

Curso de Graduação em Farmácia

Matheus Ferreira Irie

Raízes de *Achillea millefolium*:
investigação fitoquímica,
avaliação do seu potencial
antioxidante e estudo *in silico*
das propriedades ADMET

MATHEUS FERREIRA IRIE

Raízes de *Achillea millefolium*: investigação fitoquímica, avaliação do seu potencial antioxidante e estudo *in silico* das propriedades ADMET

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Anne Caroline Candido Gomes e Profa. Dra. Naomi Kato Simas.

Rio de Janeiro
2023

- I68r Irie, Matheus Ferreira
Raízes de *Achillea millefolium*: investigação fitoquímica, avaliação do seu potencial antioxidante e estudo *in silico* das propriedades ADMET / Matheus Ferreira Irie - Rio de Janeiro, 2023.
68 f. : il.
- Orientação: Anne Caroline Gomes.
Coorientação: Naomi Kato Simas.
Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Realengo, 2023.
1. Asteraceae. 2. Farmacocinética. 3. Antioxidante. 4. Alquilamidas. 5. Biodisponibilidade oral. I. Gomes, Anne Caroline, orient. II. Simas, Naomi Kato, coorient. III. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 615

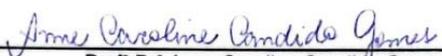
MATHEUS FERREIRA IRIE

Raízes de *Achillea millefolium*: investigação fitoquímica, avaliação do seu potencial antioxidante e estudo *in silico* das propriedades ADMET

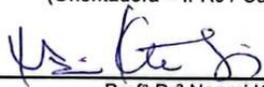
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 13/12/2023.

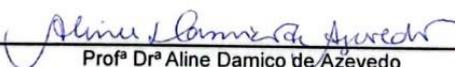
Banca Examinadora



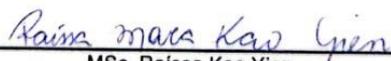
Profª Drª Anne Caroline Candido Gomes
(Orientadora – IFRJ / Campus Realengo)



Profª Drª Naomi Kato Simas
(Coorientadora – PPGCG/UF RJ)



Profª Drª Aline Damico de Azevedo
(Membro Interno - IFRJ / Campus Realengo)



MSc. Raissa Kao Yien
(Membro externo – PPGCF/UF RJ)

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a Deus e aos Orixás, que me deram força e me ajudaram para chegar até esse momento. A jornada foi longa e nada foi fácil, mas eles não permitiram que eu perdesse minha fé e me mantiveram firme e forte.

Agradeço à minha amiga, parceira e mãe, Márcia Ferreira, por ser uma pessoa incrível e ter me proporcionado todos os meios para que eu chegasse até aqui. Obrigado por todos os puxões de orelha e por todos os incentivos. Obrigado por ser a melhor mãe do mundo. Obrigado por ter sido forte em todas as vezes que a vida te desafiou. Se eu for metade da pessoa que você é, eu estou feito na vida. Não poderia deixar de agradecer o homem mais importante da minha vida, meu avô, pai e maior incentivador. Obrigado, seu Jorge, obrigado por tudo e por me proporcionar todas as oportunidades. Aproveito para agradecer todas as pessoas da minha família e meus amigos que me apoiaram, torceram e torcem por mim.

Agradeço à minha mãe científica e orientadora, Anne Caroline, que abriu as portas do laboratório, me apresentou ao projeto e fez eu me apaixonar pela bancada. Eu não poderia ter escolhido uma orientadora melhor e mais atenciosa, sem ela nada disso seria possível. Agradeço também a minha coorientadora, professora Naomi Kato Simas, que me acolheu, me ensinou e sempre foi muito solícita. Não poderia deixar de agradecer às minhas fiéis e parceiras de bancada, aquelas que por muitas vezes foram minhas professoras e orientadoras dentro do laboratório, Anne Katherine e Raíssa.

Aos amigos que fiz e pessoas com quem convivi nesses longos 6 anos, eu agradeço por todos os momentos durante a graduação, as crises pré e pós-provas, as chopadas, os trotes, as angústias e as felicidades. Aproveito para agradecer à Atlética Realengo, que me ensinou a trabalhar em equipe, ser um gestor de grupo e organizar eventos até fora do Rio de Janeiro. Não quero ser leviano e acabar esquecendo de citar alguém, mas quem fez parte, sabe que fez parte. Sem meus amigos, principalmente os da CDZO, eu não estaria aqui defendendo o Trabalho de Conclusão de Curso.

Por fim, agradeço a participação e contribuição da banca e a todos os profissionais que tive a oportunidade de conhecer e aprender.

IRIE, Matheus Ferreira. Raízes de *Achillea millefolium*: Investigação fitoquímica, avaliação do seu potencial antioxidante e estudo *in silico* das propriedades ADMET. 69f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

RESUMO

Achillea millefolium, conhecida no Brasil como milefólio e novalgina, pertencente à família Asteraceae, é uma planta perene nativa da Europa, atualmente distribuída por todo mundo e, no Brasil, é encontrada principalmente na região da Mata Atlântica. As partes aéreas desta planta são utilizadas na medicina popular para o tratamento de dores, cólica, falta de apetite e inflamações. Estudos recentes encontraram boa atividade antioxidante dos extratos das folhas, flores, ramos e inflorescências de *A. millefolium*, aumentando ainda mais seu campo de aplicações biológicas. Sabe-se que diversas espécies da família Asteraceae apresentam em sua composição a presença de alcanidas. Algumas atividades farmacológicas vêm sendo descritas para alcanidas, tais como anti-inflamatória, analgésica, antiparasitária, ação antimicrobiana e larvicida. Entretanto, não há relatos na literatura sobre a utilização de raízes de *A. millefolium* com atividade antioxidante. Sabe-se, que os antioxidantes atuam na eliminação de radicais livres do nosso organismo, sendo assim, são capazes de proteger contra danos causados pelas espécies reativas de oxigênio e em processos patológicos, como câncer, inflamações e envelhecimento celular. Com isso, o objetivo deste estudo é analisar a constituição fitoquímica do extrato das raízes de *Achillea millefolium*, bem como determinar sua capacidade antioxidante e avaliar as propriedades físico-químicas, absorção, distribuição, metabolização e toxicidade das alcanidas a partir das plataformas SwissADME e vNN-ADMET, analisando parâmetros essenciais para um candidato a fitofármaco. A partir do extrato etanólico das raízes foram identificadas 9 alcanidas, que tiveram suas estruturas elucidadas por meio da técnica de Espectrometria de Massas em comparação com a literatura. As alcanidas identificadas foram o isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (8,9- desidropellitorina), isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pelitorina), isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico, piperidinamida do ácido deca-2*E*, 4*E*-dienóico, piperidinamida do ácido undeca-2*E*, 4*E*-dieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca -2*E*,4*E*,12*Z*-trieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico (anaciclina), tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico, sendo a pelitorina a alcanida majoritária. Os resultados das avaliações antioxidantes foram considerados promissores. A partição em diclorometano apresentou CE₅₀ de 6,9 µg/mL, apresentando um resultado melhor quando comparado com a quercetina, cuja CE₅₀ foi de 12.84 µg/mL. Ao serem analisadas possíveis interações dessas alcanidas com as isoformas do citocromo P450, foi observado que a isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico e a piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico não se apresentaram como inibidores de nenhuma das CYPs. As alcanidas avaliadas quanto à sua cardiotoxicidade não bloquearam o canal hERG. De forma geral, diante todas as avaliações realizadas, as alcanidas apresentam boa biodisponibilidade oral frente aos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos. Sendo assim, são consideradas moléculas interessantes e que podem servir para o planejamento de fármacos.

Palavras-chave:alquilamidas; Asteraceae; farmacocinética; antioxidante; biodisponibilidade oral

IRIE, Matheus Ferreira. Roots of *Achillea millefolium*: phytochemical investigation, evaluation of antioxidant potential and *in silico* study of ADMET properties. 69f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

ABSTRACT

Achillea millefolium, known in Brazil as yarrow and novalgim, belonging to the family Asteraceae, is a perennial plant native to Europe, currently distributed throughout the world and, in Brazil, is found mainly in the Atlantic Forest region. The aerial parts of this plant are used in folk medicine for the treatment of pain, colic, lack of appetite and inflammation. Recent studies have found good antioxidant activity of the extracts of the leaves, flowers, branches and inflorescences of *A. millefolium*, further increasing its field of biological applications. It is known that several species of the family Asteraceae present in its composition the presence of alkaloids. Some pharmacological activities have been described for alkaloids, such as anti-inflammatory, analgesic, antiparasitic, antimicrobial action and larvicide. However, there are no reports in the literature on the use of *A. millefolium* roots with antioxidant activity. It is known that antioxidants act in the elimination of free radicals from our body, so they are able to protect against damage caused by reactive oxygen species and in pathological processes such as cancer, inflammation and cellular aging. Thus, the objective of this study is to analyze the phytochemical constitution of the extract of the roots of *Achillea millefolium*, as well as determine its antioxidant capacity and evaluate the physicochemical properties, absorption, distribution, metabolization and toxicity of alkaloids from the SwissADME and vNN-ADMET platforms, analyzing essential parameters for a candidate for Phytopharmaceutical. From the ethanolic extract of the roots were identified 9 alkaloids, which had their structures elucidated by the technique of Mass Spectrometry compared to the literature. The identified alkaloids were the isobutylamide acid deca-2E,4E,8Z trienoic (8,9- dehydropellitorine), isobutylamide acid deca-2E, 4E-dienoic (pellitorine), Isobutylamide acid undeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic, piperidine acid deca-2E,4E-dienoic, piperidine acid undeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic, isobutylamide acid tetradeca-2E,4E,12Z-triene-8,10-dienoic, isobutylamide acid tetradeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic (anacycline), tyramide acid deca-2E, 4E-dienoic and 4-methoxy phenylethylamide acid deca-2E,4E-dienoic, with pellitorin being the major alkaloid. The results of antioxidant evaluations were considered promising. The dichloromethane partition presented EC50 of 6.9 µg/mL, presenting a better result when compared to quercetin, whose EC50 was 12.84 µg/mL. When possible interactions of these alkaloids with the isoforms of cytochrome P450 were analyzed, it was observed that the isobutylamide acid deca-2E,4E,8Z trienoic (8,9-dehydropellitorine) and piperidine acid undeca-2E,4E-diene-8,10-dienoic³⁺² were not inhibitors of any of the CYPs. The alkaloids evaluated for their cardiotoxicity did not block the hERG channel. In general, given all the evaluations performed, the alkaloids have good oral bioavailability against the physical-chemical and pharmacokinetic parameters. Thus, they are considered interesting molecules that can be used for drug planning.

Key words: alkylamides; Asteraceae; pharmacokinetics; antioxidant; oral bioavailability

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
AMES	Teste de Mutagenicidade
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
APPI	Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica
BHE	Barreira hematoencefálica
BHT	Butilhidroxitolueno
CB1	Receptor endocanabinoide tipo 1
CB2	Receptor endocanabinoide tipo 2
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE50	Concentração Eficaz
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-ESI-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ionização por <i>Electrospray</i> acoplada à Espectrometria de Massas
CYP P450	Citocromo P450
DILI	Drug delivery injury
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO

Espécies Reativas de Oxigênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Achillea millefolium</i>	15
Figura 2 - Alguns constituintes presentes no óleo essencial.....	15
Figura 3 - Exemplos de monoterpenos presentes na <i>Achillea millefolium</i>	16
Figura 4 - Ácidos fenólicos	18
Figura 5 - Estrutura fundamental dos flavonoides	19
Figura 6 - Flavonoides encontrados em <i>A. millefolium</i>	19
Figura 7 - Estrutura básica das alcanidas	20
Figura 8 - Principais ácidos graxos precursores.....	21
Figura 9 - Aminoácidos que sofrem a descarboxilação	22
Figura 10 - Aminoácidos valina e lisina como precursores de diferentes amidas	22
Figura 11- N-alquilamidas encontradas no extrato etanólico de raízes de <i>A. millefolium</i>	23
Figura 12- CCD das frações de hexano, diclorometano e extrato bruto, reveladas em dragendorff.....	31
Figura 13 - Cromatograma obtido por CLAE (A) e espectros de UV (B) referentes aos picos majoritários da partição em diclorometano das raízes de <i>Achillea millefolium</i>	32
Figura 14 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico ([M+H] 230).	34
Figura 15 - alcanida isobutilamida do ácido undeca-2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico.	34
Figura 16 - Espectro de ESI/EM referente ao piperidinamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico ([M+H] 242).	35
Figura 17 - estrutura da alcanida piperidinamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico.	35
Figura 18 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> -trienoico ([M+H] 222).	36
Figura 19 - Estrutura da alcanida isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> -trienoico.	36
Figura 20 - Espectro de ESI/EM referente ao tiramida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-9,10-diinoico ([M+H] 288)	37
Figura 21 - estrutura da alcanida tiramida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-9,10-diinoico.	37
Figura 22 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico (pelitorina) ([M+H] 224).	38

