processes and chronic pain due to hypersensitivity of peripheral and central nociceptive pathways [5-8].

In this context, the search for therapeutic alternatives is relevant. Plants have a variety of phytochemical compounds that have therapeutic properties against various diseases, and are a broad source for the search for new drugs and/or alternative treatments [9-14]. Among these different active phytochemical compounds are phenolic acids, flavonoids and alkaloids that have a variety of known antioxidant, antifibrotic and anti-inflammatory activities [14,15].

Bixa orellana is a plant species found in tropical countries. It belongs to the *Bixaceae* family, and is popularly known as annatto. It is widely used in folk medicine to combat comorbidities, including coronary heart disease, respiratory infections and kidney problems [14-16]. Studies report that this species presents numerous phytochemical compounds, such as alkaloids and flavanoids with various biological applications, which indicates its great potential as new active compounds for pharmaceuticals [14-17].

Due to the need to find new active pharmacological compounds, the present study investigated the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of the BoEA fraction and its isolated compound ElAc in rats with OA induced by MIA, via clinical, histopathological, radiological and evaluation of cytokines.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection and processing of plant species

The *Bixa orellana* leaves were collected at coordinates 2°58'08 "S, 44°21'98" W - Locator: 689QCQ9J+M2 (in June and July 2021) and identified at the Ático Seabra Herbarium of the Federal University of Maranhão (São Luís, Brazil, specimen voucher 1147, SISGen nº **AA8EBE7**). The leaves were dried at 40 °C in an oven with air circulation and then ground in an electric mill to obtain the powder. Then, approximately 688 grams of the plant material was subjected to the extraction process by maceration, using the solvent ethanol PA (99%) as the extractor and water (70:30 v/v), and constant stirring for a period of 24 h. After extraction, the material was rotoevaporated at 40 °C, then lyophilized to obtained the crude hydroethanolic extract (BoHE). Of the BoHE, 253 grams were fractionated via liquid-liquid partition using an ethyl acetate and water/methanol solution (7:3). The ethyl acetate phase obtained was rotoevaporated at 40 °C to obtain the ethyl acetate fraction (BoEA).

2.2 Analysis for the quantification of ellagic acid in the ethyl acetate fraction

In order to optimize the chromatographic conditions for the quantification of the ellagic acid (ElAc) present in the fraction, the BoEA was subjected to analysis using the high-performance liquid chromatography photodiode array detection method (HPLC-PDA), $\lambda = 254$ nm, (Shimadzu, Kyoto, Japan). The ellagic acid in the BoEA fraction was quantified by comparison to the ellagic acid standard (Sigma Aldrich). Quantification injections were performed in triplicates.

Sample preparation consisted of a clean-up step using solid phase extraction, which employed a Phenomenex Strata C18 cartridge (500 mg/6 mL) that was previously activated with 5 mL of methanol and equilibrated with 5 mL of methanol:water (95:5, v/v). A solution of 2 mL of ethyl acetate fraction in methanol:water (95:5, v/v), at a concentration of 5 mg.mL⁻¹, was eluted with the same mobile phase used for cartridge equilibrium and collected in a 5 mL volumetric flask, having its volume completed at the end of elution. At the end, the solution was filtered via a Millex filter with a pore size of 0.22 μ m. Aliquots of 10 μ L of this solution were injected into the HPLC. Several conditions were evaluated so as to obtain the best separation of the major peaks (Figure 1). The best one consisted of separation with a Phenomenex Luna C18 column (25 cm x 4.6 mm x 5 μ m), and a mobile phase gradient composed of water (A): methanol (B) containing 0.01% FA (formic acid) and monitoring at 254 nm. The gradient was scaled under the following conditions: 5% B 1-2 min, 5-25% B 2-10 min, 25-40% B 10-20 min, 40-50% B 20-30 min, 50-60% B 30-40 min, 60-70% B 40-50 min and 70-100% B 50-60 min. Under the conditions employed, baseline separation was obtained for the main components of the sample.

2.3 Animals and ethical aspects

Twenty-five female Wistar rats (*Rattus Norvegicus*), 8 weeks old, weighing 250-300 g were obtained from the UFMA Central Vivarium. Throughout the experimental period, the rats were fed with standard feed and water *ad libitum* and were kept under controlled conditions of temperature (23 ± 1 °C), humidity (40-60%) and 12 hours light-dark cycle. The experiments were conducted according to the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) for the use of animals in research

2.4 Osteoarthritis induction

The animals were pre-anesthetized with a combination of tramadol hydrochloride (1 mg/kg) and acepromazine hydrochloride (4 mg/kg) (subcutaneously). After 20 minutes, intraperitoneally, the association of ketamine hydrochloride (60 mg/kg) and midazolam

(5 mg/kg) was administered, and after verifying the anesthetic plane, the OA was induced via a single intra-articular administration of MIA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the right knee (2 mg in 25 μ L). With the knee flexed at an angle of 90°, the MIA solution was injected into the knee joint, through the ligament lateral to the patella [18].

2.5 Experimental design

On Day 0 (Zero), OA was induced by MIA via a single intra-articular injection of 2 mg/kg (n=25). Then, the animals were randomly divided into seven experimental groups and, after 4 days of induction, the groups were treated orally (1x/day) as follows: Clean group: without OA and without treatment (n=3); CTL - group with OA and treated with sorbitol 10% (n=3); Sham group: without OA and without treatment (n=3); CTL + group: with OA and treated with indomethacin at a dose of 2.5 mg/kg/day (n=4); BoEA groups: with OA and treated at doses of 50 mg/kg/day (n=4) and 100 mg/kg/day (n=4) and ElAc group: with OA and treated at dose of 50 mg/kg/day (n=4).

On Days 4, 7, 14, 21 and 28 after induction, clinical analyses related to parameters of motor activity, mechanical allodynia, joint disability were performed. On Day 29, the animals were euthanized with an intraperitoneal anesthetic overdose. Next, samples of the knee joints of the hind limbs were collected for histopathological study. In addition, blood serum samples were collected for cytokine quantification.

2.6 Determination of serological concentrations of IL-10 and TNF- α by ELISA

Serum samples from the groups were quantitatively analyzed by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for TNF- α and IL-10 cytokines, following the manufacturer's technical instructions for the cytokine dosage kits and equipment. The ELISA kit used in this study was purchased from R&D Systems® (Minneapolis, MN, EUA).

2.7 Clinical Trials

2.7.1 Evaluation of motor activity - forced ambulation (Rotarod Test)

The animals were placed on a Rotarod (IITC Life Science, CA, USA), a rotor-like device, rotating at a speed of 4 to 40 rpm for a period of 300 seconds. Two basic training tests were performed, which were followed by two recorded evaluations. After induction,

three evaluations were performed and the mean latency was recorded. The animals had a rest period of 15 minutes between assessments. The data are expressed as walk values and were encoded by a single viewer. The evaluation was performed through observational analysis relating to a numerical scale ranging from 1 to 5, where 1 = normal limb use; 2 = mild limping; 3 = severe limping; 4 = intermittent disuse of affected limb use; 5 = complete disuse of limb [19].

2.7.2 Mechanical allodynia (Von Frey's test)

The evaluation was performed with a digital analgesimeter (Insight, São Paulo, Brazil), and was composed of a pressure transducer connected to a digital power meter with measurements expressed in grams (g). The accuracy of the device was 0.1 g and the device was calibrated to record a maximum force of 150 g. Filaments of 4 g, 10 g and 300 g were used, maintaining an accuracy of 0.1 g with force up to 300 g. The pressure transducer was connected to the animal's leg by means of a disposable polypropylene ferrule of 0.5 mm (diameter) adapted for this purpose [20]. The test was performed ten times consecutively at two-minute intervals until three similar readings were taken.

2.7.3 Evaluation of articular incapacitation (weight-bearing test)

Weight distribution across the right and left knee was assessed using an incapacity Meter[®] (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) to measure the distribution of WB in the two pelvic limbs. The force exerted by each hind limb was measured and analyzed in grams, but reported as a percentage of total body weight (%BW) to normalize the data. Rats were allowed to become accustomed to the test apparatus and, when stationary, readings were taken over a period of 3 seconds. Triplicates were taken simultaneously for each limb at each time point [21].

To assess the use of the affected limb, the animals were placed in an angled glass chamber with each hind leg resting on different platforms. The weight exerted on each hind leg was measured in grams for five seconds and the final measurement was an average of three. Changes in weight distribution were calculated using the following formula:

$$\text{Weight distribution (\%)} = \text{APW} / (\text{APW} + \text{CPW}) \times 100 \quad (1)$$

where APW represents the weight of the affected paw and CPW represents the weight of the contralateral paw.

2.8 Radiological analysis

Radiological images were obtained in two planes, anteroposterior and latero-lateral, using a portable digital X-ray machine with an image capture sensor (Diox®). The images were analyzed by a veterinarian, who is a specialist in animal images, and a score of each knee was obtained according to the Kellgren-Lawrence [22] method for arthrosis severity (0 - normal, 1 - doubtful, 2 - minimum, 3 - moderate and 4 - severe), and the mean was calculated for comparison.