Figura 23 - Estrutura da alcanida Isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico (pelitorina).	38
Figura 24 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -trieno-8,10-diinoico ([M+H] 270).	39
Figura 25 - Estrutura da alcanida isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -trieno-8,10-diinoico.	39
Figura 26 - Espectro de ESI/EM referente à piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico.....	40
Figura 27 - Estrutura da alcanida piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico. ...	40
Figura 28 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico ([M+H] 272).	41
Figura 29- Estrutura da alcanida isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinoico.	41
Figura 30- Espectro de ESI/EM referente ao 4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico ([M+H] 302).	42
Figura 31 - Estrutura da alcanida 4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico.	42
Figura 32- Reação de redução do DPPH (cor púrpura) à hidrazina (cor amarela)....	44
Figura 33- Mudança na coloração após o DPPH ser reduzido à hidrazina.	44
Figura 34 - Estrutura do flavonoide quercetina.....	46
Figura 35- Radar de Biodisponibilidade da plataforma SwissADME.	49
Figura 36- Avaliação dos parâmetros de absorção gastrointestinal e da possibilidade de ultrapassar a BHE a partir do gráfico BOILED-Egg.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alcamidas da partição em diclorometano identificadas por CLAE-ESI/EM.	42
Tabela 2 - Atividade Antioxidante.....	45
Tabela 3 - Concentração da quercetina e seus valores de atividade antioxidante....	45
Tabela 4 - Tabela de propriedades físico-químicas e <i>druglikeness</i>	53
Tabela 5 - Dados farmacocinéticos das moléculas avaliadas.....	55
Tabela 6 - Toxicidade dos candidatos à farmaco.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	FAMÍLIA ASTERACEA E A ESPÉCIE <i>ACHILLEA MILLEFOLIUM L.</i>	14
1.2	ÓLEO ESSENCIAL	16
1.3	COMPOSTOS FENÓLICOS	17
1.4	ALCAMIDAS	19
1.5	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	24
1.6	TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	25
1.7	INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE	25
1.8	MOTIVAÇÃO	27
1.9	OBJETIVOS	28
1.9.1	<i>Objetivo Geral</i>	28
1.9.2	<i>Objetivos Específicos</i>	28
2	DESENVOLVIMENTO	28
2.1	METODOLOGIA	28
2.1.1	<i>Etapas da pesquisa</i>	28
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.2.1	<i>Fitoquímica</i>	30
2.2.2	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	43
2.2.3	<i>Avaliação das propriedades ADMET</i>	47
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA ASTERACEA E A ESPÉCIE *ACHILLEA MILLEFOLIUM L.*

O uso de plantas medicinais é utilizado para o tratamento de muitas doenças e está relacionado à medicina popular de diversas partes do mundo (ARAÚJO; LENON, 2001). Diversas culturas utilizam o potencial terapêutico dos vegetais desde a pré-história e foram evoluindo ao decorrer dos anos (COUTINHO *et al.*, 2004). O uso medicinal das plantas é bastante tradicional no Brasil, onde o conhecimento sobre as diversas espécies de plantas, muitas das vezes, é o único recurso a ser utilizado pelas comunidades. Nas últimas décadas, o interesse mundial por produtos de origem natural tem aumentado, como em países europeus e nos Estados Unidos da América (EUA). A classe de medicamentos com origem a partir de plantas medicinais tem girado em torno de 20 bilhões de dólares anualmente (DUTRA *et al.*, 2016).

A família das Asteraceae é a maior família de angiospermas, com cerca de 30.000 a 40.000 espécies distribuídas entre 1.600-1.700 gêneros (NUNES; SANTOS; SIMÕES, 2022). Além disso, é conhecida por suas propriedades aromáticas, inseticidas, cosméticas e, principalmente, medicinais. São consideradas um dos grupos que obtiveram maior sucesso entre as plantas com flores e, por isso, vem sendo cada vez mais pesquisadas. Vale comentar que já foram evidenciados na literatura o potencial antioxidante de espécies da família Asteraceae e que possuem significativa atividade antioxidante, como as espécies *Baccharis dracunculifolia* e *Taraxacum officinale* (FABRI *et al.*, 2011).

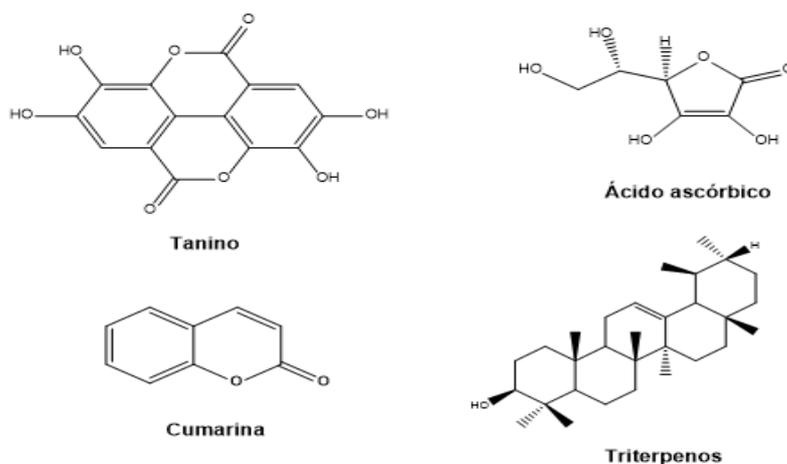
Achillea millefolium L. (Figura 1) é uma planta perene, nativa da Europa e do oeste da Ásia, pertencente à família Asteraceae. Atualmente, a espécie é distribuída por todo mundo, e no Brasil encontra-se principalmente nas regiões de Mata Atlântica, sendo conhecida popularmente como milefólio, mil-folhas e novalgina. (TORRES; CHÁVEZ 2001, REFLORA, 2019). O milefólio se desenvolve em ambientes quentes, úmidos e soalheiros como ao longo de estradas, encostas e nos campos. É composta por raízes finas e fibrosas, seu caule pode atingir uma altura de 30 a 60 centímetros e suas folhas costumam apresentar características aromáticas (CHANDLER; HOPPER; HARVERY, 1982).

Figura 1 - *Achillea millefolium*

Fonte: SOUSA, (2017)

Os principais constituintes químicos da *A. millefolium* são o óleo essencial, os alcalóides, os flavonoides, lactonas sesquiterpênicas, taninos, cumarinas, carotenóides, triterpenos e esteróis, ácido salicílico, alcanidas, ácido ascórbico, proteínas, resinas e carboidratos (LAKSHMI *et al*, 2011).

Figura 2 - Alguns constituintes presentes no óleo essencial.

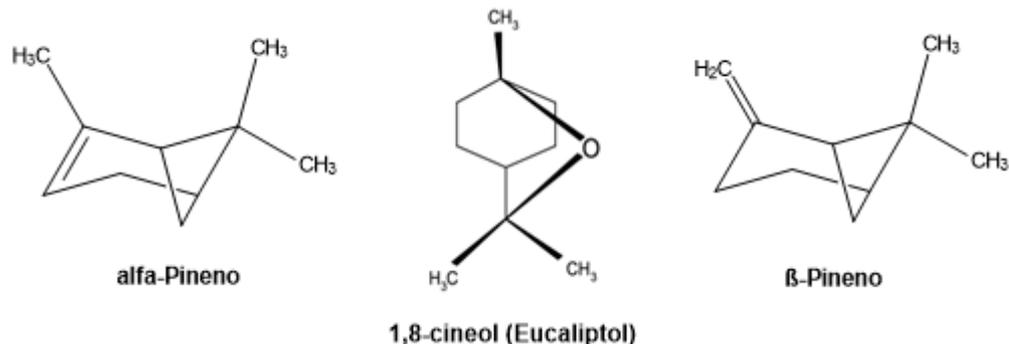


Fonte: O autor (2023)

A. millefolium é uma das plantas mais utilizadas no mundo há milênios, principalmente para o tratamento de feridas, problemas digestivos, infecções

respiratórias, problemas de pele, doença do fígado, dores e inflamações (APPLEQUIST; MOERMAN, 2011). De acordo com a Resolução (RDC) nº 10 de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a infusão das partes aéreas de *Achilleamillefolium* por via oral está indicada para falta de apetite, dispepsia, febre e cólica, sendo seu uso destinado tanto para adultos quanto para crianças. Além das indicações apontadas, o óleo essencial de *A. millefolium*, composto majoritariamente de monoterpenos, está relacionado a atividades antioxidantes, antimicrobiana e anti-inflamatória (BRASIL, 2010). Compostos fenólicos, como flavonoides, taninos e cumarinas já foram descritos nas partes aéreas de *A. millefolium* e relacionados a efeitos espasmolíticos, coleréticos, e também antioxidante e antimicrobiano (FABRI *et al.*, 2011). Atualmente, a busca por antioxidantes, de ocorrência natural para utilização em alimentos ou medicamentos, vem aumentando, com o objetivo de reduzir a utilização de antioxidantes sintéticos, podendo assim evitar efeitos indesejáveis, tais como carcinogenicidade.

Figura 3- Exemplos de monoterpenos presentes na Achilleamillefolium



Fonte: O autor (2023)

1.2 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais são caracterizados por serem constituídos de componentes voláteis, de menor densidade, insolúveis em água e que podem ser arrastados pelo vapor de água. O óleo essencial de *A. millefolium* é rico em azuleno, cânfora, monoterpenos e eucaliptol, entre outros componentes. Tem sido utilizada, sobretudo, como erva e na medicina homeopática para diversos fins, como, por exemplo: anti-inchaço, antitumoral, antibacteriana, anti-hipertensivo e cicatrizante (SALVAGNINI *et al.*, 2006). A sua composição é estudada a partir de amostras

extraídas de folhas e flores, sendo levado em consideração a localização geográfica e a estação do ano em que foi realizada a colheita (CHANDLER; HOOPER; HARVEY, 1982).

No trabalho realizado por Candan e colaboradores (2023) traz a informação que a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. millefolium* foi comparada com as respostas dadas por antioxidantes já conhecidos, como curcumina, ácido ascórbico e BHT. Descobriu-se que a atividade antioxidante apresentada por constituintes da *Achilleamillefolium* foram mais eficazes que o ácido ascórbico, além disso, foi observada forte capacidade do óleo essencial de atuar como doador de átomos de hidrogênios ou elétrons. A eficácia antioxidante apresentada por fontes naturais foi atribuída à presença de compostos fenólicos (HAYASE; KATOI, 1984).

Em estudos realizados por GORNI (2015), que buscavam avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. millefolium* a partir dos valores de IC50, que é a capacidade do agente antioxidante de sequestrar 50% dos radicais livres DPPH presentes na solução, sendo assim, quanto menor foi o valor de IC50, maior a atividade antioxidante apresentada pelo extrato. A partir das análises realizadas, foi identificado que nas concentrações de 0,50 e 1,00 mM, houve uma redução significativa, chegando a mais de 75% em relação ao IC50 das plantas controle.

Ambos os trabalhos demonstram o potencial existente no óleo essencial da planta, além de poder explorar diferentes extratos e diferentes concentrações. Os fenóis são considerados os principais compostos presentes com esse potencial antioxidante, entretanto, outros compostos podem atuar como sequestradores de radicais livres (BOHNERT; JENSEN, 1996).

1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

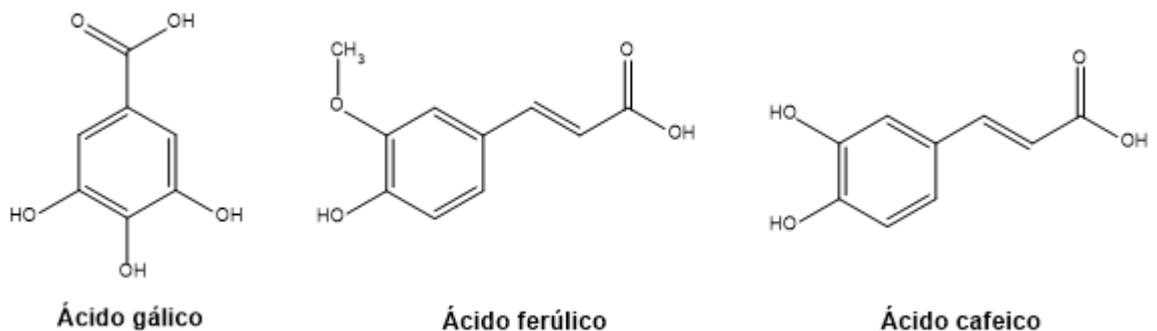
Os compostos fenólicos são substâncias que são encontradas em larga escala na natureza, sendo mais de 8000 compostos já descritos em diferentes espécies. Esses compostos agem como antioxidantes em reações de defesa das plantas contra agressões do meio ambiente. Apresentam em sua estrutura, grupos benzênicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas e sendo divididos em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos) (HERNÁNDEZ; PRIETO, 1999).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente por conta de sua atividade de óxido-redução, desempenhando um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singleto ou decompondo peróxidos (ANTUNES; CANHOS, 1984; BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; JIANG; WANG, 2001; FENNEMA, 1993). Este grupo de fitoquímicos pode ser dividido em vários subgrupos, entre eles flavonoides, ácidos fenólicos, taninos e lignanas (XU *et al.*, 2017).

Ao investigar a presença de ácidos fenólicos como constituinte da *A. millefolium*, foram encontrados ácido cafeico e ácido gálico no extrato etanólico de diferentes partes da planta. Ao serem investigados os extratos, foi observada atividade antioxidante significativa frente ao radical DPPH (MAZUTTI, *et al.*, 2016).

Além disso, existem diferentes ácidos fenólicos (Figura 4) distribuídos na natureza, sendo divididos em duas categorias: derivados do ácido benzóico, como o ácido gálico, e derivados do ácido cinâmico, incluindo o ácido cafeico e o ácido ferúlico. Os ácidos fenólicos são extremamente importantes, pois são capazes de combater os radicais livres, que são agentes do estresse oxidativo. O ácido gálico pode ser encontrado em sementes de uvas, o ácido cafeico está presente no café, maçãs e cerejas, e o ácido ferúlico é encontrado em grãos de cereais (SOARES, 2022).

Figura 4 - Ácidos fenólicos

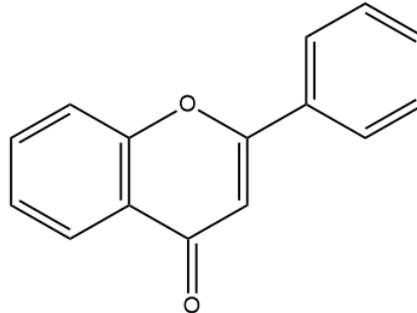


Fonte: ROBER, (2005); PERES, (2015); MAURICIO (2006).

Os flavonoides constituem um grupo que vem despertando grande interesse dos pesquisadores por conta de seu amplo espectro de atividades medicinais, demonstrando efeitos na saúde e sendo alvo para desenvolvimento de novas formas terapêuticas (BADSHAH *et.al.*, 2021). Os flavonoides (Figura 5) apresentam em sua forma estrutural com quinze átomos de carbono, formados por duas fenilas que

estão ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, originando um novo anel (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

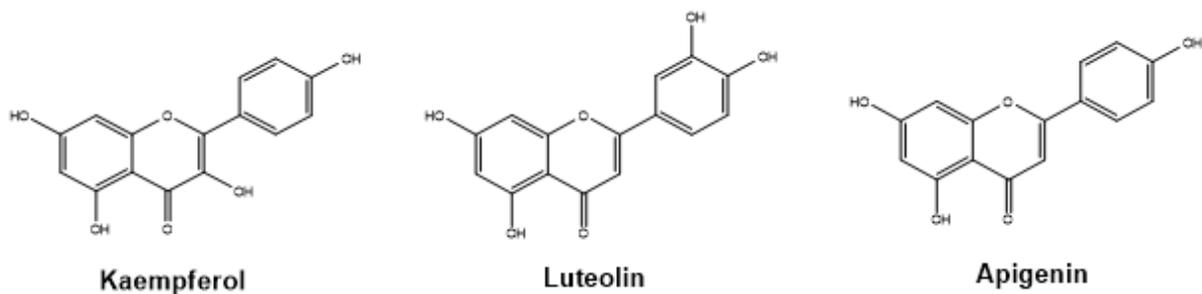
Figura 5 - Estrutura fundamental dos flavonoides



Fonte: DORNAS *et al.*, (2007)

Os flavonoides são amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, podendo apresentar variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas, sendo encontradas no café, maçã, uva cereja e vinho tinto (GRAHAM, 1992; VAN, 1996).

Figura 6 - Flavonoides encontrados em *A. millefolium*



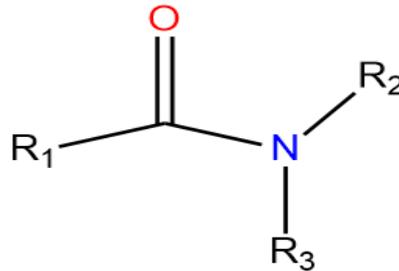
Fonte: KOČEVAR *et al.*, (2008)

1.4 ALCAMIDAS

As alcamidas (Figura 7), também chamadas de N-alquilamidas, são um grupo de metabólitos secundários encontrados em plantas pertencentes à família das Asteraceae, Piperaceae, Euphorbiceae e Poaceae. Essas substâncias são constituídas pela união de um ácido graxo, que pode conter de oito a dezoito

carbonos em sua cadeia, geralmente linear, ligado a uma amina de um determinado aminoácido descarboxilado. As alcanidas podem ser divididas em dois grupos: olefínicas, que apresentam apenas ligações duplas e acetilênicas, que apresenta pelo menos uma ligação tripla e possuem anéis homo ou heterocíclicos (BARBOSA, 2016).

Figura 7 - Estrutura básica das alcanidas

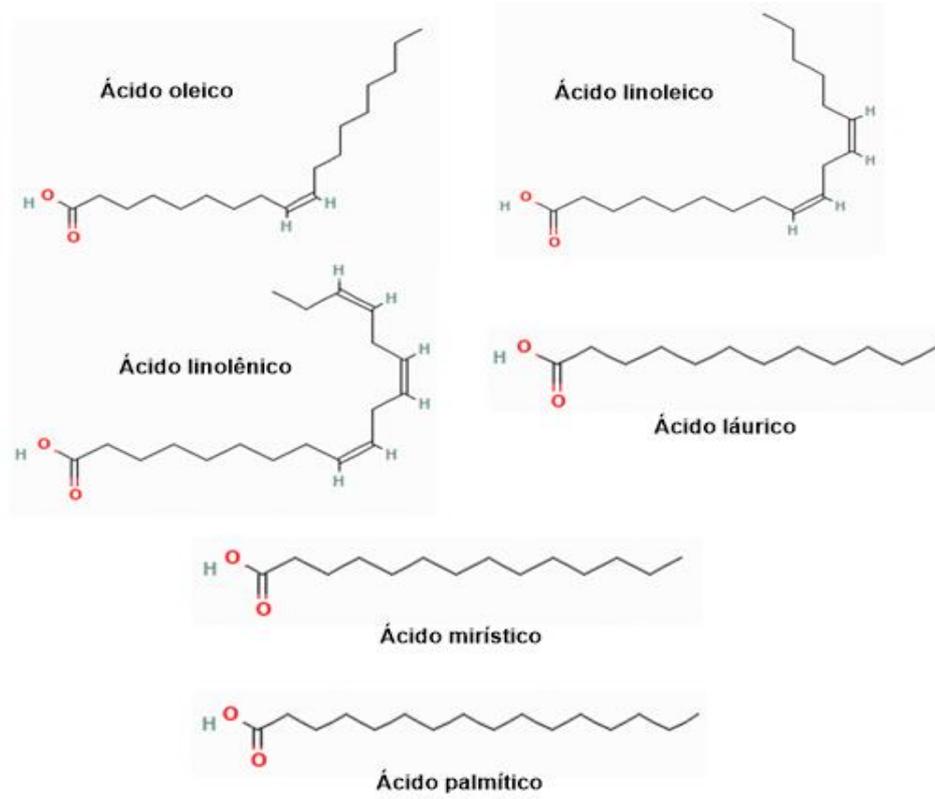


Fonte: GOMES, (2022)

De maneira geral, a origem biossintética das alcanidas consiste numa porção de ácido graxo e numa porção amina combinadas via uma ligação amida.

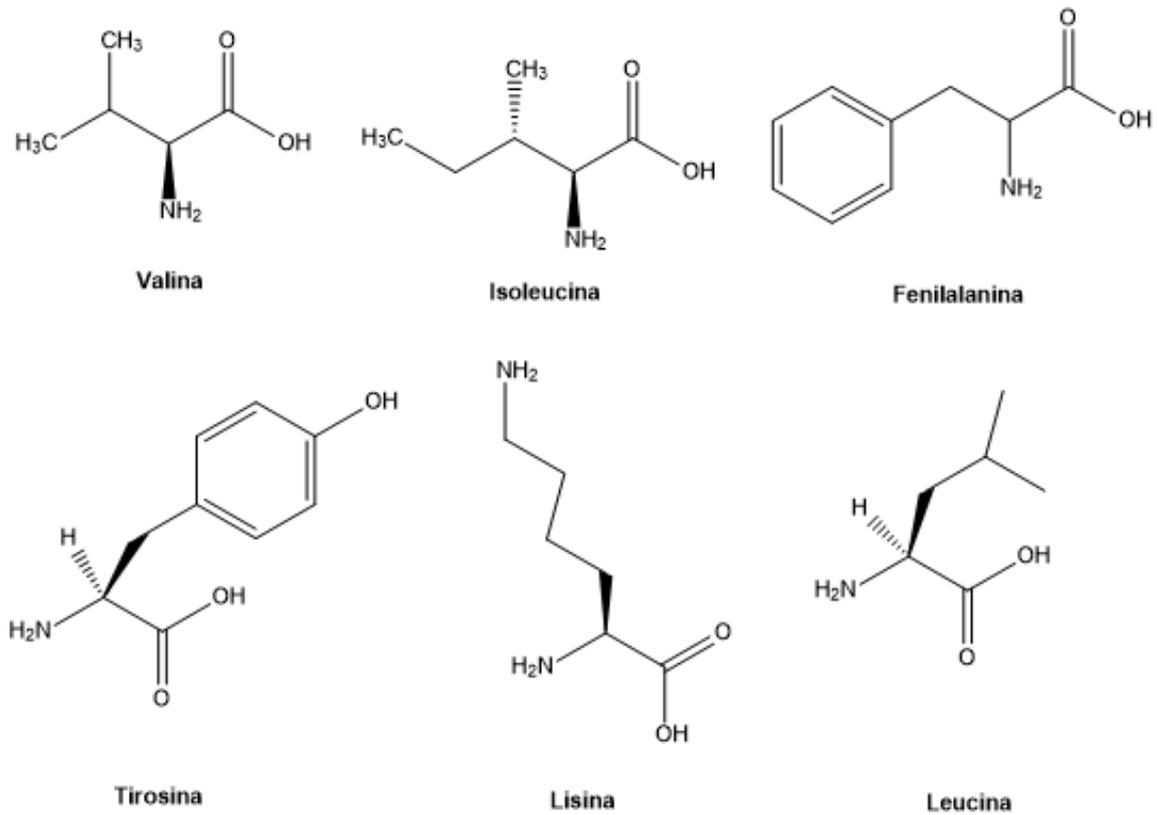
Os ácidos graxos precursores mais frequentes são oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3), sendo os ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) (Figura 8) comuns em N-aciletanolamidas. Desidrogenações e desidratações sucessivas, geralmente acompanhadas de isomerizações, levam ao surgimento das estruturas olefínicas e acetilênicas características de cada alcanida. E diferentes processos oxidativos contribuem para o encurtamento da cadeia e formação de epóxidos (GREGER, 1984). A porção amina é originada a partir de descarboxilação de diferentes aminoácidos. Valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina e leucina são precursores de isobutil-, metilbutil-, feniletil-, 4-hidroxifeniletil- e isopentilamina, respectivamente. Enquanto, as aminas piperidina e 2,3-desidro-piperidina surgem a partir de reações de ciclização e descarboxilação dos aminoácidos lisina ou cadaverina (Figura 10) (GREGER, 1984). A formação da amida ocorre via reação com catálise enzimática.

Figura 8 -Principais ácidos graxos precursores



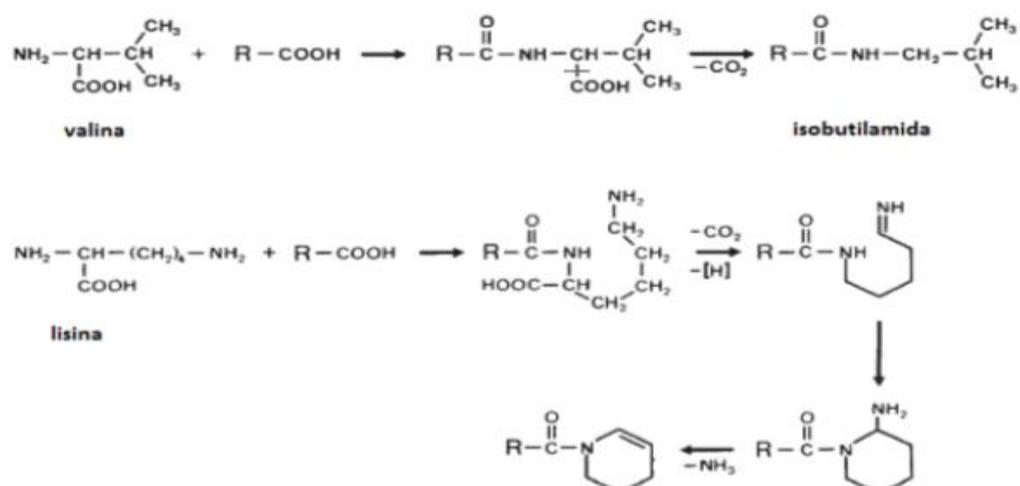
Fonte: Adaptado doPUBCHEM (2004)

Figura 9 - Aminoácidos que sofrem a descarboxilação



Fonte: Adaptado do PUBCHEM (2004)

Figura 10 - Aminoácidos valina e lisina como precursores de diferentes amidas

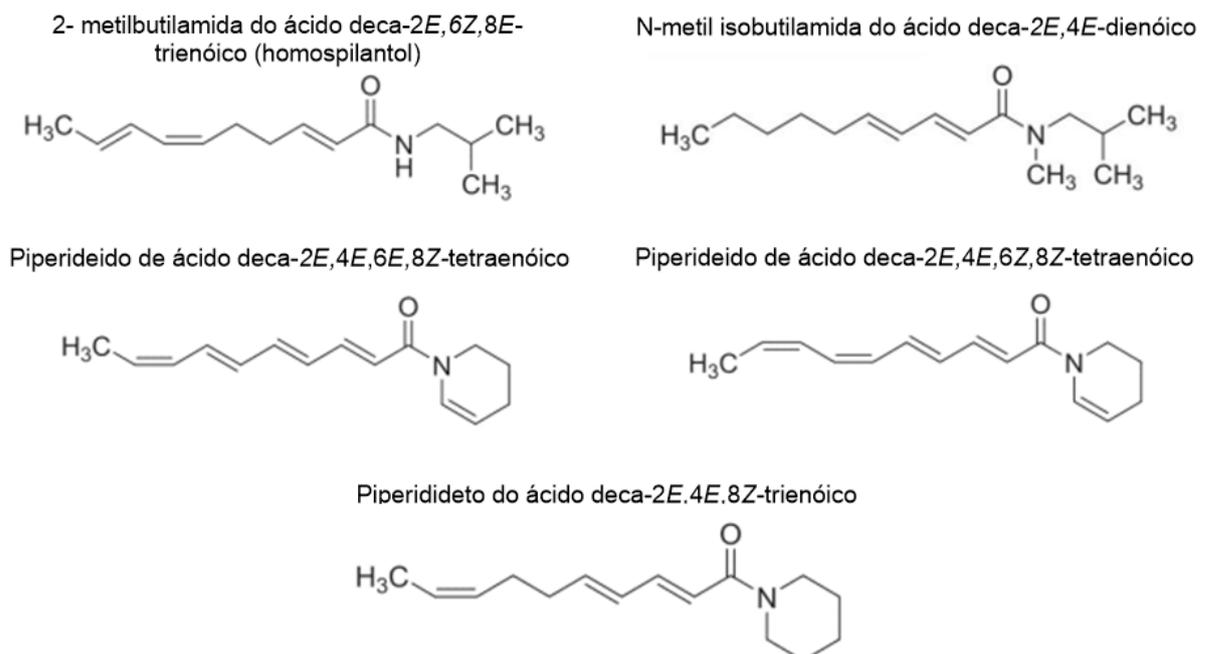


Fonte: Adaptado de GREGER, (1984)

Os estudos sobre as alcanidas vêm crescendo, pois as alcanidas alifáticas têm demonstrado sua eficácia no campo terapêutico (BOONEN *et al.*, 2012), como flavorizantes (LANGER; LONGIN; WÜRSCHUM, 2014), inseticidas e em cosméticos (ARTARIA *et al.*, 2011). Além disso, são compostos bioativos que apresentam ação antimicrobiana, larvicida, analgésica, canabinomimética e antiviral (TORRES; CHÁVEZ, 2001).