2.9 Histopathological analysis

On the 29th day, after euthanasia of the animals, the knee joint was removed, fixed in 10% formaldehyde + buffered PBS. Then, the material was prepared for the descaling process in 20% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 20 days. Subsequently, they were submitted to the inclusion protocol in paraffin blocks, cut into 5 µm sections and then the organic cartilage matrices were stained using the hematoxylin-eosin (H&E) method. The analysis was performed blindly by a histopathologist. The histopathological evaluation system for the cartilages followed protocols that were adapted according to the guidelines of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) [23]. The parameters are related to the stages of OA based on the extent of the articular cartilage surface, area or volume involved in local OA. The degree of OA is based on the extent of pathology in the depth of the cartilage and points are assigned ranging from 0 (intact surface) to 6 (loss of total cartilage thickness and bone deformation).

2.10 Statistical analyses

All experiments were performed independently at least three times, and data were presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 software (San Diego, CA, USA). Group comparisons were evaluated with Student's t-test or one-way ANOVA for comparison of several columns. A p-value < 0.05 (two-tailed) was considered statistically significant.

3 RESULTS

3.1 Quantification of ellagic acid in the ethyl acetate fraction

By using high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), it was possible to identify the presence of the ellagic acid compound, which had a peak with an average retention time (Rt) of 37.82 minutes. The identification was performed via the comparison with the

ellagic acid standard and its spectrum in the ultraviolet region.

The analytical curve shows good linearity in the concentration range studied and correlation coefficients (R^2) with a value of 0.98, which indicates that there is a good correlation between the peak areas and the concentrations studied. The ElAc concentration was determined directly in the ethyl acetate fraction obtained from *Bixa orellana* extract. In this way, we tried to reach more representative results with respect to the actual composition of the secondary metabolite and thus avoid possible systematic errors. Through the HPLC-DAD analyses and the construction of the quantification curve, it was possible to measure the free ElAc present in the BoEA. A content of 59.35 mg of ellagic acid contained in 1 g of the fraction was found, which is equivalent to a percentage of 5.93%. **Figure 1**

3.2 Clinical evaluations

3.2.1 Evaluation of motor activity (Rotarod test)

Evaluating the ambulation of the animals, on the 4th day, we observed in a decrease in the score of forced walking, which was as expected. **Figure 2** shows the evaluation of motor activity through forced ambulation, which was used to analyze the treatment in relation to the cause/effect of the groups and at various times of the experiment. All animals showed similar gait before induction, without significant values (5 ± 0 ; $p > 0.9999$). On the 4th day of treatment after induction, clinically different gait was observed with significant difference among the treatment groups CTL- (1 ± 0 ; $p = 0.0001$); CTL+ (4.6 ± 0.48 ; $p = 0.002$); BoEA 50 mg/kg (4.2 ± 0.40 ; $p = 0.002$); BoEA 100 mg/kg (4.6 ± 0.48 ; $p = 0.002$) and ElAc 50 mg/kg (4.6 ± 0.48 ; $p = 0.002$) when compared with the Clean (5 ± 0) and Sham (5 ± 0) groups. This behavior was maintained until the 14th day of treatment.

After the 21st day of treatment, the groups Clean (5 ± 0 ; $p = 0.0001$), Sham (5 ± 0 ; $p = 0.0001$), CTL+ (4 ± 0 ; $p = 0.0001$), BoEA 50 mg/kg (4 ± 0.89 ; $p = 0.0001$), BoEA 100 mg/kg (4.2 ± 0.4 ; $p = 0.0001$) and ElAc 50 mg/kg (4.2 ± 0.4 ; $p = 0.0001$) presented clinically different gait when compared with the CTL- group (2 ± 0). On the 28th day of treatment, clinically symmetrical and similar gait was observed for CTL+ animals (4.4 ± 0.48 ; $p = 0.0864$) and BoEA 100 mg/kg (4.6 ± 0.48 ; $p = 0.5153$), when compared to those in the Sham group (5 ± 0)

3.2.2 Evaluation of mechanical allodynia (Von Frey's test)

All animals started with similar responses in the mechanical allodynia test (paw withdrawal threshold), with no statistical difference for all groups (300 ± 0 ; $p > 0.9999$). On the

4th day of induction and treatment, there was a significant reduction in the paw withdrawal threshold of the groups, CTL- (2 ± 0 ; $p < 0.0001$); CTL+ (2 ± 0 ; $p < 0.0001$); BoEA 50 mg/kg (4 ± 0 ; $p < 0.0001$); BoEA 100 mg/kg (7 ± 2.44 ; $p < 0.0001$) and ElAc 50 mg/kg (124.8 ± 143.6 ; $p = 0.01$), when compared with the Clean (300.0 ± 0.0) and Sham (300.0 ± 0.0), demonstrating a decrease in Paw withdrawal threshold. This decrease in nociceptive threshold was maintained throughout the experiment until the 21st day of treatment. Regarding cause/effect, it was observed that, on the 28th day of treatment, the groups BoEA 50 mg/kg (300 ± 0); BoEA 100 mg/kg (300 ± 0) and ElAc 50 mg/kg (300 ± 0) had similar responses to the Clean and Sham group (300.0 ± 0.0), without presenting statistical differences between them, and were different when compared to the CTL- group (10 ± 0) with significant statistical differences (**Figure 3**).

3.2.3 Disability test/weight distribution on the hind legs (weight-bearing test)

All groups supported themselves symmetrically on both hind limbs at the beginning of the experiment with the initial score of 49.23 ± 0.07 , thus showing absence of joint discomfort. On the 4th day after induction, there was a statistical difference in the Clean group (46.97 ± 0.14 ; $p < 0.0001$) when compared with the CTL- (32.90 ± 1.6 ; $p < 0.0001$); CTL+ (42.26 ± 3.1 ; $p < 0.0001$); BoEA 50 mg/kg (39.80 ± 1.7 ; $p = 0.001$); BoEA 100 mg/kg (39.58 ± 4.03 ; $p = 0.03$) and ElAc 50 mg/kg (45.04 ± 6.6 ; $p = 0.03$) groups, which demonstrated signs of joint discomfort due to inability to distribute weight symmetrically. Regarding the cause/effect of the treatment, on the 7th day of treatment, a significant difference was observed in the groups Clean (43.62 ± 6.49 ; $p < 0.0001$); Sham (45.73 ± 0.07 ; $p < 0.0001$); CTL+ (40.36 ± 3.49 ; $p < 0.0001$); BoEA 50 mg/kg (32.70 ± 1.32 ; $p = 0.0274$); BoEA 100 mg/kg (34.38 ± 3.15 ; $p = 0.0004$) and ElAc 50 mg/kg (43.46 ± 4.24 ; $p < 0.0001$) when compared with the CTL- group (24.09 ± 2.00), thus demonstrating absence of joint discomfort due to better symmetry in weight distribution for both legs (induced and uninduced). This behavior was maintained for up to 21th day of treatment. Regarding cause/effect, it was observed that, on the 28th day of treatment, the groups CLT+ (40.10 ± 1.01); BoEA 50 mg/kg (40.02 ± 2.86); BoEA 100 mg/kg (42.60 ± 1.87) and ElAc 50 mg/kg (39.94 ± 2.86) had similar responses to the Clean (40.62 ± 0.15) and Sham group (41.52 ± 4.57), without presenting statistical differences between them, thus demonstrating absence of joint discomfort (**Figure 4**).

3.3 Effects of BoEA and ElAc on the reduction of the progression of MIA-induced OA.

Radiographic and histologic examinations of the rats' knees showed differences in the Kellgren-Lawrence Score and OARSI indicating the degree of joint damage. Radiological

analysis in the Clean and Sham groups showed a grade 0 score, with smooth and regular articular faces with usual opacity, presence of mineralized structure in the intra-articular space of the knee in correspondence to the cranial and caudal aspect of the meniscus, patella overlapping its respective trochlear groove, without signs of inflammatory alterations and open fissure plates, compatible with the age of the animal (**Figure 5: 1A-1B**). The BoEA groups 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg; ElAc 50 mg/kg and CTL+ presented a grade 3 score, with mild narrowing of the intra-articular space and mild sclerosis of the subchondral bone (**Figure 5: 1C-1D-1E-1F**). The CTL- group presented a high grade 4 score, with the presence of exuberant marginal osteophytes, narrowing of the intra-articular spaces, subchondral bone sclerosis, areas of cartilage erosion, partial loss of the usual appearance of the structures, increased synovial volume and medial patellar dislocation (**Figure 5: 1G**). In the histological analysis, the Clean and Sham groups presented a grade 0 score, with a regular surface, preserved mark line, viable chondrocytes with the presence of nucleus for the groups (**Figure 5: 2A-3A-2B-3B**). The BoEA groups 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg; ElAc 50 mg/kg and CTL+ presented a grade 1 score with an irregular surface, without erosion, presence of the mark line and viable chondrocytes with the presence of nuclei of different sizes (**Figure 5: 2C-3C-2D-3D-2E-3E-2F-3F**). The CTL- group presented excavation with loss of matrix surface layer and middle zone, loss of mark line (**Figure 5: 2G-3G**). **Figure 5**

3.4 BoEA and ElAc exhibit anti-inflammatory activity in MIA-induced OA

Cytokines perform important roles in maintaining chronic inflammation and tissue damage during the progression of OA. Thus, we examined the effects of BoEA and ElAc on serum TNF- α and IL-10 (interleukin 10) levels in the MIA-induced OA model.

The ELISA technique was used to evaluate the production of TNF- α and IL-10 cytokines. The levels of proinflammatory cytokine TNF- α after 28 days of treatment were higher in the CTL- group than in the Clean group, but were suppressed in the BoEA and ElAc treated groups compared to the CTL- group and were similar to the indomethacin-treated group. These results suggest that both BoEA and ElAc may exhibit protection of articular cartilage. Regarding the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 after 28 days of treatment, it was observed that the groups treated with BoEA, ElAc and indomethacin had higher levels of IL-10 when compared to the CTL- group showing a greater control of the inflammatory process for these groups and, with this, control in the damage of articular cartilage (**Figure 6 A-B**).

4. DISCUSSION

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative process of the joint that is caused by modifications in the concentrations of proteoglycans of the articular cartilage, which leads to an interruption of glycolysis and, thus, a breakdown in the metabolism of chondrocytes. This results in the degradation of the articular cartilage and leads to an inflammatory process and subsequent joint pain [18,19]. The initial process of degradation of articular cartilage occurs by the activation of catabolic pathways, including TGF- β kinase 1 (TAK1), nuclear factor kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinases (MAPK), as they stimulate pro-inflammatory cytokines, with subsequent destruction in the joints [8]. The present study showed that long-term doses of BoEA and ElAc compounds were able to induce an anti-inflammatory and anti-nociceptive action in the clinical trials. Pyroptosis is an inflammasome-mediated programmed cell death signal pathway necessary for caspase-1 and plays an important role in the pathogenesis of OA, since inflammation, nociceptivity and apoptosis are associated with the progress of the pathology, in which anti-inflammatory agents play the role of preventing these events and, consequently, the development of OA [24-31].

The compounds of BoEA and ElAc were shown to inhibit inflammation and nociceptivity via the Rotarod test after the 21st day of treatment (at all doses of the compounds) and the results were similar to the standard drug used in the treatment. The same results were found in the weight-bearing test and improvements in OA-induced disability were observed from the 7th day of treatment. Regarding the threshold of pain sensitivity, via the Von Frey test, the compounds of BoEA and ElAc were efficient after the 21st day of treatment. Thus, in view of the clinical tests carried out, we showed that the compounds of BoEA and ElAc acted on the mechanisms that inhibit inflammation and nociceptivity, and they may be important for the progression of OA. The study by Zu *et al.* [25] showed the essential role of inflammatory response and nociceptivity mediated by MAPKs/NF- κ B and cellular apoptosis in the development of OA, and demonstrated that *Epimedium* extract inhibited chondrocyte injury through inflammatory response mediated by MAPKs/NF- κ B and cellular pyroptosis. The authors report that pyroptosis is a type of activation of programmed cell death and important in inflammatory and nociceptive events, as they positively regulate the expression of inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 via the signaling pathways of NF- κ B and MAPK. Deng *et al.* [5] report that cartilage degradation and nociceptivity events begin with the activation of catabolic pathways, such as TAK, that recruit inflammatory protein kinases and activate, by mitogens and signaling via the NF- κ B pathway. Once activated, classical inflammatory mediators of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, TNF- α and Toll-like receptors, will stimulate the release of collagenase and proteases degrading proteoglycans via

the chondrocyte, which is the landmark of the degenerative, inflammatory and nociceptive process of the joint [5-8]. The present study also showed that the administration of compounds from the *Bixa orellana* fraction at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg, as well as ellagic acid at a concentration of 50 mg/kg, were determinants in inhibiting catabolic signaling pathways of inflammation in the knees of animals with OA induced by MIA, as evidenced by the decrease in serum TNF- α levels detected after 28 days of treatment. It is suggested that these immunomodulatory parameters occurred as a result of the administration of BoEA and ElAc compounds, and positively interfere by inhibiting oxidative signaling pathways involved in the inflammatory and degenerative process of articular cartilage, which is a milestone in our study.

Another determining and important factor found in our study was evidenced by the significant effect of BoEA and ElAc in the positive regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10, whereby we observed an increase in the synthesis of this cytokine. IL-10 plays an important role in cartilaginous remodeling, since, according to Sun *et al.*; My *et al.* and Guidotti *et al.* [27, 28, 29], it inhibits osteoclastogens and regulates the action of matrix metalloproteinases (MMPs), and both events are responsible for the degradation of the cartilaginous matrix.

Thus, regarding the anti-inflammatory and antinociceptive action, we observed that the treatment with BoEA and ElAc induced the production of IL-10, promoting anti-inflammatory, anti-nociceptive activity, thus, preventing the advancement in the degeneration of this cartilage through the regulation of MMPs and chondroclasts. According to Kwon *et al.* [26], the degeneration of articular cartilage is related stimuli promoted by activation of catabolic pathways and leads to the inflammatory process, which, in turn, exacerbate the nociceptivity and joint destruction. The authors conclude by reporting that IL-10 improves nociceptive severity and can even be used as an adjunct to pain therapy. In the present study, this regulation and reciprocal balance between the production of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-10) in joints in an experimental model of OA intervened in the improvement of joint cartilage, showing that these compounds can be used to regulate the inflammatory response and nociceptiveness of the joint.

Regarding the radiological and histopathological images of the present study, these showed that after induction of OA, the presence of exuberant marginal osteophytes, subchondral bone sclerosis, areas of cartilage erosion and medial patellar dislocation were observed in the untreated group. Thus, although BoEA and ElAc were not able to prevent the emergence of OA, the animals that were treated with the phytochemical compounds had the

progression of joint damage reduced in relation to the untreated group, i.e., they presented lower degrees of joint alterations according to the classification of the scores [23].

Further studies are needed to better understand the signaling mechanisms involved in these effects, since these catabolic factors activate a series of pathways that play an important role in the pathogenesis of OA.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, the effects of BoEA and ElAc were able to reduce pain, inhibit catabolic pathway activity and, consequently, inflammation through regulation and reciprocal balance of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in MIA-induced OA. Treatments with BoEA and ElAc also attenuated cartilage degeneration evidenced by the radiological and histological images. Therefore, the phytochemical compounds BoEA and ElAc exert beneficial effects on MIA-induced OA and show promise as therapeutic agents or adjuvants for herbal treatment of OA.

Acknowledgements

This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) under grant numbers FAPEMA-INFRA-02012/21; BEPP-01906/2021, FAPEMA-PÓS GRAD-02423/21, UNIVERSAL – 06536/22. BATI – 05406/21. The funding bodies had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to submit the manuscript for publication.

CRedit contribution statement:

All authors were involved with the design of the study, interpretation of the data, critical review of the manuscript and approval of the final version for submission. **Luis Ângelo Macêdo Santiago, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, Rafael Cardoso Carvalho and Eduardo Martins de Sousa:** Conceptualization, Methodology, Software. **Luis Ângelo Macêdo Santiago, Danilo de Araújo Moraes, Rafael Cardoso Carvalho and Eduardo Martins de Sousa:** Data curation, Writing - Preparation of the original draft. **Luis Ângelo Macêdo Santiago, Rafael Cardoso Carvalho and Eduardo Martins de Sousa:** Revision and Editing. **Ana Caroline Santos Ataíde, Danilo de Araújo Moraes, Aldilene da Silva Lima, Nathálya dos Santos Martins, Adriana Vivian Costa Araújo Dourado, Rachel Melo**

Ribeiro, Lídio Gonçalves Lima-Neto, Joicy Cortez de Sá Sousa, Cláudia Quintino da Rocha and Maria do Socorro de Sousa Cartagenes: Visualization. **Luis Ângelo Macêdo Santiago** (luis.angelo@ufma.br) and Eduardo Martins Sousa (eduardo.martins@ceuma.br) take full responsibility for the integrity of the work from the beginning to the finished manuscript.

Declaration of conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in the collection, analysis or interpretation of the data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Data declaration

Data is available upon request.

REFERENCES

- [1] Carvalho, F.M. Costa, M.C. & Silva, T.C.D. Doenças reumáticas no Brasil: revisão de estudos epidemiológicos. Efdeportes.Com, Revista Digital, 184(18), 1-1, 2018.
- [2] Djibersou D.G., Galani B.R.T., Chuisseu P.D.D., Njintang N.Y. Anti-oxidant and anti-inflammatory potential of aqueous extracts of leaves, barks and roots of *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) on acetaminophen-induced liver damage in mice. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, Vol. 10, No. 4, Jul-Aug 2020.
- [3] Philpott H.T. e McDougall J.J. Combatting joint pain and inflammation by dual inhibition of monoacylglycerol lipase and cyclooxygenase-2 in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 22:9, 2020.
- [4] Kim, MI-JI; Kang, Byeong-Hun; Park, Soo-Hyun; Kim B.; Lee, Gyeong-YE; Seo, Young-M.I; Park Ki-Soo AND YOO, Jun-I.L. Association of the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) with Muscle Strength in Community-Dwelling Elderly with Knee Osteoarthritis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 2260, 2020.
- [5] Yujie D., Jinqiu L., Wenling L., Wu D., Xu Z. Wenxue T., KiwaiKevin H. Lin Q., Hai S. and Kinglun K., M. Reciprocal inhibition of YAP/TAZ and NF- κ B, regulates osteoarthritic cartilage degradation. *Nat Communi.* 2018, 9:4564
- [6] Safiri S.; Kolahi A.A.; Hoy D.; Smith E.; Bettampadi D.; Mansournia M.A. *et al.* Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the