As alcanidas são encontradas nas raízes, nas folhas e flores de *Achilleamillefolium*. No trabalho realizado por Veryser e colaboradores (2017), foram investigadas a presença de N-alquilamidas nos extratos etanólicos de *Achillea* das suas raízes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência - ionização por eletrospray - espectrometria de massa. Foi observado o relato de diversas N-alquilamidas, como 2-metilbutilamida do ácido deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienóico (homospilantol) e N-metil isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico, sendo atribuídas pela primeira na literatura. Além desses compostos, foram observadas as presenças do piperideido de ácido deca-2*E*,4*E*,6*E*,8*Z*-tetraenóico, piperideido de ácido deca-2*E*,4*E*,6*Z*,8*Z*-tetraenóico e piperidideto do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (Figura 11) (VERYSER, 2017).

Figura 11 - N-alquilamidas encontradas no extrato etanólico de raízes de *A. millefolium*



Fonte: Adaptado de VERYSER, (2017)

1.5 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Compostos antioxidantes conseguem neutralizar radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os radicais livres são átomos ou moléculas que, por conta de seus elétrons desemparelhados, apresentam reatividade, sendo assim, podem oxidar compostos como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e lipídios, promovendo danos ao organismo e seus sistemas. Alguns exemplos são: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical oxigênio ($O^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), radical alcóxil (RO^{\cdot}), radical peróxil (ROO^{\cdot}), óxido nítrico (nitrogenmonoxide) (NO^{\cdot}) e nitrogendioxide (NO_2^{\cdot}) (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015). Quando os radicais livres se apresentam em excesso, ou seja, quando o organismo não é capaz de neutralizá-lo, desencadeia-se um estado de estresse oxidativo, o que causa sérios danos aos tecidos, doenças cardíacas, diabetes, catarata e câncer (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

As EROs e ERNs atuam no processo degenerativo e/ou patológico de doenças (HALLIWELL, 1989), como o câncer, doenças de Alzheimer, doenças coronarianas, aterosclerose, inflamação e no envelhecimento. Estudos científicos apontam que substâncias antioxidantes possuem o potencial de agir nos sistemas biológicos como forma de proteção contra possíveis danos oxidativos e na prevenção de danos causados pelas espécies reativas (EL-ACHKAR *et al.*, 2013). Além disso, os antioxidantes são muito empregados com o objetivo de aumentar a validade de produtos alimentícios. De acordo com a RDC nº 272 de 14 de março de 2019, reúne aditivos permitidos classificados como antioxidantes, possíveis de serem adicionados em aproximadamente 40 a 50 alimentos (BRASIL, 2019).

As fontes de radicais livres podem ser endógenas ou exógenas. As endógenas são a partir da respiração aeróbica, inflamações, enzimas do citocromo P450, entre outras. Já as formas exógenas são oriundas do ozônio, radiações gama, ultravioleta, alimentação, uso indevido e sem conhecimento de medicamentos e tabagismo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Considerando-se que inúmeras doenças crônico-degenerativas estão relacionadas ao estresse oxidativo causado pela superprodução de radicais livres, a ingestão de substâncias naturais antioxidantes, seja pela dieta ou por suplementação, figura como uma alternativa de prevenção e minimização dos danos causados pelos radicais livres, levando a uma melhora da qualidade de vida.

1.6 TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Entretanto, apesar de ser uma técnica considerada excelente, é necessário que seja utilizada outra técnica que possa confirmar a identidade química de um determinado constituinte. Dentre as técnicas utilizadas, a espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece informações estruturais (ALEXANDRE, 2016). Atualmente, é comum que já seja feito o acoplamento entre estas duas técnicas dando origem a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-EM). Há diversas formas de ionização, porém, o impacto ocasionado por elétrons é o mais utilizado na rotina, tendo em vista que é capaz de fornecer uma gama de íons que permitem a identificação e a investigação de substâncias em estudos.

O acoplamento LC-EM é baseado no impacto eletrônico à pressão atmosférica ocasionado por *Electrospray* (ESI), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica (APPI). Entretanto, o ESI permite a criação de íons na pressão atmosférica e é a forma de ionização mais utilizada no acoplamento LC-EM. Durante o processo, a amostra é dissolvida em um solvente que é pressurizado para que obtenha forma de aerossol. A partir dos efeitos da atração eletrostática os íons vão se direcionando ao espectrômetro de massas (LANÇAS, *et al.*, 2009). O ESI pode ser utilizado em modo positivo e negativo. É comum ser utilizado o ESI em modo negativo quando se deseja buscar compostos fenólicos e, o modo positivo, quando há indícios de compostos nitrogenados, como por exemplo, alcalóides e alcalamidas.

1.7 INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE

O desenvolvimento de novos fármacos envolve diversas etapas de avaliação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Os estudos farmacocinéticos abrangem os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Parâmetros de segurança e eficácia, necessários

para a aprovação dos candidatos a fármaco pelas agências regulatórias, podem ser identificados a partir de avaliação das propriedades ADMET. Estudos *in vitro* e *in vivo* são conduzidos para permitir que um desenvolvedor de medicamentos tome uma decisão definitiva sobre se um medicamento deve ser selecionado como candidato a medicamento e transferido para programas pré-clínicos e clínicos de estágio final. As propriedades da ADMET permitem que os desenvolvedores de medicamentos compreendam a segurança e a eficácia de um candidato a medicamento e são necessárias para a aprovação regulatória. No caso dos ensaios *in vitro*, são utilizadas enzimas, culturas de células, principalmente hepatócitos ou extração de frações microsomal do tecido hepático. Já nos ensaios *in vivo*, inicialmente são feitos em roedores (SANTOS, 2016)(fase pré-clínica) e, posteriormente, em humanos (fase clínica), podendo-se avaliar os fluidos corporais e as excretas dos animais em busca dos metabólitos. Apesar de ambos os métodos serem valiosos e úteis, eles apresentam elevado custo financeiro e demandam muito mais tempo. (HINSCHINCK; FERREIRA; PINHEIRO, 2022).

Os métodos *in silico* vem sendo cada vez mais empregados nos núcleos de pesquisa e nas indústrias farmacêuticas em seus programas de descoberta e desenvolvimento de fármacos, pois são métodos que conferem maior agilidade e menor custo. Além disso, os métodos *in silico* apresentam vantagens na pesquisa de fármacos, permitindo análises de estruturas químicas, avaliações das propriedades físico-químicas e das atividades biológicas dos compostos. Entretanto, dependendo do sistema adotado e analisado, é comum a falta de acurácia em relação aos valores experimentais obtidos. De modo geral, são métodos que podem ser baseados na estrutura da macromolécula alvo, geralmente enzimas do citocromo P450 ou na estrutura de ligantes, sendo capaz de auxiliar na avaliação do perfil farmacocinético e farmacodinâmico de moléculas promissoras (AL QARAGHULI; KUBIAK-OSSOWSKA; MULHERAN, 2018, PAUL; BHANJA; DAR, 2019). Sendo assim, utiliza-se ferramentas *in silico*, ou seja, por simulação computacional, permitindo a economia de tempo.

Análises *in silico* do metabolismo de fármacos, por exemplo, são pautadas em cálculos e avaliações realizadas por simulações computacionais, capazes de prever os sítios da estrutura que são mais propensos a sofrerem ação do metabolismo, os metabólitos gerados e a capacidade da molécula interagir com uma enzima metabolizadora alvo, atuando como inibidor ou substrato. Dentre as

plataformas gratuitas para previsão do metabolismo, podem ser citadas: SwissADME e vNN-ADMET.

O SwissADME é uma ferramenta gratuita que avalia a farmacocinética, as propriedades físico-químicas, a biodisponibilidade oral e a compatibilidade química medicinal de diferentes moléculas. O processo de desenvolvimento de fármacos envolve a avaliação de parâmetros como absorção, distribuição, metabolismo, excreção, possíveis interações e semelhança com determinadas drogas. Diante disso, o SwissADME é utilizado para reduzir as chances de erros relacionados às escolhas de candidatos selecionados para as fases clínicas, diminuindo gastos de tempo e financeiros durante o processo de pesquisa (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

O vNN-ADMET é uma plataforma que avalia rapidamente as propriedades mais relevantes de potenciais candidatos a fármacos, como citotoxicidade, mutagenicidade, cardiotoxicidade, interações medicamentosas, estabilidade microssomal e probabilidade de causar lesão hepática induzida por medicamentos. O método vNN-ADMET baseia-se na premissa de que compostos com estruturas semelhantes têm atividades semelhantes, sendo assim, utilizando critérios de similaridade predeterminados. Calcula-se a distância de similaridade entre moléculas de acordo com sua estrutura e usa um limite para definir um domínio de aplicabilidade (SCHYMAN, *et al.*, 2017).

É de suma importância que essa predição seja realizada no momento do planejamento de novos fármacos, tendo em vista que se uma substância atua como inibidora de algumas das isoformas de CYP's, pode resultar em baixa biodisponibilidade oral, ocasionada por uma metabolização pré sistêmica da substância. Além disso, pode ocasionar alteração na concentração plasmática de um fármaco coadministrado, que é metabolizado por alguma dessas isoformas, podendo levar a um aumento da concentração plasmática desse fármaco, aumento do seu tempo de meia-vida e, conseqüentemente, aumentar os efeitos tóxicos. Sendo assim, a predição desses fatores precocemente é importante para prevenir problemas de biodisponibilidade oral e possíveis interações medicamentosas.

1.8 MOTIVAÇÃO

Embora a espécie *Achillea millefolium* seja largamente utilizada na medicina popular, tenha uso preconizado pela Anvisa e vários trabalhos científicos acerca do potencial farmacológico de suas partes aéreas, não há estudos que demonstrem o envolvimento de extratos ou compostos isolados das raízes em atividades biológicas, tampouco avaliações *in silico*, o que nos despertou o interesse para investigação dos constituintes químicos presentes nas raízes da espécie e sua aplicação em ensaios *in vitro* e previsões *in silico*.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo Geral

Realizar a investigação fitoquímica das raízes de *Achillea millefolium*, avaliar seu potencial antioxidante e analisar suas propriedades ADMET.

1.9.2 Objetivos Específicos

- Obtenção do extrato hidroalcoólico (EtOH 70%) das raízes de *Achillea millefolium*.
- Extração líquido-líquido do extrato hidroalcoólico utilizando solventes orgânicos com um crescente grau de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila.
- Monitoramento do perfil químico da fração obtida em diclorometano por CLAE-ESI-EM.
- Avaliação da atividade antioxidante através do ensaio de sequestro do radical DPPH.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa experimental, que consiste na investigação fitoquímica das raízes de *Achillea millefolium* e avaliação do seu potencial antioxidante.

2.1.1 Etapas da pesquisa

Obtenção da *Achilleamillefolium*: A espécie vegetal foi fornecida pela empresa Vita Oliva Garden. A empresa fica localizada no município Maria da Fé, Minas Gerais. A exsicata foi depositada na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), sob o número 6894.

Obtenção do extrato bruto e das partições: 248,49 g das raízes de *Achilleamillefolium* foram previamente secas em estufas, trituradas, e conduzidas à extração em etanol:água (7/3, v/v) por maceração estática a frio durante 7 dias, sendo esse processo repetido de três a quatro vezes até atingir a saturação do material vegetal. Após essa etapa, o extrato foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotatório à pressão reduzida. Cerca de 50g do extrato seco de *A. millefolium* foi submetido à partição líquido-líquido com o objetivo de separar grupos de substâncias presentes no extrato bruto da espécie vegetal por diferença de solubilidade em solventes orgânicos com polaridades distintas. Foi utilizado um funil de separação para realizar o processo de extração líquido-líquido, além disso, foram utilizados os solventes em grau de polaridade crescentes: hexano, diclorometano e acetato de etila, restando o resíduo aquoso. As partições obtidas foram levadas ao evaporador rotatório e o resíduo aquoso foi liofilizado.

Análise cromatográfica do extrato bruto e das partições: O extrato bruto e as partições foram conduzidas a análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando uma mistura de hexano:acetato de etila (6:3, v/v) como sistema de eluição, e as cromatoplasmas reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico 5% e Dragendorff. A partição em diclorometano foi também conduzida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, com ionização branda por *electrospray* em modo positivo (CLAE-ESI-EM), com ionização branda em modo positivo e eluição em gradiente de 1% de ácido fórmico em H₂O (A) e acetonitrila (B), sendo t=0min: A: B – (80:20, v/v) e t=0-150min: AB (10:90, v/v), T=150-151 min: A: B (80:20, v/v) e t=151-166 min: A: B (80:20, v/v).

Avaliação da atividade antioxidante: O extrato bruto e as partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e resíduo aquoso foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante através do método de sequestro do radical DPPH. O procedimento foi realizado em microplacas de 96 poços e adaptado do trabalho de

(BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Para cada amostra foi preparada uma solução-mãe na concentração de 1mg/mL em metanol. A partir da solução-mãe, foram feitas diluições e obtidas soluções nas concentrações de 500, 100, 50, 25, 10 e 5 µg/mL. A solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,3mM em metanol. Em cada poço foram pipetadas 175 µL de cada amostra e 50 µL da solução de DPPH, em triplicata. O branco de cada concentração foi obtido a partir de 50 µL de etanol e 175 µL da solução da amostra teste. Um volume de 50 µL da solução de DPPH adicionado a 175 µL de metanol foi usado como controle. As reações ocorreram à temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida, foram feitas leituras de absorbância a 518 nm em aparelho de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

Análise *in silico* das propriedades ADMET: As propriedades físico-químicas, absorção, distribuição e biodisponibilidade oral e toxicidade dos compostos majoritários da partição em diclorometano do extrato das raízes foram avaliadas através das plataformas online SwissADME e vNN-ADMET. A plataforma Swiss ADME foi utilizada para avaliar as propriedades como LogP, LogS, absorção gastrointestinal, permeabilidade a barreira hematoencefálica, substrato da glicoproteína (Pg-p), violações da regra de Lipinski, biodisponibilidade oral e interações com CYPs. O potencial cardiotoxíco foi previsto na plataforma vNN-ADMET a partir do bloqueio do canal Herg.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Fitoquímica

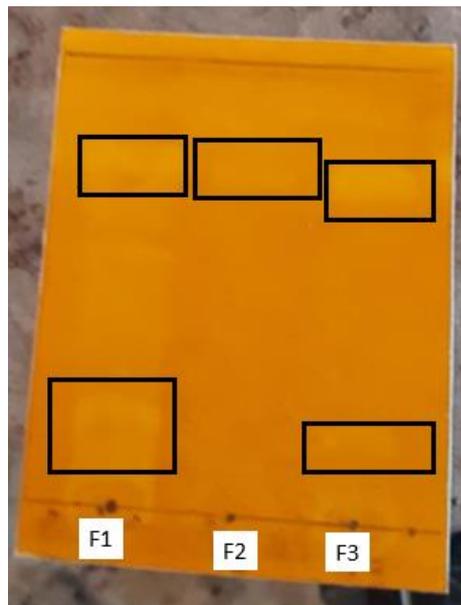
A partir da maceração estática a frio de 248,49g de raízes de *Achillea millefolium* em etanol: água (7/3, v/v), foi obtido um total de 70,0787g de extrato seco, chegando a um rendimento de 28,2%. O extrato seco foi levado para a partição líquido-líquido e gerou um rendimento de 0,2201g em hexano (0,44%), 0,6051g de partição em diclorometano (1,2%), 0,7507g em acetato de etila (1,5%).