- Global Burden of Disease study. *Ann Rheum Dis*. 2019, 78(11), 1463–71.
- [7] Laire P.A.; Canhão H.; Rodrigues A.M.; Eusébio M.; Gouveia M.; Branco J.C. The impact of osteoarthritis on early exit from work: results from a populationbased study. *BMC Public Health*. 2018, 11-18(1), 472.
- [8] Vincent, T.L. Mechanoflammation in osteoarthritis pathogenesis. Seminars in Arthritis and Rheumatism. Supplement 2019, 49, 3.
- [9] Caimari, A., Crescenti, A., Puiggros, F., Boque, N., Arola, L., & Del Bas, J. M. The intake of a high-fat diet and grape seed procyanidins induces gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells of hamsters: capturing alterations in lipid and cholesterol metabolisms. *Genes & Nutrition*. 2015, 10, 438.
- [10] Somacal, S., Figueiredo, C.G., Quatrin, A. *et al.* *Mol Cell Biochem*. 2015, 403, 243.
- [11] Beleza, J.A.M. Medicinal Plants and Herbal Medicines in Primary Health Care: Contribution for Professional Prescribers. 2016. Postgraduate (Specialization) in Innovation Management of Biodiversity Medicines in the modality EAD, 2016.
- [12] Medina-Flores, D.; Ulloa-Urizar, G.; Camere-Colarossi, R.; Caballerogarcía, S.; Mayta-Tovalino, F.; Del Valle-Mendoza, J. Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016, 6(5), 400-403.
- [13] Freire S.M.M. Quality of Urucum (*Bixa orellana* L.) produced by family farmers in the Paraíba countryside. Completion work of the Higher Course in Food Technology, Center for Technology and Regional Development, Federal University of Paraíba. 2017.
- [14] Silva, T.H.M. Study of the hypocholesterolemic effect of bixin cake (*Bixa orellana*) and its metabolic alterations in fisher rats. Thesis presented to the Graduate Program in Biological Sciences at the Federal University of Ouro Preto. 2019.
- [15] Silva F.A., Bizerra, A.M.C., Fernandes, P.R.D. Testes Fítoquímicos em Extratos Orgânicos de *Bixa orellana* L (Urucum). *HOLOS*. 2018, 02, 34.
- [16] Yong Y.K., Sulaiman N., Hakim M.N., Lian, G.E., Zakaria Z.A., Othman F. Suppressions of serotonin-induced increased vascular permeability and leukocyte infiltration by *Bixa orellana* leaf extract. Biomedine Research International. 2013.
- [17] Fernihough, J.; Gentry, C.; Malcangio, M.; Fox, A.; Rediske, J.; Pelas, T.; Kidd, B.; Bevan, S.; Winter, J. Comportamento relacionado à dor em dois modelos de osteoartrite no joelho de ratos. *Dor*. 2004, 112, 83-93.
- [18] Silva, A.; Andersen, M.L; Tufik, S. Padrão de sono em um modelo experimental de osteoartrite. *Dor*. 2008, 140, 446-455.
- [19] Tonussi, C.R.; Ferreira, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen

for central and peripheral analgesics. *Pain*. 1992, 48, 421–427.

- [20] Chaplan, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods*. 1994, 53-1, 55–63.
- [21] Servin, E.T.N.; Czezczko, N.G.; Malafaia, O.; Torres, O. J. M.; Lima, F.C.V.M.; Silva, G. E. B.; Cartágenes, M. S. S.; Garcia, J. B. S. Effect of Arrabidaea Chica Verlot Hydroalcoholic Extract on Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis of Rat Knees. *Brazilian Journal of health Review*. 2020, 3-3, 7038-7057.
- [22] Keyes, *et al.* The radiographic classification of medial gonarthrosis. The radiographic classification of medial gonarthrosis. *Correlation with operation methods in 200 knees*. *Acta Orthop Scand*. 1992, 63-5, 497-501.
- [23] Pritzker, K.P.H.; Gay, S.; Jimenez, S.A.; Ostergaard, K.; Pelletier, J.P.; Revell, P.A.; Salter, D.; Pathxxx, F.R.C. and Van den Berg, W.B. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006, 14, 1.
- [24] Satoshi Y., Yuya K. , Shigeo H., Sumihisa O., Junichi N., Shuichi M., Takane S., Tsutomu A., Yuki S., Yohei K. and Seiji O. Intra-articular injection of monoiodoacetate induces diverse hip osteoarthritis in rats, depending on its dose. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2022, 23, 494.
- [25] Zu, Y; Yue M.; Qiang L., Shu-Ting Z. and Hong-Juan Y. Icaritin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2019.
- [26] Kwon J.; Seung H.L.; Hyun-S., Kyung A; Jeong W., Keun H.C., Chang-Yong L.; Seok J.K.; Sung-Hwan P.; Dong-Yun S. and Mi-La C. Kartogenin inhibits pain behavior, chondrocyte inflammation, and attenuates osteoarthritis progression in mice through induction of IL-10. *Scientific Reports*. 2018, 8-1, 3832.
- [27] Sun, K., Xingzhi J., Jiachao G., Xudong Y. and Fengjing G. Mitophagy in degenerative joint diseases. *Taylor & Francis*. 2021, 17-9, 2082-2092.
- [28] Ansari M.Y., Khan N.M., Ahmad, I., Haqqi, T.M., 2018. Parkin clearance of dysfunctional mitochondria regulates ROS levels and increases survival of human chondrocytes. *Osteoarth.Cartil*. 26-8, 1087-1097.
- [29] Guidotti S., D'adamo s, Cetrullo S. *et al.* A espermidina resgata a resposta autofágica desregulada ao estresse oxidativo dos condrócitos osteoartríticos. *Bio Radical Livre Med*. 2020, 153-159, 172.
- [30] Zheng T., Xinan Z. and Mingli S. Phytochemicals Mediate Autophagy Against Osteoarthritis by Maintaining Cartilage Homeostasis. *Frontiers in Pharmacology*. 2021.
- [31] Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitophagy: an emerging role in aging and age-associated diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020,8, 200.

FIGURES and FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Chromatogram of the ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* and the ellagic acid standard. Phenomenex® Luna C18 column (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), flow 1.0 mL.min⁻¹, solvents: A=H₂O, B=MeOH, both with FA 0.01%.