Partindo para as análises das CCD, a primeira CCD, foi realizada com as partições de hexano (F1) e diclorometano (F2) e com o extrato das raízes (F3),

tendo como sistema de eluição hexano: acetato de etila (6:3, v/v) e como revelador o Dragendorff (Figura 12).

Foram observadas bandas bem definidas de coloração amarelada, o que é sugestivo da presença das alcaloides nas frações, já que o Dragendorff é um revelador utilizado para evidenciar possíveis compostos nitrogenados (WAGNER, 1996).

Figura 12- CCD das frações de hexano, diclorometano e extrato bruto, reveladas em dragendorff.



Fonte: O autor (2023).

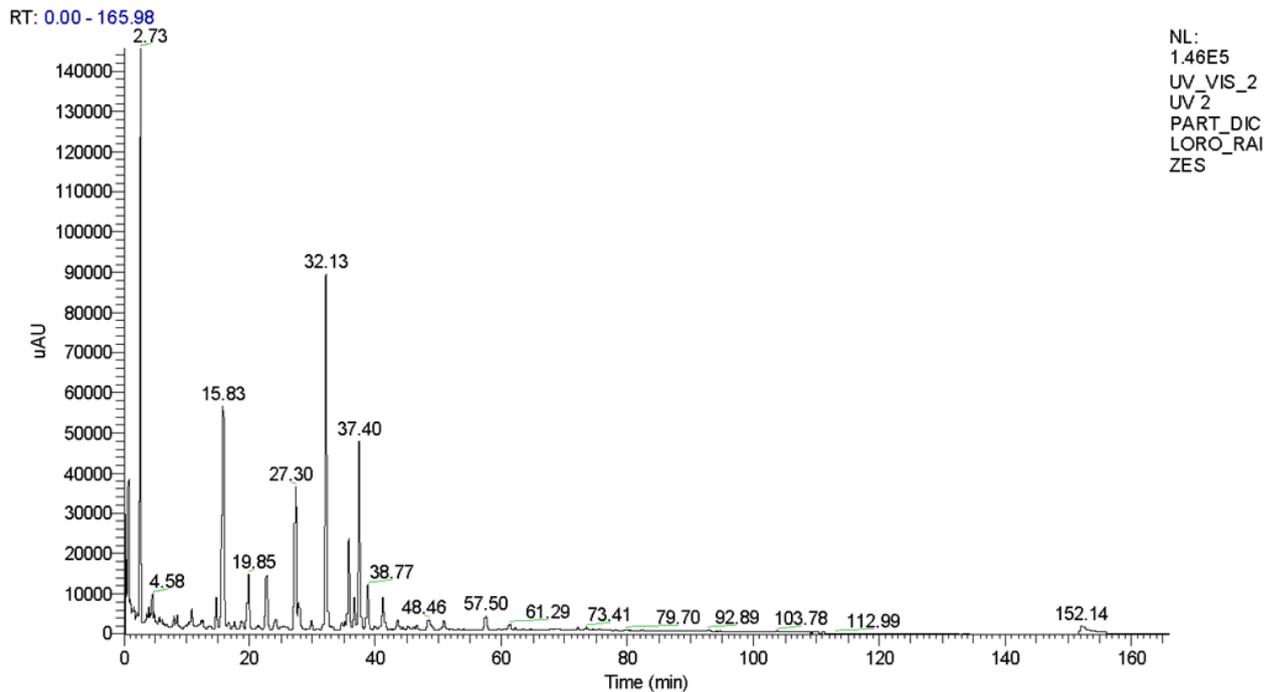
As placas também foram reveladas com o revelador anisaldeído sulfúrico 5% seguida de aquecimento e utilizando o sistema de eluição hexano: acetato de etila (6:3, v/v). Nessa análise, as frações apresentaram bandas bem definidas com coloração esverdeada, sendo mais concentrada na parte superior da cromatoplaça para a partição de hexano e mais concentrada na parte inferior para a fração diclorometano e para o extrato bruto.

Diante desses perfis, é possível inferir a presença de substâncias nitrogenadas nas partições em hexano, diclorometano e extrato bruto das raízes de *A. millefolium*, visto que o Dragendorff é um revelador que detecta compostos nitrogenados, como aminoácidos, amins, amidas, alcaloides e alcaloides. Acredita-se, que as bandas esverdeadas estão relacionadas à presença de nitrogênio, sendo mais um indicativo da presença de metabólitos nitrogenados.

A partição em diclorometano foi também conduzida à análise por CLAE acoplada à Espectrometria de Massas, com ionização branda por *electrospray* em modo positivo (CLAE-ESI-EM). O cromatograma obtido apresentou com boa resolução (Figura 13A), podendo ser observados picos majoritários cujos espectros de UV apresentaram bandas de absorção entre 262-268 nm (Figura 13B), característico de alcanidas (GREGER *et al.*, 1989).

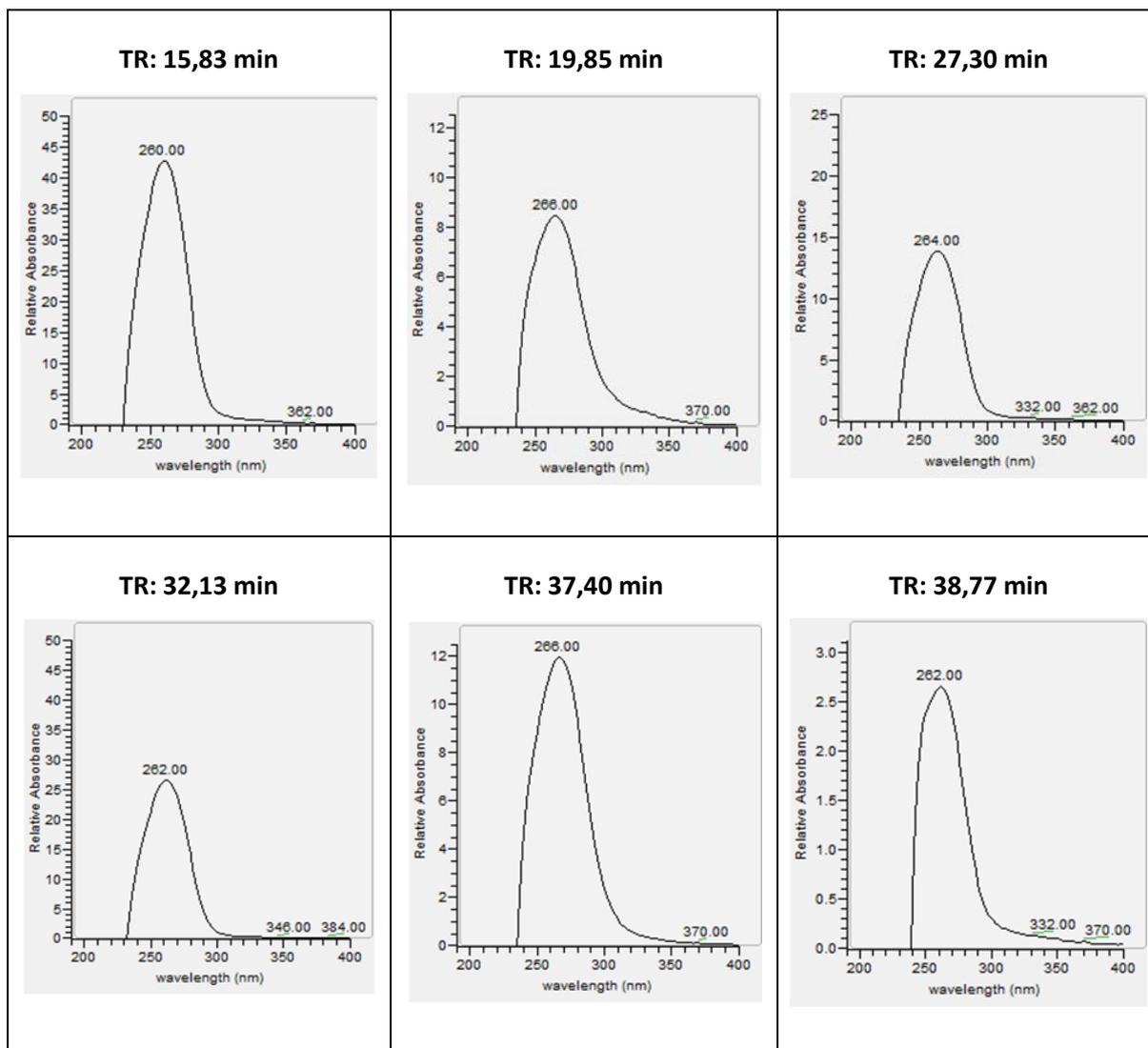
A

Figura 13- Cromatograma obtido por CLAE (A) e espectros de UV (B) referentes aos picos majoritários da partição em diclorometano das raízes de *Achillea millefolium*.



Fonte: O autor (2023)

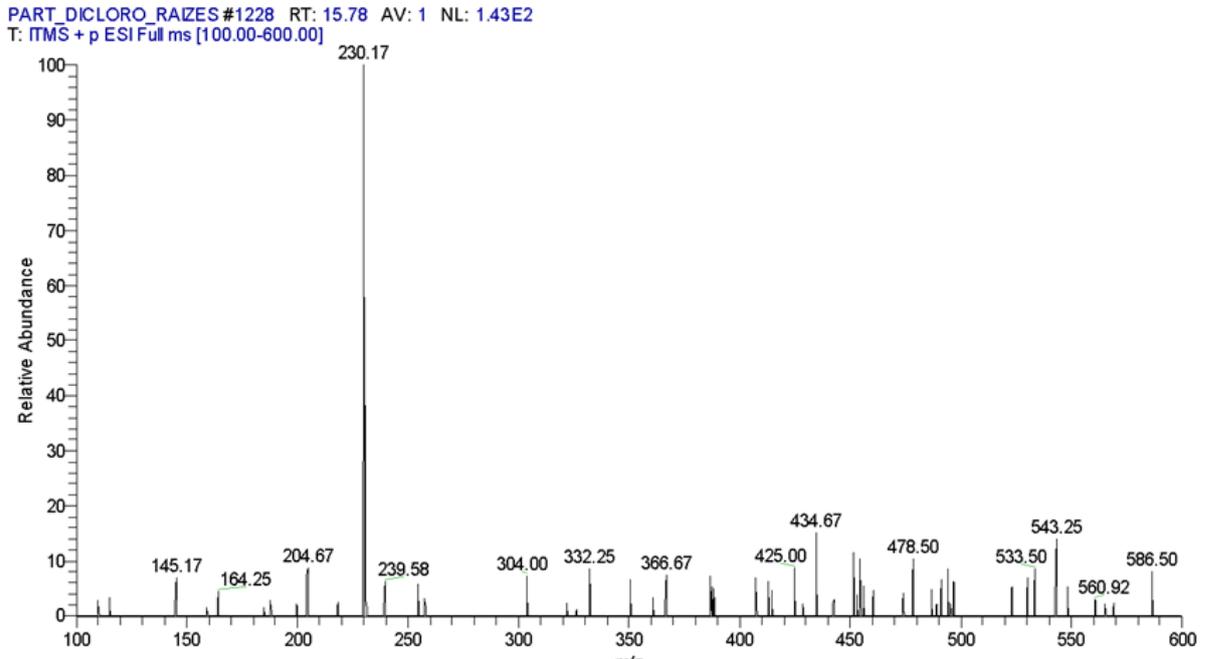
B



Fonte: O autor (2023)

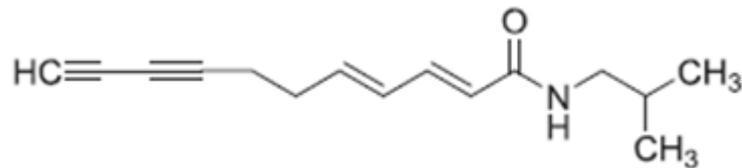
O espectro ESI-EM referente ao tempo de retenção de 15,83 minutos revelou um íon intenso $[M+H]^+$ 230,17 (Figura 14) e com banda de absorção de 260,00 nm. Considerando uma MM (massa molar) igual a 229 e fórmula molecular $C_{15}H_{19}NO$, é possível sugerir a estrutura da alcamida isobutilamida do ácido undeca-2*E*-4*E*-dieno-8,10-diinoico (Figura 15).

Figura 14 - Espectro de ESI/EM referente ao Isobutilamida do ácido deca-2E,4E-dieno -8,10-diinoico ([M+H] 230).



Fonte: O autor (2023)

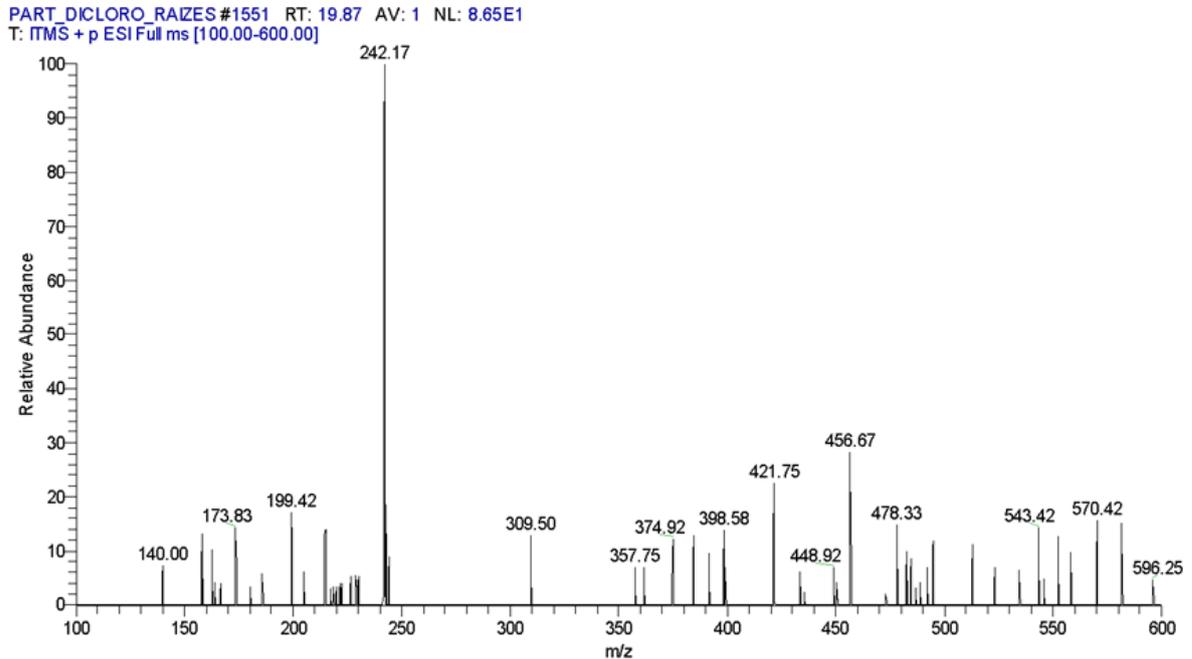
Figura 15 - alcamida isobutilamida do ácido undeca-2E-4E-dieno-8,10-diinoico.



Fonte: O autor (2023)

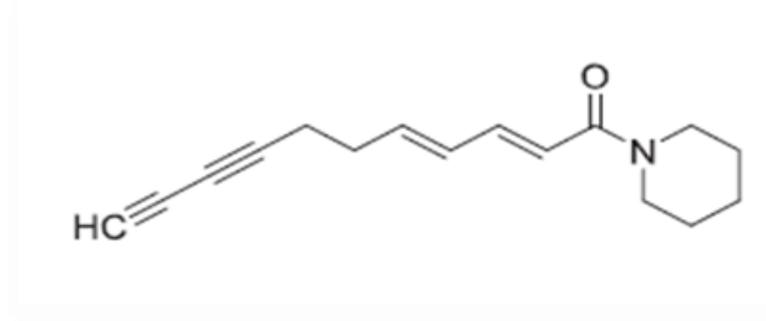
Para o tempo de retenção de 19,85 minutos, o espectro de ESI-EM revelou um íon intenso [M+H] 242,17 (Figura 16) e com banda de absorção de 266.00 nm. Considerando uma MM igual a 227,30 e fórmula molecular C₁₅H₁₇NO, é possível sugerir a estrutura da alcamida piperidinamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico (Figura 17).

Figura 16 - Espectro de ESI/EM referente ao piperidinamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico ([M+H] 242).



Fonte: O autor (2023)

Figura 17 - estrutura da alcamida piperidinamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico.

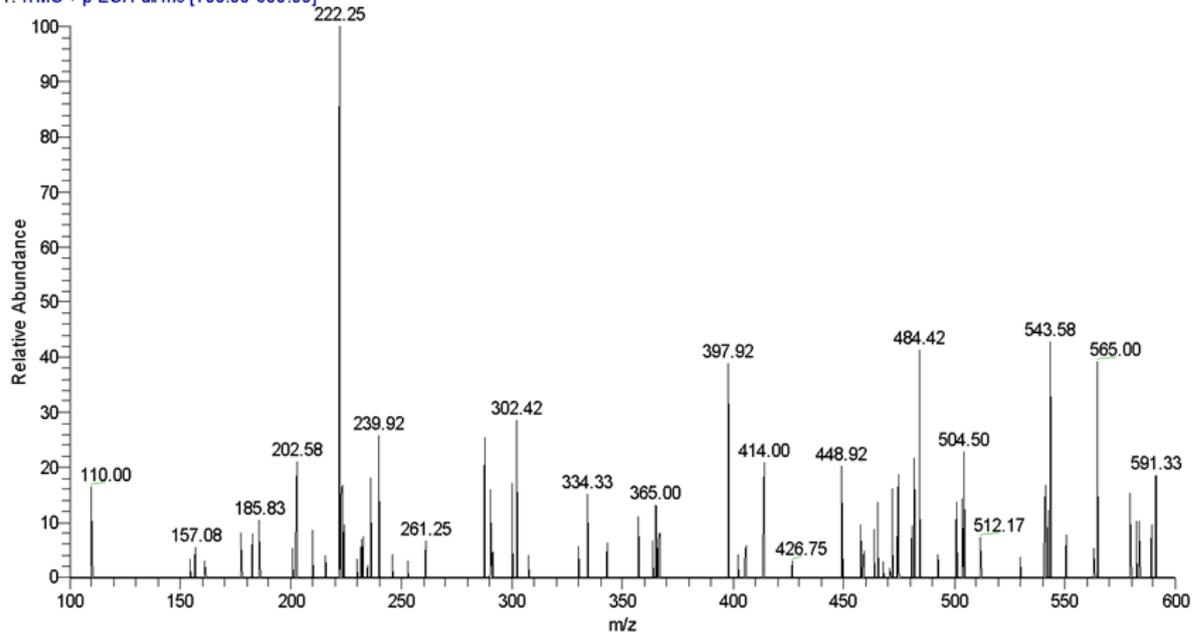


Fonte: O autor (2023)

O espectro referente ao tempo de retenção de 22,67 minutos revelou um íon intenso [M+H] 222,25 (Figura 18) e com banda de absorção de 264,00 nm. Considerando uma MM igual a 221,34 e fórmula molecular C₁₄H₂₃NO, é possível sugerir a estrutura da alcamida isobutilamida do ácido deca-2E,4E,8Z-trienoico (Figura 19).

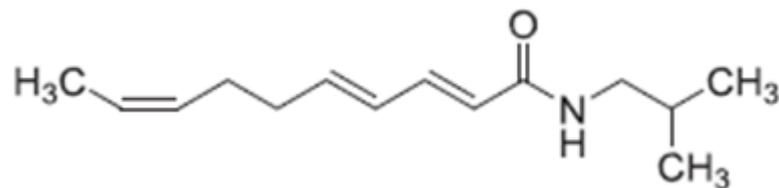
Figura 18 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido deca-2E,4E,8Z-trienoico ([M+H] 222).

PART_DICLORO_RAIZES #1766 RT: 22.67 AV: 1 NL: 6.77E1
T: ITMS + p ESI Full ms [100.00-600.00]



Fonte: O autor (2023)

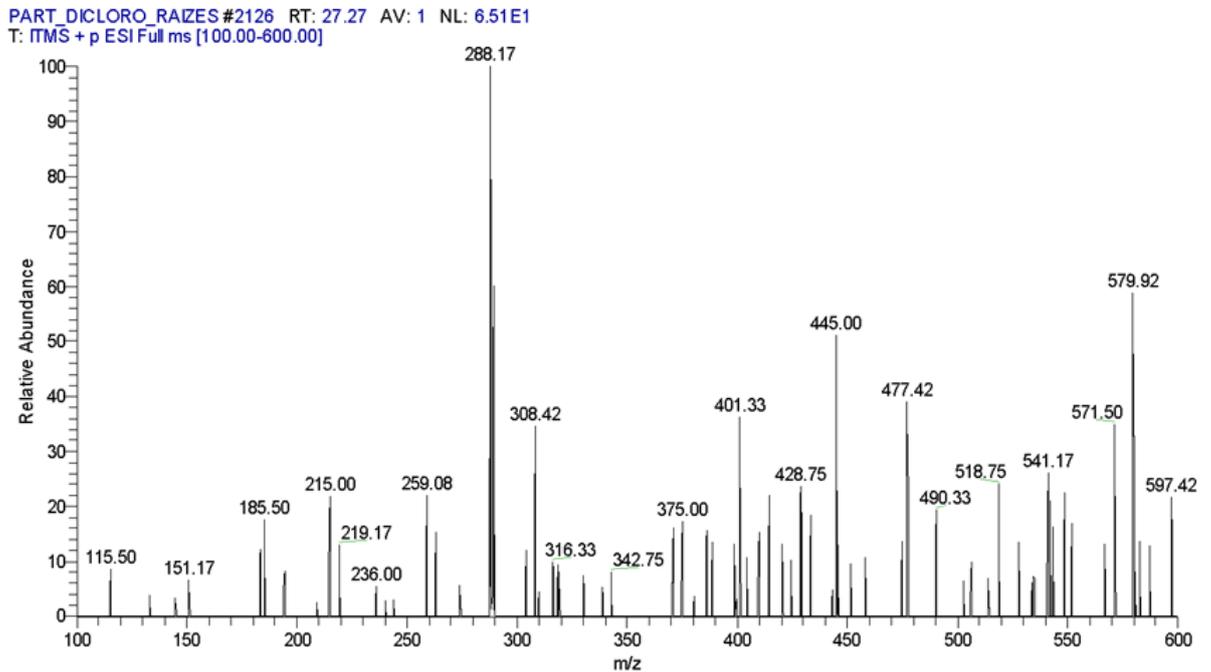
Figura 19 - Estrutura da alcamida isobutilamida do ácido deca-2E,4E,8Z-trienoico.



Fonte: O autor (2023)

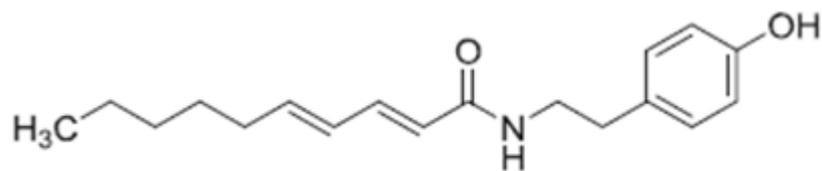
O espectro de ESI, referente ao tempo de retenção de 27,30 minutos, revelou um íon intenso [M+H] 288,17 (Figura 20) e com banda de absorção de 264,00 nm. Considerando uma MM igual a 287,40 e fórmula molecular C₁₈H₂₅NO₂, é possível sugerir a estrutura da alcamida tiramida do ácido deca-2E,4E-dieno-9,10-diônico (Figura 21).

Figura 20 - Espectro de ESI/EM referente ao tiramida do ácido deca-2E,4E-dieno-9,10-diionico ([M+H] 288)



Fonte: O autor (2023)

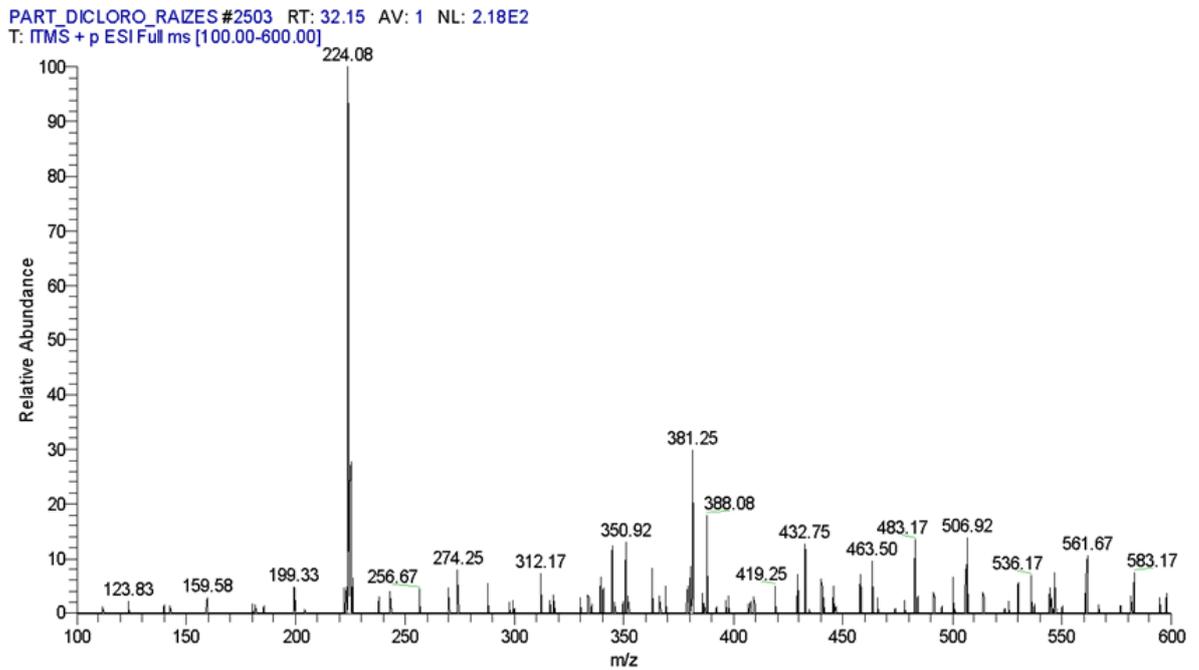
Figura 21 - estrutura da alcamida tiramida do ácido deca-2E,4E-dieno-9,10-diionico.



Fonte: O autor (2023)

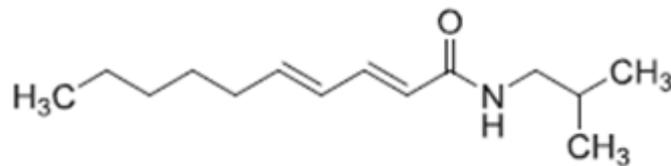
O espectro de massas referente ao tempo de retenção de 32,13 minutos revelou um íon intenso [M+H] 224,08 (Figura 22) e com banda de absorção de 264,00 nm. Considerando uma MM igual a 223,35 e fórmula molecular C₁₄H₂₅NO, é possível sugerir a estrutura da alcamidaisobutilamida do ácido deca-2E,4E-dienoico (pelitorina) (Figura 23).