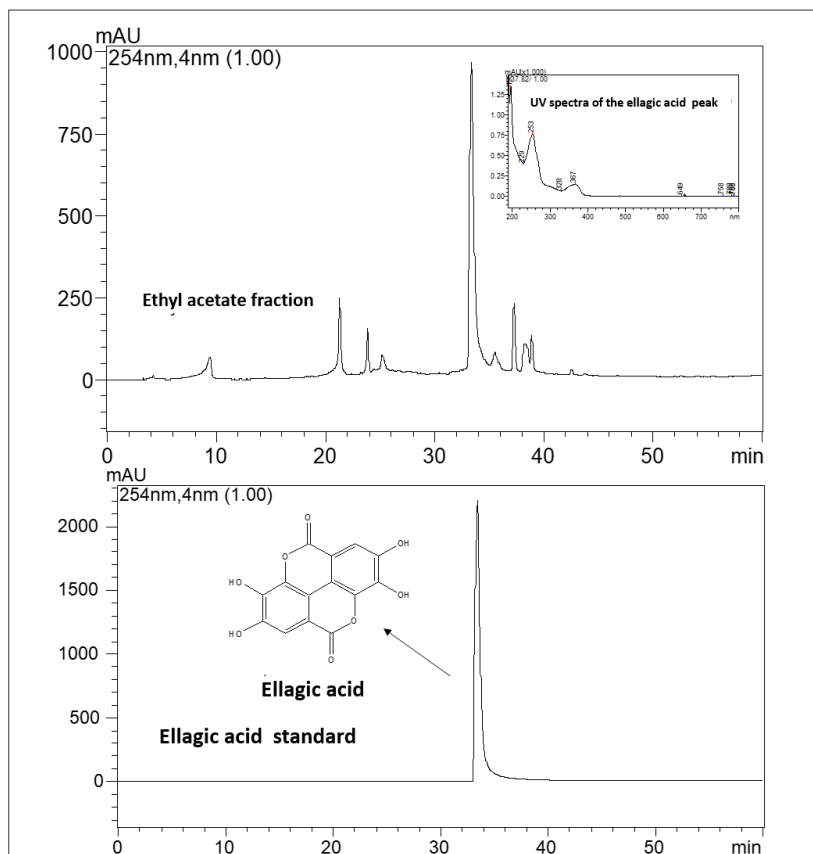
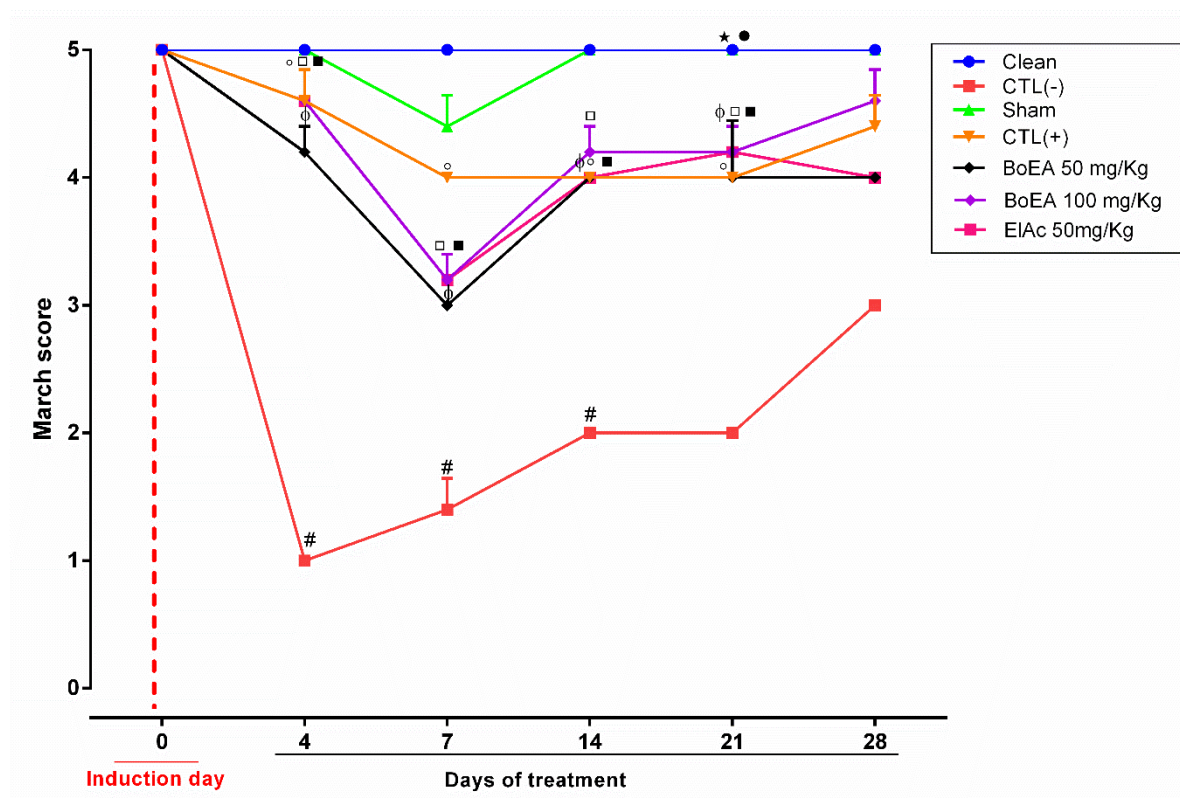
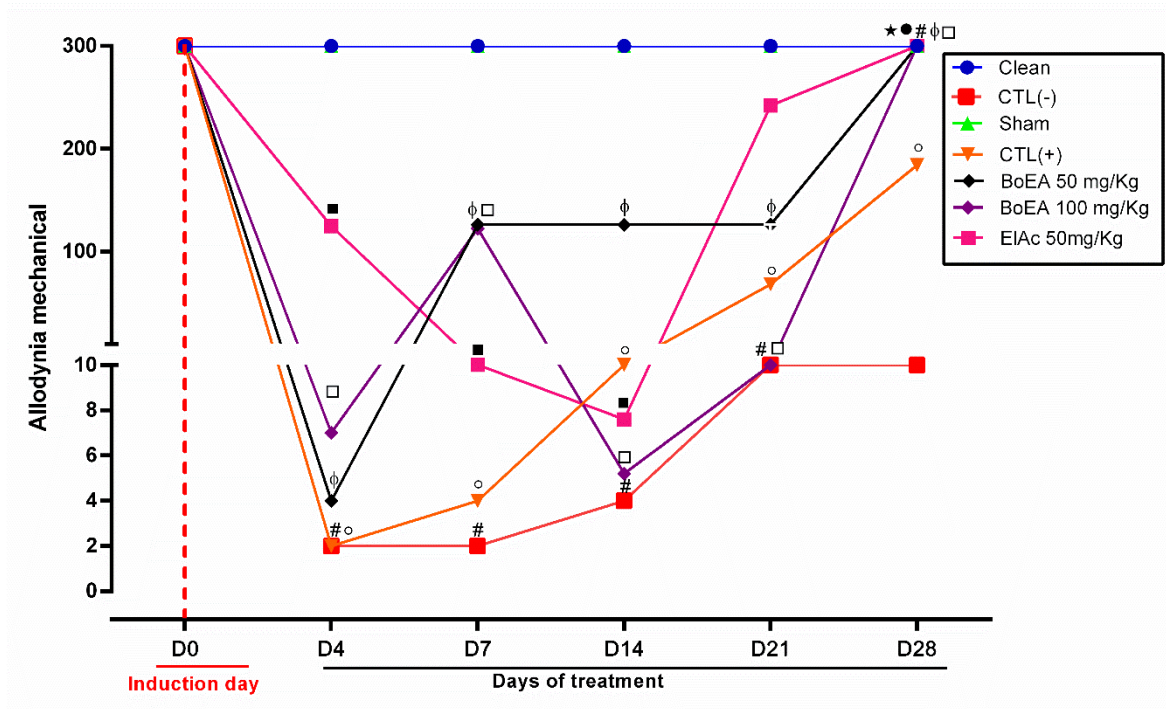


Figure 2 - Effect of BoEA and ElAc fraction on motor activity (forced ambulation) of rats with induced OA, using the Rotarod test score.



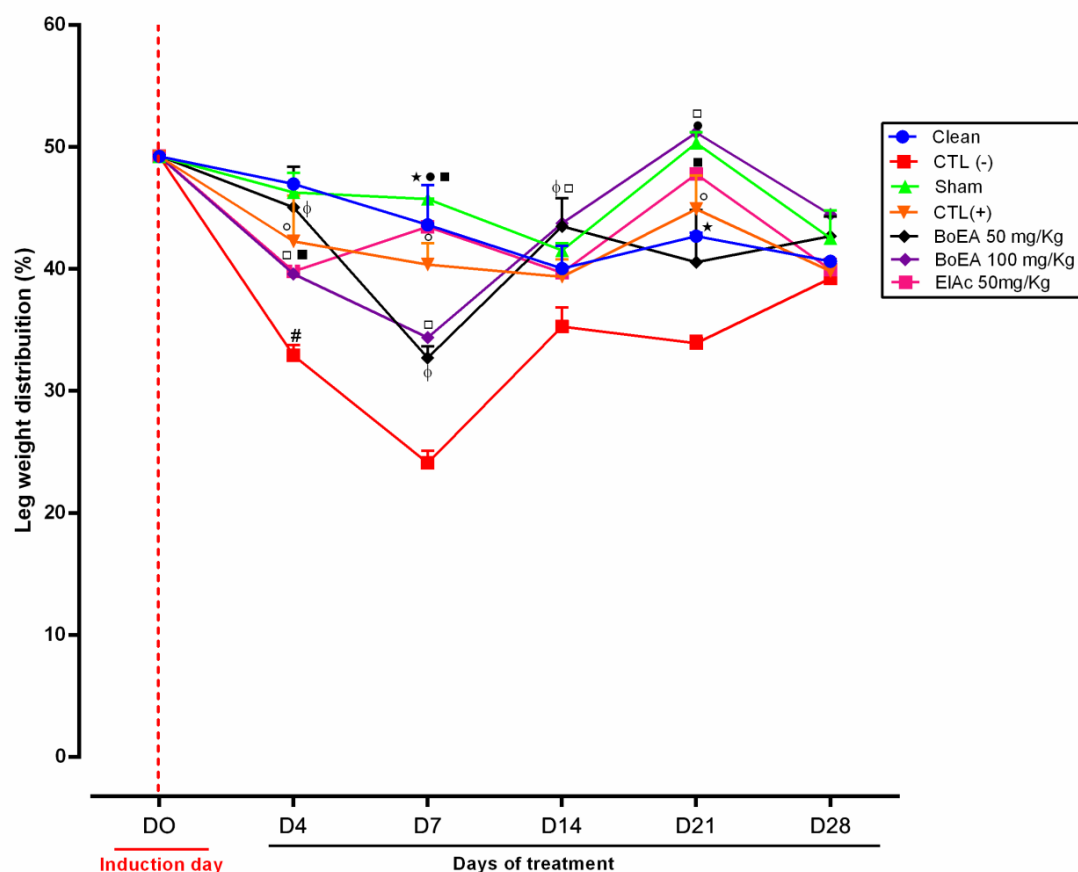
Animals received sorbitol (CTL-), indomethacin (CTL+), animals without intervention, experimental control (Sham), BoEA (50 mg/kg and 100 mg/kg) and ElAc (50 mg/kg) from day 4 to day 28, and were evaluated on days 7, 14, 21 and 28, after induction of OA. The data are presented as mean $\pm$ standard deviation of the means (SEM) of three independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, followed by the post-hoc Bonferroni test. # $p \leq 0.05$, when comparing the CTL- versus the Clean groups on days 4, 7, 14. $\circ p \leq 0.05$, when CTL+ versus Clean groups were compared on days 4, 7, 14 of induction. $\phi p \leq 0.05$, when the BoEA 50 mg/kg versus Clean groups were compared on days 4, 7, 14. $\square p \leq 0.05$, when comparing boea 100 mg/kg versus Clean groups on days 4, 7, 14. $\blacksquare p \leq 0.05$, when compared, the groups ElAc 50 mg/kg versus Clean presented a statistically significant difference on days 4, 7, 14. The groups that underwent treatment, CTL+; BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg and ElAc 50 mg/kg when compared with CTL- presented statistically significant difference in the 21st day after induction ($\circ p \leq 0.05$); ($\phi p \leq 0.05$); ($\square p \leq 0.05$); ($\blacksquare p \leq 0.05$), respectively. Abbreviations: Clean- (without OA and without treatment); CTL-, negative control (with OA and sorbitol treatment); Sham, (simulated induction of OA); CTL+, positive control (indomethacin); BoEA (ethyl acetate fraction of *Bixa orellana*); ElAc, (ellagic acid).

Figure 3 - Effect of BoEA and ElAc fraction on mechanical allodynia (paw withdrawal threshold) of rats induced with OA, using Von Frey's test score.



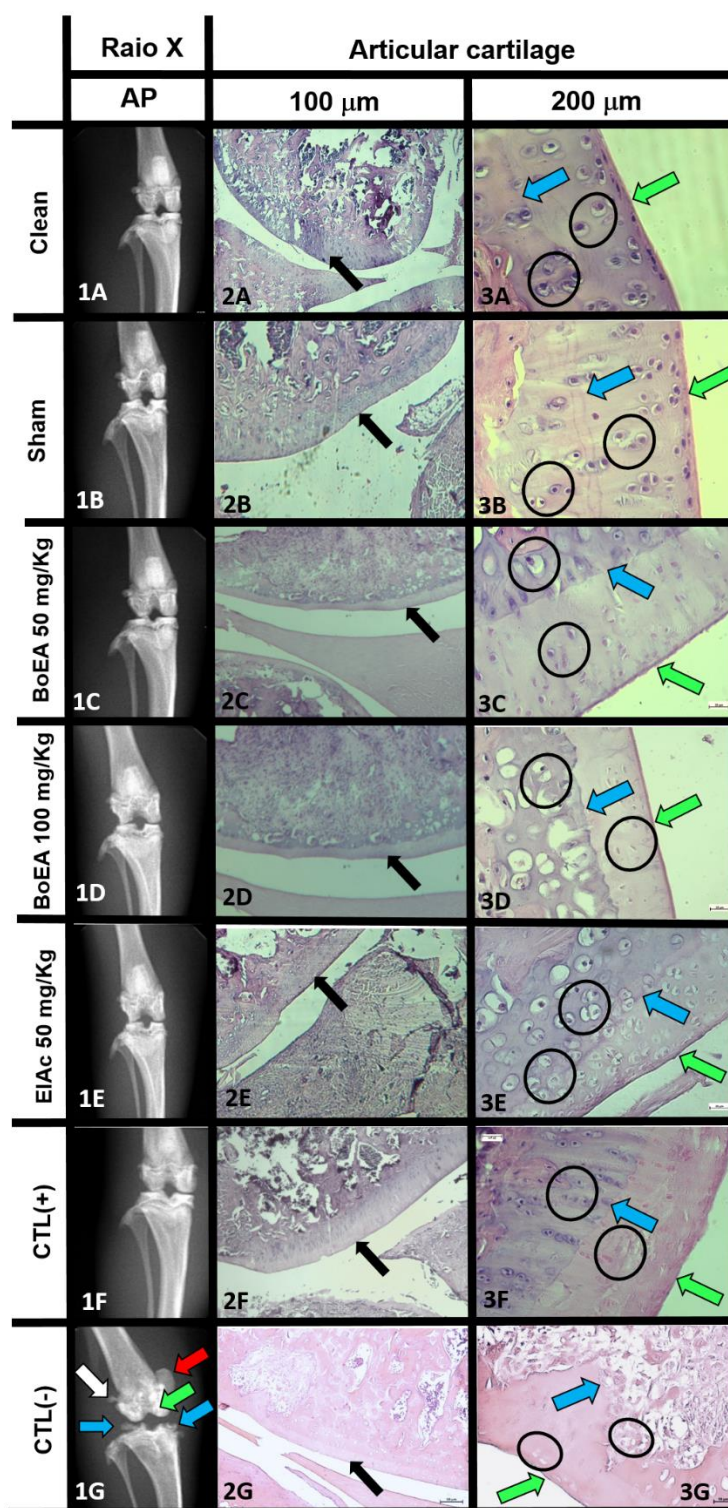
Animals received sorbitol (CTL-), indomethacin (CTL+), animals without intervention, experimental control (Sham), BoEA (50 mg/kg and 100 mg/kg) and ElAc (50 mg/kg) from day 4 to day 28, and were evaluated on days 7, 14, 21 and 28, after induction of OA. The data are presented as mean $\pm$ standard deviation of the means (SEM) of three independent post-hoc experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni test. # $p \leq 0.05$, when comparing the CTL+ versus Clean groups on days 4, 7, 14 and 21. ϕ $p \leq 0.05$, when the BoEA 50 mg/kg versus Clean groups were compared on days 4, 7, 14 and 21. $\square$ $p \leq 0.05$, when comparing the BoEA 100 mg/kg versus Clean groups on days 4, 7, 14 and 21. $\blacksquare$ $p \leq 0.05$, when comparing the ElAc 50 mg/kg versus Clean groups on days 4, 7, 14 and 21. The groups that underwent treatment, CTL+; BoEA 50 mg/kg; BoEA 100 mg/kg and ElAc 50 mg/kg when compared with CTL- showed statistically significant differences on the 28th day after induction ($\circ$ $p \leq 0.05$); (ϕ $p \leq 0.05$); ($\square$ $p \leq 0.05$) and ($\blacksquare$ $p \leq 0.05$), respectively. Abbreviations: Clean- (without OA and without treatment); CTL-, negative control (with OA and sorbitol treatment); Sham, (simulated induction of AO); CTL+, positive control (indomethacin); BoEA (ethyl acetate fraction of *Bixa orellana*); ElAc, (ellagic acid).

Figure 4 - Effect of BoEA and ElAc fraction on joint disability (leg weight distribution) of rats induced with OA and evaluated via the weight-bearing test.



Animals received sorbitol (CTL-), indomethacin (CTL+), animals without intervention, experimental control (Sham), BoEA (50 mg/kg and 100 mg/kg) and ElAc (50 mg/kg) from day 4 to day 28, and were evaluated on days 7, 14, 21 and 28, after induction of OA. The data are presented as mean $\pm$ standard deviation of the means (SEM) of three independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by the post-hoc Bonferroni test. # $p \leq 0.05$, when comparing the CTL-versus Clean groups on day 4. ϕ $p \leq 0.05$, when comparing CTL+ versus Clean groups on day 4. ϕ $p \leq 0.01$, when comparing the groups BoEA 50 mg/kg versus Clean on day 4. $\square$ $p \leq 0.05$, when comparing BoEA 100 mg/kg versus Clean groups on day 4. $\blacksquare$ $p \leq 0.05$, when comparing the ElAc 50 mg/kg versus Clean groups on day 4. The groups that underwent treatment, CTL+; BoEA 100 mg/kg and ElAc 50 mg/kg when compared with CTL- presented statistically significant difference on the 28th day after induction (ϕ $p \leq 0.05$); ($\square$ $p \leq 0.01$) and ($\blacksquare$ $p \leq 0.05$), respectively. Abbreviations: Clean- (without OA and without treatment); CTL-, negative control (with OA and sorbitol treatment); Sham, (simulated induction of AO); CTL+, positive control (indomethacin); BoEA (ethyl acetate fraction of *Bixa orellana*); ElAc, (ellagic acid).

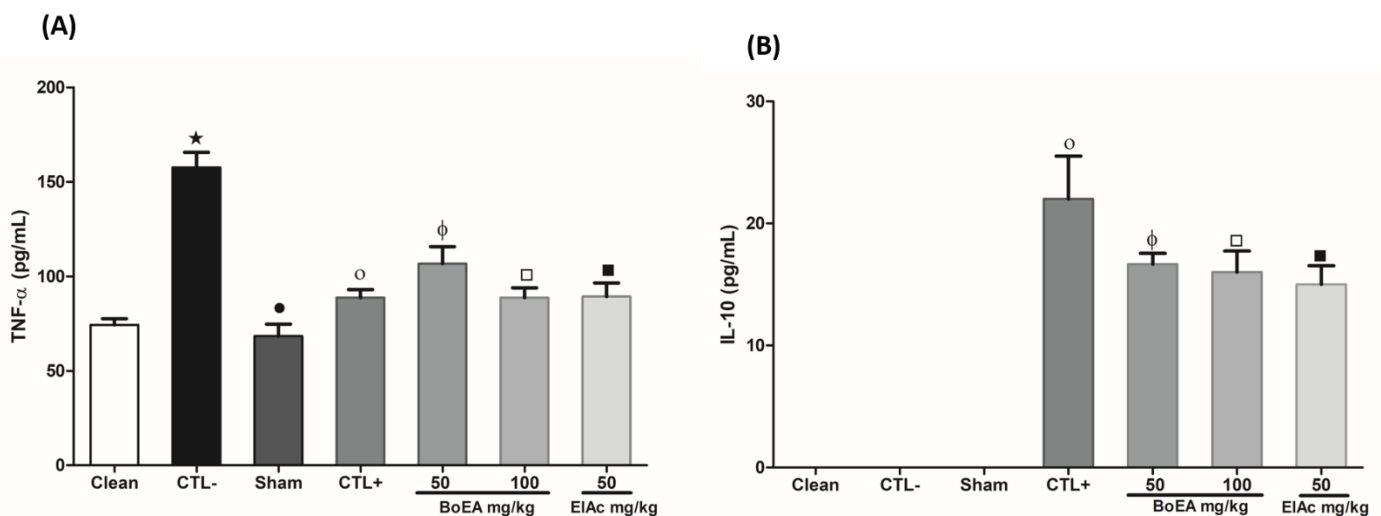
Figure 5 - Radiological and histopathological comparison of the knee joint cartilage of the right knee of *Rattus norvegicus* after 28 days of treatment with BoEA and ElAc for MIA-induced OA.