Figura 22 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido deca-2E,4E-dienoico (pelitorina) ([M+H] 224).



Fonte: O autor (2023)

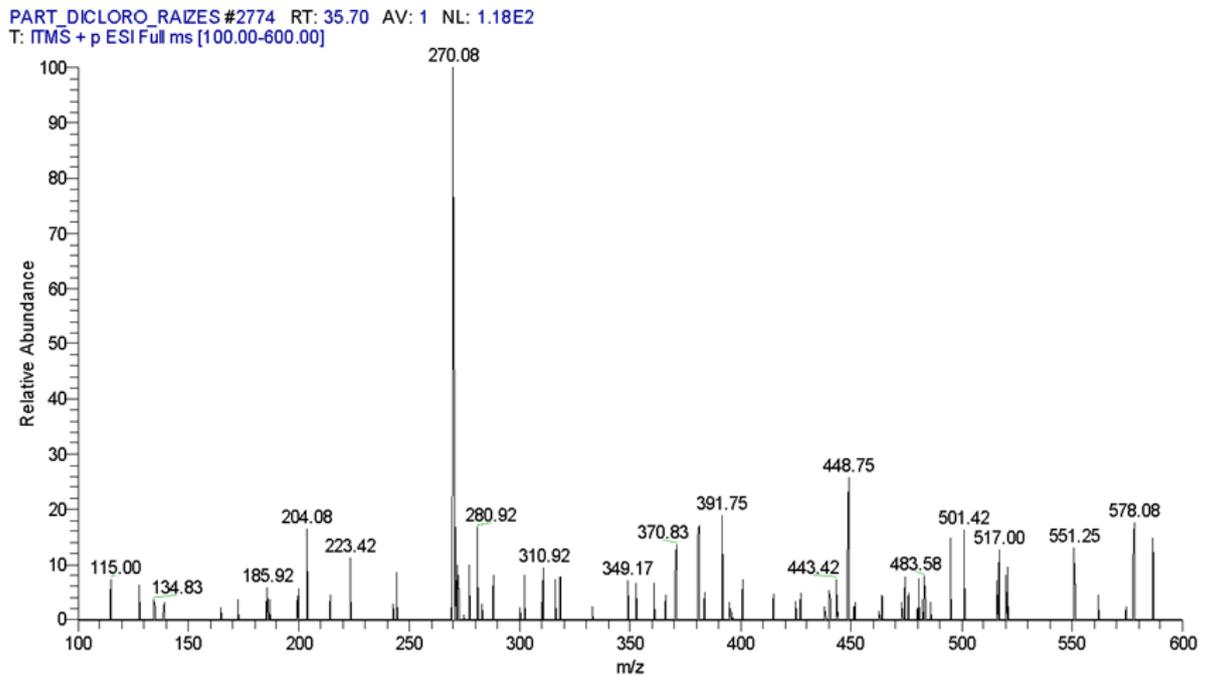
Figura 23 - Estrutura da alcamida Isobutilamida do ácido deca-2E,4E-dienoico (pelitorina).



Fonte: O autor (2023)

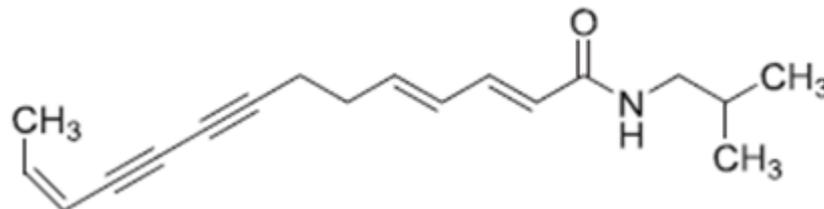
O espectro referente ao tempo de retenção de 35,75 minutos revelou um íon intenso [M+H] 270,08 (Figura 24) e com banda de absorção de 266,00 nm. Considerando uma MM igual a 269,38 e fórmula molecular C₁₈H₂₃NO, é possível sugerir a estrutura da alcamidaisobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E,12Z-trieno-8,10-diinoico (Figura 25).

Figura 24 - Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E,12Z-trieno-8,10-diinoico ([M+H] 270).



Fonte: O autor (2023)

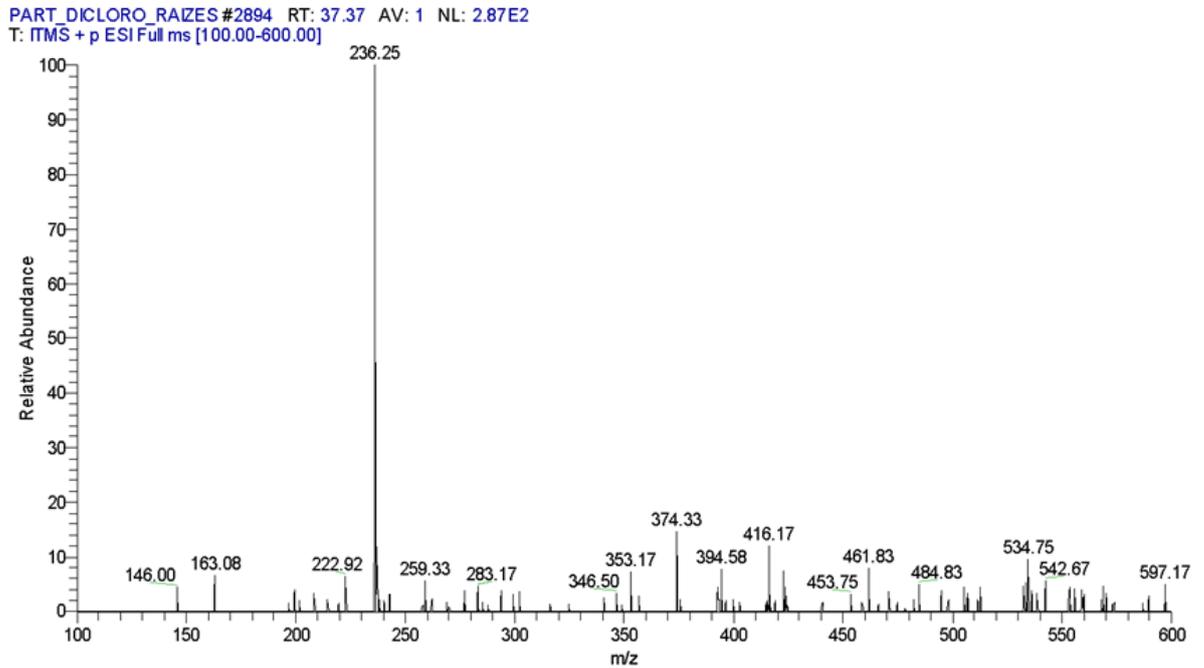
Figura 25 - Estrutura da alcanida isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E,12Z-trieno-8,10-diinoico.



Fonte: O autor (2023)

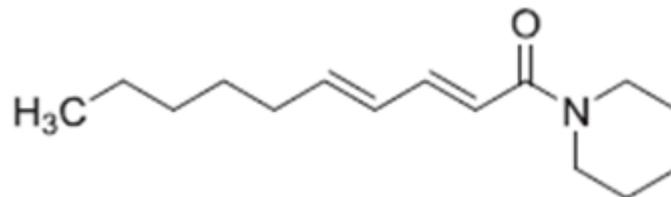
O espectro de massas referente ao tempo de retenção de 37,40 minutos revelou um íon intenso [M+H] 236,25 (Figura 26) e com banda de absorção de 262.00 nm. Considerando uma MM igual a 235,37 e fórmula molecular C₁₅H₂₅NO, é possível sugerir a estrutura da alcanidapiperidinamida do ácido deca-2E,4E-dienoico (Figura 27).

Figura 26 - Espectro de ESI/EM referente à piperidinamida do ácido deca-2E,4E-dienoico



Fonte: O autor (2023)

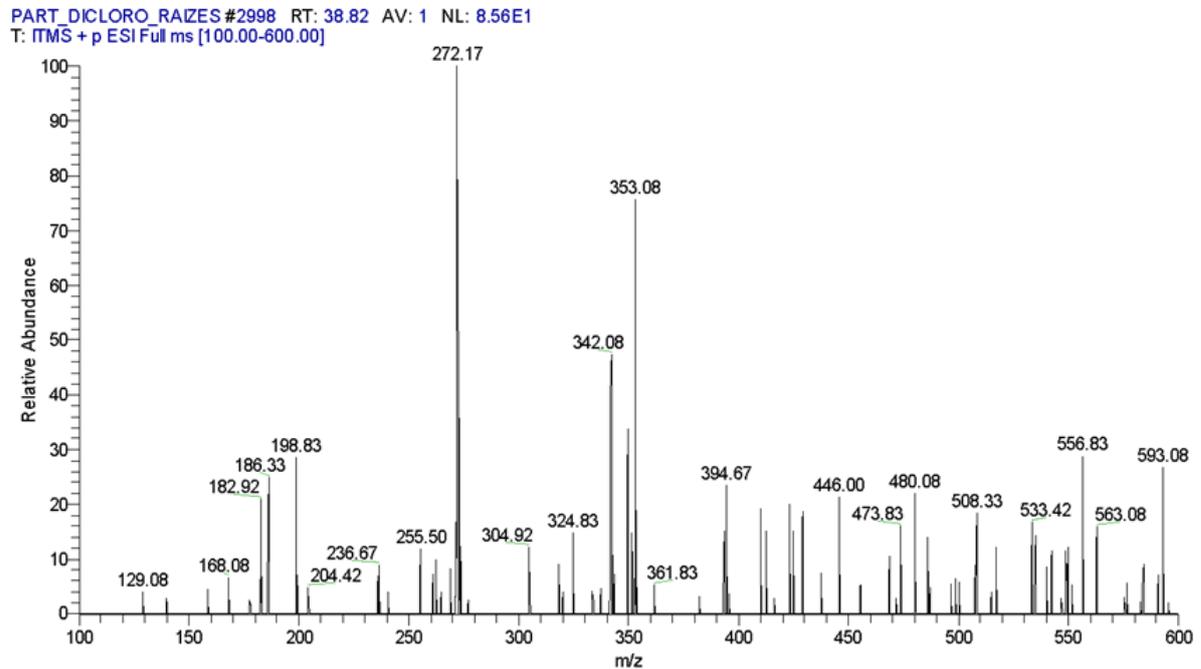
Figura 27 - Estrutura da alcanida piperidinamida do ácido deca-2E,4E-dienoico.



Fonte: O autor (2023)

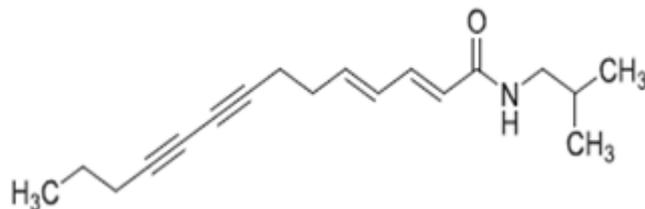
O espectro referente ao tempo de retenção de 38,77 minutos revelou um íon intenso $[M+H]^+$ 272,17 (Figura 28) e com banda de absorção de 262,00 nm. Considerando uma MM igual a 271,40 e fórmula molecular $C_{18}H_{25}NO$, é possível sugerir a estrutura da alcanidaisobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico (Figura 29).

Figura 28- Espectro de ESI/EM referente ao isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico ([M+H] 272).



Fonte: O autor (2023)

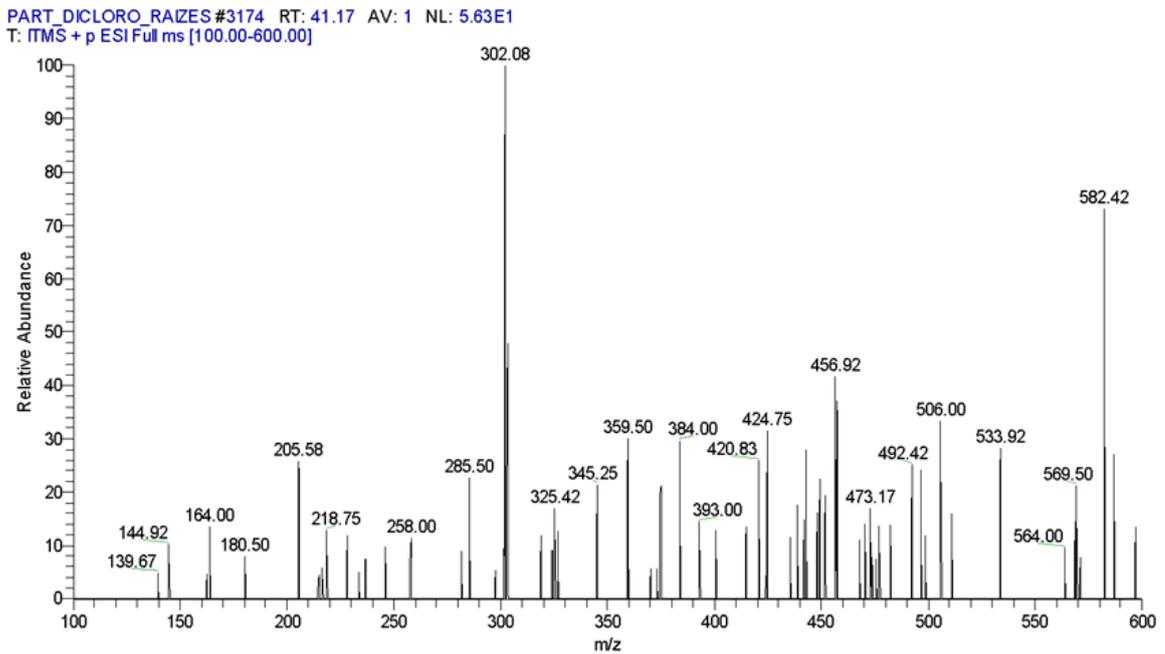
Figura 29- Estrutura da alcamida isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E-dieno-8,10-diinoico.