(1A-1G) Representation of anteroposterior radiographic images of the right knee joint. (2A-2G) Histological representation of medial section of the right knee joint, 40x magnification; the sections were stained with H&E. (3A-3G) Histological representation of medial section of the knee joint, 4x magnification, the sections were stained with H&E. **Radiological images:** **White arrow** – presence of exuberant marginal osteophytes: **Green arrow** – presence of sclerosis of subchondral bone: **Blue arrow** – areas of erosion in cartilage: **Red arrow** – presence of medial dislocation of patella. **Histological images:** **Black arrow** – location of cartilage. **Green arrow** – superficial zone of cartilage. **Blue arrow** – mark line. **Black circles** – chondrocyte cells before and after the mark line.

Degenerative changes in osteoarthritis (OA) were classified using the guidelines of the Osteoarthritis Research Society International (OARSI, 2006). Abbreviations: Clean- (without OA and without treatment); CTL-, negative control (with OA and sorbitol treatment); Sham, (simulated induction of AO); CTL+, positive control (indomethacin); BoEA (ethyl acetate fraction of *Bixa orellana*); ElAc, (ellagic acid); H&E, (hematoxylin-eosin).

Figure 6 – A-B Analysis of TNF- α cytokines in sodium monoiodoacetate (MIA) - induced osteoarthritis in *Rattus norvegicus* after treatment with BoEA and ElAc. B- Analysis of IL-10 cytokines in sodium monoiodoacetate (MIA) - induced osteoarthritis in *Rattus norvegicus* after treatment with BoEA and ElAc.



The levels of TNF- α and IL-10 cytokines in serum were determined using the sandwich ELISA method. (A) TNF- α levels were statistically significant when comparing the Clean versus CTL- group (* $p=0.0001$). The CTL- versus the Sham group showed a statistically significant difference (• $p=0.0001$). CTL- versus CTL+ group (◯ $p=0.0001$). CTL- versus BoEA 50 mg/kg (ϕ $p=0.001$). CTL- versus BoEA 100 mg/kg (◻ $p=0.0001$). CTL- versus ElAc 50 mg/kg (▪ $p=0.0001$). (B) IL-10 levels were significant comparing CTL- versus CTL+ group (◯ $p=0.0001$). CTL- versus BoEA 50 mg/kg (ϕ $p=0.001$). CTL- versus BoEA 100 mg/kg (◻ $p=0.0001$). CTL- versus ElAc 50 mg/kg (▪ $p=0.0001$). The data are presented as mean $\pm$ standard deviation of the means (SEM) of three independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA and the post-hoc Bonferroni test, with significance of $p<0.05$. Abbreviations: Clean- (without OA and without treatment); CTL-, negative control (with OA and sorbitol treatment); Sham, (simulated induction of AO); CTL+, positive control (indomethacin); BoEA (ethyl acetate fraction of *Bixa orellana*); ElAc, (ellagic acid).

ANEXO 3 - PATENTE**República Federativa do Brasil**Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



* B R 1 0 2 0 2 0 0 2 3 9 5 A 2 *

BR 102022002395-6 A2**Data do Depósito:** 08/02/2022**Data da Publicação Nacional:**

22/08/2023

Título: FORMULAÇÃO ORAL CONTENDO ÁCIDO ELÁGICO, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO

Int. Cl.: A61K 31/352; A61P 31/02.**CPC:** A61K 31/352; A61P 31/02.**Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO.**Inventor(es):** RACHEL MELO RIBEIRO; EDUARDO MARTINS SOUSA; RAFAEL CARDOSO CARVALHO; ROBERVAL NASCIMENTO MORAES NETO; CLÁUDIA QUINTINO DA ROCHA; GABRIELLE GUEDES COUTINHO; **LUIS ÂNGELO MACÊDO SANTIAGO.**

Resumo: FORMULAÇÃO ORAL CONTENDO ÁCIDO ELÁGICO, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO. A presente invenção refere-se à aplicação de ácido elágico na preparação de medicamento para inibir a patogenicidade de bactérias presentes em abscessos piogênicos, com supuração e reação inflamatória aguda. A presente invenção está inserida no campo da indústria farmacêutica, química e veterinária; composições farmacêuticas, de uso oral, preparados a partir do ácido elágico com ação antibiótica. As formulações de uso oral contêm compostos inertes que garantem boa solubilidade do componente ativo, melhor palatabilidade, sabor adocicado, sem alteração do odor original, com elevada biodisponibilidade oral, sem riscos de toxicidade. A invenção também fornece uma nova aplicação médica do ácido elágico.

FORMULAÇÃO ORAL CONTENDO ÁCIDO ELÁGICO, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO

Campo da invenção

A presente invenção está inserida no campo da indústria farmacêutica, química e veterinária; composições farmacêuticas, de uso oral, preparados a partir do ácido elágico com ação antibiótica. As formulações de uso oral contêm compostos inertes que garantem boa solubilidade do componente ativo, melhor palatabilidade, sabor adocicado, sem alteração do odor original, com elevada biodisponibilidade oral, sem riscos de toxicidade inerente à antibioticoterapia clássica. A invenção também fornece uma nova aplicação médica do ácido elágico.

Estado da técnica e Fundamentos da Invenção

A incidência de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido vem crescendo de maneira global nos últimos anos. Destas, a *Mycobacterium abscessus* subsp. massiliense (Mabs) merece atenção especial, uma vez que, pode causar infecções pulmonares com rápida perda de função pulmonar, fibrose cística, infecções de pele, pós-cirúrgicas e peritonite. São de difícil tratamento, sendo naturalmente resistentes a maioria das drogas antimicrobianas. O esquema farmacoterapêutico mais usualmente empregado é a associação entre claritromicina com amicacina e cefoxitina ou imipenem, com falhas estimadas entre 20 e 40% dos casos. Isto ocorre em virtude da presença de uma espessa parede celular rica em proteoglicano como também a um sistema de bombas de efluxo que protegem essas bactérias contra substâncias tóxicas. Em virtude da dificuldade e da importância do tratamento das infecções causadas pela Mabs torna-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas, uma vez que, os tratamentos de referência apresentam pouca eficácia.

Nesse contexto, o ácido elágico, um fitoquímico de ocorrência natural encontrado em uma variedade de espécies de plantas, torna-se elegível como matéria-prima para a composição de formulações farmacêuticas e seu uso para o tratamento de infecções. Esse composto apresenta diversas funções para a planta como regular o crescimento da planta e a germinação das sementes e proteger a planta de infecções microbianas, envenenamento por metais pesados e predação por insetos e larvas de insetos. Porém, desde o início da década de 1990, a comunidade científica vem pesquisando o ácido elágico em diferentes modelos experimentais e verificaram o vasto potencial desse composto para a saúde humana.

Na busca pelo estado da técnica em literaturas científicas e patentárias, foram encontrados

os seguintes documentos sobre o tema:

O documento EP1721532A1, que reivindica um material de suplemento alimentar e método de sua preparação, contendo ácido elágico (isto é, na forma de elagitaninos biodisponíveis), derivado de materiais vegetais de romã. Mais preferencialmente, o suplemento alimentar é extraído da semente de romã e contém de cerca de 40% a cerca de 90% de ácido elágico (elagitaninos) e é apresentado para administração oral humana como um póseco contido em cápsulas de gelatina para consumo diário.

Foi reivindicado em WO2016049557A1 que se refere a formulações de ácido elágico para realizar testes de coagulação, em particular a presente invenção consiste em uma composição e um processo de preparação de ácido elágico em um formato solúvel para uso em um teste de coagulação.

Ainda, o pedido US20170367390A1, se refere a produtos alimentícios, cosméticos e / ou composições nutracêuticas e métodos de uso, cujas composições podem incluir um composto di-hidratado de ácido elágico que auxilia na absorção de glicose.

Em seguida, o pedido WO2007127263A3, cuja invenção em questão foi desenhada para metabólitos de elagitanino e seu uso no tratamento ou prevenção de uma doença neoplásica.

Semelhante a esse pedido, encontra-se o CN102670588B, que descreve uma aplicação de ácido elágico para a preparação de um medicamento antiviral. O vírus refere-se a um vírus herpes simplex simples e a um vírus do papiloma humano. A invenção divulga ainda uma composição medicinal tendo ácido elágico como ingrediente ativo. Abre-se uma nova via para a aplicação do ácido elágico.

Em continuidade, o pedido US20150125556A1, cuja invenção reivindica o extrato de polpa de romã no tratamento dos sintomas da menopausa na mulher, devido à presença de grande quantidade de ácido elágico. É ainda divulgado um método para melhorar ainda mais o efeito de tratamento do extrato de romã sobre os sintomas da menopausa nas mulheres. O método inclui aumentar o conteúdo de ácido elágico no extrato de romã.

Foi reivindicado em US20050238731A1, uma composição e método de tratamento dos efeitos de doenças e enfermidades do trato digestivo superior, cuja base da invenção e método de tratamento se concentra no uso de substâncias naturais que exercem vários efeitos na estrutura e função do corpo, incluindo, mas não se limitando à neutralização imediata do ácido clorídrico secretado pelo estômago humano ou animal, efeitos antioxidantes nos tecidos, ações para a erradicação de *Helicobacter pylori* por um mecanismo de inibição da função das bombas de prótons gástricas, além de um efeito cronológico bimodal na redução da acidez

intragástrica.

Interessantemente, o pedido WO2010076913A1, trata de composição farmacêutica para melhorar a síndrome pós-menopausa compreendendo uma quantidade eficaz de um extrato da polpa da romã. Com elevada biossegurança, podendo ser utilizado em diversas aplicações, como medicamentos, farmacologia e alimentos saudáveis contendo ácido elágico dentre outros componentes, apresentando um excelente efeito na melhora da síndrome pós-menopausa.

Encontra-se também o pedido CN103622955A, trata da aplicação de ácido elágico na preparação de medicamentos para o tratamento e prevenção de infecções fúngicas do corpo humano, cuja reivindicação trata do uso oral e tópico do ácido elágico para infecções fúngicas por *Trichophyton rubrum*.

Todos os pedidos são produtos diferentes da presente invenção.

Objetivo da invenção

A presente invenção tem como objetivo formulações de composição farmacêutica que utilizam ácido elágico, com boa palatabilidade e estabilidade, como tratamento alternativo, tão eficiente quando comparada a medicamentos descritos na literatura, para obtenção de fitoterápicos ou fitofármacos e seu uso terapêutico do produto na prevenção, tratamento ou diagnóstico de doenças infecciosas. Além de não ser agressivo à mucosa gástrica.

Breve descrição das tabelas

Tabela 1 – Potencial biológico do ácido elágico frente à claritromicina

Composição	CIM	CBM (mg/mL)
Ácido Elágico	1,56 mg/mL	3,12 mg/mL
Claritromicina*	4,67 µg/mL	>64 mg/mL

* Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima

(CBM) dos diferentes compostos fitoquímicos sobre a *Mycobacteria abscessus* subsp. *massiliense*.. O MIC e o CBM da Claritomicina foram obtidos através de revisão bibliográfica sendo dos autores: MUKHERJEE et al., 2017 e TANG et al., 2018, respectivamente.

Tabela 2 - Previsão de atividade- ensaio *in silico*

Ácido Elágico		
Atividade	Pa	Pi
Antibacteriano	0,6 28	0, 035
Antimicobacteriano	0,6 01	0, 08
Hepatoprotetor	0,5 99	0, 012

Pa: Potencial de Atividade; Pi: Potencial de Inatividade. $Pa > Pi$ indicando potencial biológico do ácido elágico, cujo valor maior que 0,6 sugere intermediária chance de demonstrar a atividade. A ação hepatoprotetora também foi investigada. Embora não seja diretamente relacionada com atividade antimicrobiana, ela foi incluída nesta seleção, uma vez, que o antibiótico convencional utilizado para tratar infecções mico bacterianas, a claritromicina, possui efeito adverso de hepatotoxicidade.

Breve Descrição da Invenção

Trata-se de formulações farmacêuticas à base de ácido elágico e seu uso no tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças infecciosas do trato respiratório. Constatou-se, em nossos estudos pré-clínicos *in vitro* e *in silico*, que o esse fitoquímico apresentou atividades bactericida e bacteriostática frente a Mabs, uma baixa toxicidade, sem a presença de efeitos mutagênicos ou carcinogênicos, além de ação hepatoprotetora, mostrando-se benéfico em relação à terapia antibiótica atual com claritromicina, sendo, para este fármaco, a hepatotoxicidade uma reação adversa medicamentosa esperada.

A vantagem neste invento é principalmente a obtenção de composições farmacêuticas e seu uso na prevenção ou tratamento de complicações decorrentes de doenças infecciosas,

mesmo quando utilizado por um curto tempo de tratamento, mesmo que doses únicas diárias. Enfatizando que se trata de uma aplicação clínica pioneira para doença infecciosa por *Mycobacterium abscessus* e, portanto, de grande relevância para a saúde pública, de tratamento estabelecido, nem sempre com eficácia e sempre relacionado à multiresistência.

Além de apresentar potencial antioxidante elevado, o ácido elágico em análise *in silico* mostrou uma predisposição a alta absorção intestinal, superior à da claritromicina, além de não possuir a capacidade de atravessar barreira hematoencefálica, descartando possíveis efeitos sobre o Sistema Nervoso Central.

Ainda, quanto à toxicidade do ácido elágico, os ensaios *in silico* sugerem uma ampla janela terapêutica, com dose letal 50% (DL50) quatro vezes superior a DL50 da claritromicina, aliado ao fato que o fitoquímico não possui potencial mutagênico, carcinogênico, irritativo, ou ainda quaisquer efeitos deletérios ao sistema reprodutor.

Descrição detalhada da invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo dela.

A presente invenção refere-se às formulações farmacêuticas sólida obtida a partir do ácido elágico, sendo na forma de cápsulas gelatinosas, de acordo com as técnicas farmacotécnicas clássicas, de tal forma que cada formulação contém a composição seguinte:

Cápsulas:

Ácido elágico 0,01 a 1500 mg

Excipiente* q.s.p 50 a 1000 mg

*gelatina vegetariana, glicerina e água

A presente invenção refere-se às formulações farmacêuticas líquidas na forma de suspensões ou soluções, de acordo com as técnicas farmacotécnicas clássicas, de tal forma que cada formulação contém a composição seguinte:

Suspensões:

Ácido elágico 0,1 a 1500 mg

Excipiente* q.s.p 10 a 200 ml

Soluções:

Ácido elágico 0,1 a 1500 mg

Excipiente* q.s.p 10 a 200 ml

*sorbitol, xilitol, manitol, sacarina, xilitol, sorbitol, maltitol, manitol, eritritol, lactol e isomalte ou óleo de milho, óleo de rícino ou óleo de girassol.carboximetilcelulose e água

As suspensões e soluções poderão ser utilizadas como medicamento adulto e pediátrico com ajuste de dose de acordo com o peso do paciente, sendo recomendável a administração diária de até 200 mg/Kg, em dose única diária.

Outras formas de apresentação poderão futuramente ser produzidas e utilizadas, sem que com isso se fuja do escopo da proteção pretendida.

REIVINDICAÇÕES

1. **Composições farmacêuticas**, caracterizadas por compreender de 0,1 a 1500 mg de ácido elágico, contendo 50 a 1000 mg e/ou 10 a 200 ml de excipiente farmacologicamente aceitável, podendo se apresentar nas formas de cápsulas, suspensões ou soluções.

2. **Composições farmacêuticas**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender:

Cápsulas:

Ácido elágico 0,1 a 1500 mg

Excipiente q.s.p 50 a 1000 mg

3. **Composições farmacêuticas**, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por sua cápsula conter como excipientes gelatina vegetariana, glicerina e água.

4. **Composições farmacêuticas**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender:

Suspensões:

Ácido elágico 0,1 a 1500 mg

Excipiente q.s.p 10 a 200 ml

5. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender:

Soluções:

Ácido elágico 0,1 a 1500 mg

Excipiente q.s.p 10 a 200 ml

6. Composições farmacêuticas, de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizada pelo fato de que o excipiente pode ser componente sacarose ou equivalente farmacêutico xilitol, sorbitol, maltitol, manitol, eritritol, lactol e isomalte ou óleo de milho, óleo de rícino ou óleo de girassol e carboximetilcelulose.

7. Composições farmacêuticas, de acordo com as reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo fato de que é um medicamento para tratamento e prevenção de infecções hospitalares nos pulmões, pele e tecidos moles.

RESUMO

FORMULAÇÃO ORAL CONTENDO ÁCIDO ELÁGICO, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO

A presente invenção refere-se à aplicação de ácido elágico na preparação de medicamento para inibir a patogenicidade de bactérias presentes em abscessos piogênicos, com supuração e reação inflamatória aguda. A presente invenção está inserida no campo da indústria farmacêutica, química e veterinária; composições farmacêuticas, de uso oral, preparados a partir do ácido elágico com ação antibiótica. As formulações de uso oral contêm compostos inertes que garantem boa solubilidade do componente ativo, melhor palatabilidade, sabor adocicado, sem alteração do odor original, com elevada biodisponibilidade oral, sem riscos de toxicidade. A invenção também fornece uma nova aplicação médica do ácido elágico.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA ECONOMIA

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

**EXAME PRELIMINAR**

N.º do Pedido: BR102022002395-6

N.º de Depósito PCT:

Data de Depósito: 08/02/2022

O pedido atende formalmente as disposições legais, especialmente quanto ao Art. 19 da LPI e o Instrução Normativa nº 31/2013, estando apto a ser protocolado.

Condições do Pedido	S	N
Requerimento de depósito com os campos obrigatórios preenchidos	X	
Idioma Português	X	
Relatório Descritivo	X	
Reivindicações	X	
PI e C – Apresenta desenhos citados ou não cita nem apresenta desenhos. MU – Apresenta desenhos.	X	
Resumo	X	
Formatado no padrão exigido	X	
Valor correto de Recolhimento	X	

Rio de Janeiro, 7 de março de 2022.

Patricia Paiva Carvalho
Mat. Nº 1535837
DIRPA / COSAP/SEFOR