Fonte: O autor (2023)

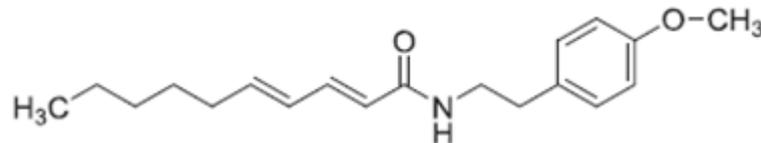
O espectro referente ao tempo de retenção de 41,18 minutos revelou um íon intenso [M+H] 302,08 (Figura 30) e com banda de absorção de 264,00 nm. Considerando uma MM igual a 301,42 e fórmula molecular C₁₉H₂₇NO₂, é possível sugerir a estrutura da alcamida feniletilamida do ácido 4-metóxi deca-2E,4E-dienoico (Figura 31).

Figura 30- Espectro de ESI/EM referente ao 4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2E,4E-dienoico ([M+H] 302).



Fonte: O autor (2023)

Figura 31 - Estrutura da alcamida 4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2E,4E-dienoico.

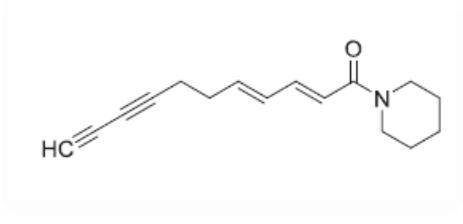
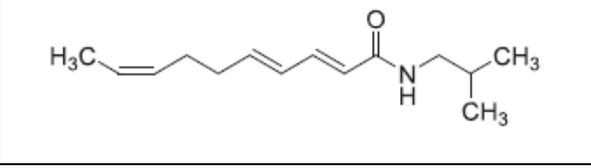
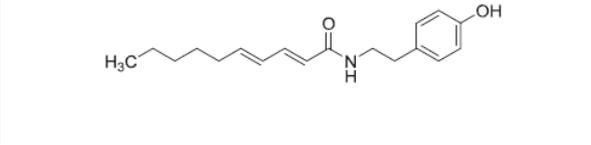
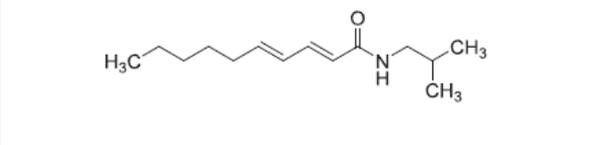
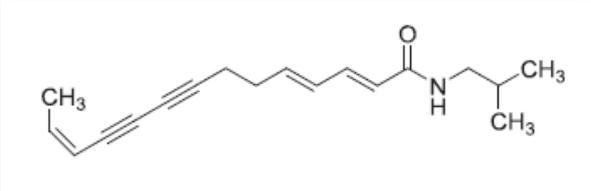
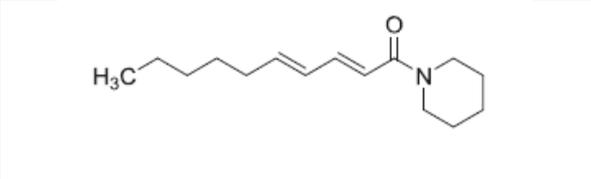
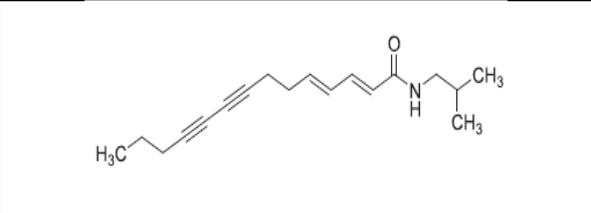
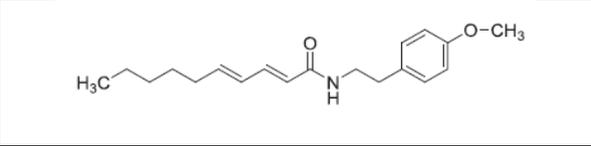


Fonte: O autor (2023)

Todas as alcamidas encontradas na partição em diclorometano das raízes de *A. millefolium* foram descritas por Veryseret *et. al.*, (2017) conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Alcamidas da partição em diclorometano identificadas por CLAE-ESI/EM.

[M+H]	Absorbância (nm)	Propostas Estruturais	Tempo de retenção (TR)	Moléculas
230.17	260.00		15,83 min	Isobutilamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diínico

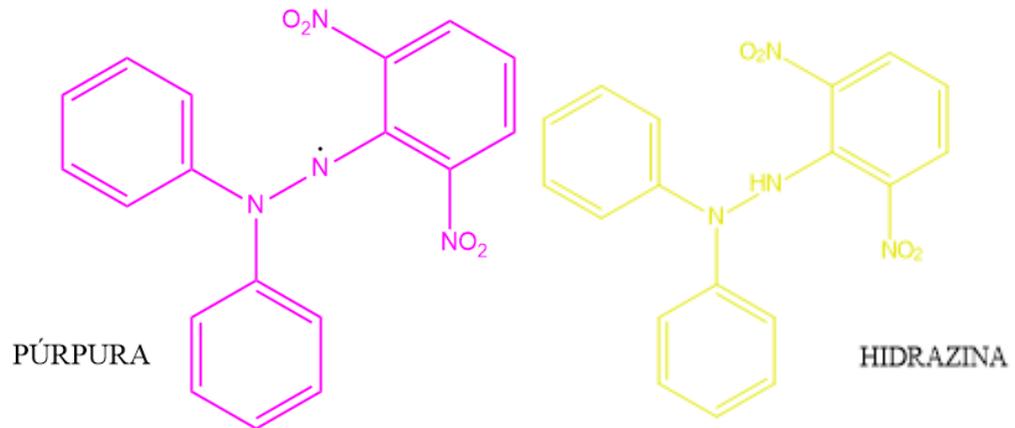
242.17	266.00		19,85 min	Piperidinamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico
222.25	264.00		22,67 min	Isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> -trienoico (8,9-desidropellitorina)
288.17	264.00		27,30 min	Tiramida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico
224.08	262.00		32,13 min	Isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico (pelitorina)
270.08	266.00		35,75 min	Isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -trieno-8,10-diinóico
236.25	266.00		37,40 min	Piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico
272.17	262.00		38,77 min	Isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico (anaciclina)
302.08	264.00		41,18 min	4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienoico

Fonte: O autor (2023)

2.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

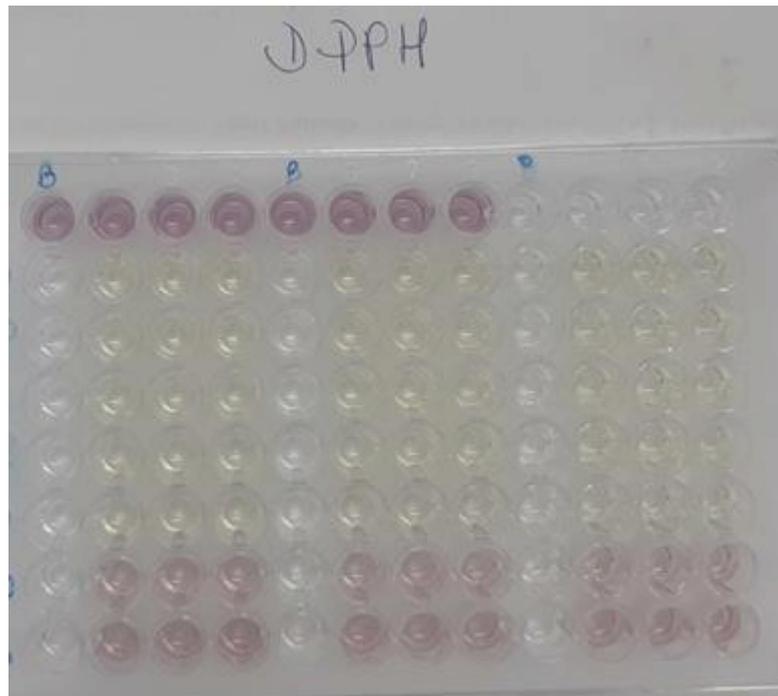
O extrato bruto e a partição em diclorometano foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre, que se baseia na redução do radical DPPH à hidrazina (Figura 32), ocorrendo uma mudança da coloração púrpura para amarelo, como podemos observar na placa (figura 33).

Figura 32- Reação de redução do DPPH (cor púrpura) à hidrazina (cor amarela).



Fonte: OLIVEIRA; OLIVEIRA, (2015)

Figura 33- Mudança na coloração após o DPPH ser reduzido à hidrazina.



Fonte: O autor (2023)

O extrato bruto apresentou um percentual de atividade antioxidante de 42.15% em 200 µg/mL, 89.39% na concentração de 500 µg/mL, entretanto nas demais concentrações não houve uma resposta significativa.

Na partição em diclorometano foram observados valores bastante satisfatórios, tendo apresentado percentuais de atividade antioxidante acima de 90% nas concentrações de 250 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, sendo estabelecida uma CE₅₀ de 6.9 µg/mL, que é a concentração eficaz capaz de inibir 50% da concentração inicial do radical DPPH.

Tabela 2: Atividade antioxidante.

Partição em diclorometano ([] µg/mL)	% Avaliação da Atividade Antioxidante (AAO)
250	92.32
200	91.96
100	91.92
50	90.15
25	50.94
5	39.00
CE50	6,9 µg/mL

Fonte: O autor (2023)

Comparando com a literatura, o extrato das partes aéreas de *Achillea millefolium* apresentou uma CE₅₀ de 45.60 µg/mL na avaliação do sequestro do radical DPPH (CANDAN *et al.* 2003), e com a quercetina (Figura 34), flavonoide utilizado como controle positivo, cuja CE₅₀ foi de 12.84 µg/mL (Tabela 3), o resultado sugere que a partição em diclorometano apresenta uma atividade antioxidante muito promissora

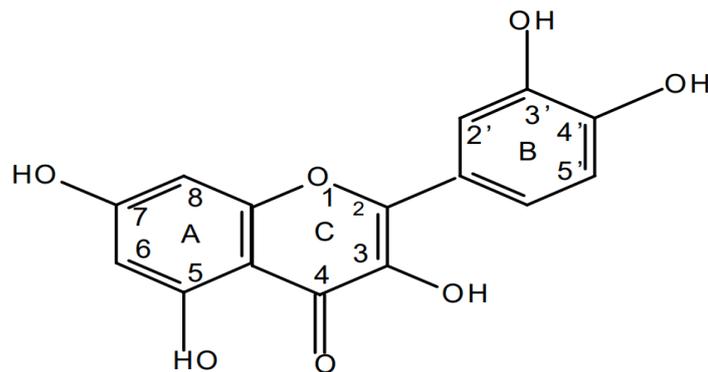
Tabela 3: Concentração da quercetina e seus valores de atividade antioxidante.

Quercetina ([] µg/mL)	% Avaliação da Atividade Antioxidante (AAO)
1	10,71
5	22,46

10	41,59
25	90,60
50	96,40
CE50	12,84 µg/MI

Fonte: O autor (2023)

Figura 34 - Estrutura do flavonoide quercetina.



Fonte: MAMEDE; PASTORE (2004).

Os possíveis danos ocasionados pela presença de radicais livres podem afetar diversas moléculas biológicas, dentre elas organelas e componentes celulares, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios da membrana celular, carboidratos, vitaminas e componentes do citosol. Evidências têm demonstrado que uma alimentação rica em antioxidantes pode reduzir os riscos. Vale comentar que o desequilíbrio de radicais livres no organismo é uma problemática, ou seja, o aumento excessivo de agentes antioxidantes ou a diminuição excessiva podem gerar estresse oxidativo (ALVES *et al.*, 2005). Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron ou pelo ganho de um elétron a partir de uma substância não radical. Podem ser formados também, a partir da fissão homolítica de uma ligação covalente. O excesso de radicais livres pode ser combatido por substâncias capazes de capturar esses radicais e estabilizá-los, como o tocoferol (Vitamina E), caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, principalmente os flavonoides e poliflavonóides (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; STRUTZEL *et al.*, 2007).

A indústria cosmética já explora a utilização de antioxidantes naturais em seus produtos cosméticos, como é o caso de cremes e géis, quando incorporados à

vitamina E. A vitamina E, é um potente antioxidante natural, pois atua como um antioxidante de lipídios insaturados doando elétrons diretamente para os radicais livres, estabilizando as membranas. Além disso, é capaz de retardar a formação de radicais livres e a oxidação de lipídios (OLIVEIRA, 2008; RIBEIRO, 2006).

Os fenóis apresentam em sua estrutura química anel benzênico com grupamentos hidroxilas associadas à sua estrutura cíclica. Esse grupo se divide em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples). Os flavonoides apresentam em sua estrutura química 2 anéis benzeno ligados por um grupo pirano, lhe conferindo ligações π alternadas, sendo capazes de estabilizar o radical pela deslocalização eletrônica. A quercetina é um flavonoide utilizado no controle positivo ao realizar a avaliação antioxidante de uma molécula. A quercetina possui a presença de quatro grupos hidroxilas e a ligação dupla presente no anel C entre o carbono 2 e o carbono 3, lhe proporcionando uma boa atividade antioxidante, pois consegue estabilizar o radical (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Diante dos resultados apresentados e das características estruturais das alcanidas, é possível dizer que os resultados da avaliação da atividade antioxidante foram satisfatórios e promissores, e seu potencial pode estar relacionado à presença de cadeias olefínicas e acetilênicas com ligações π alternadas, sendo extremamente importantes para estabilizar o radical pela deslocalização eletrônica. É importante ressaltar que, não foram encontrados estudos que relatam o potencial antioxidante de alcanidas presentes na *Achillea millefolium*. Sendo assim, se torna uma investigação de suma importância, já que moléculas antioxidantes são capazes de exercer inúmeros benefícios à saúde, como analgesia, ação antiinflamatória, prevenção contra determinados tipos de câncer, doenças de pele, úlceras gástricas e propriedades antienvhecimento (STRINGHETA *et. al*, 2009).

2.2.3 Avaliação das propriedades ADMET

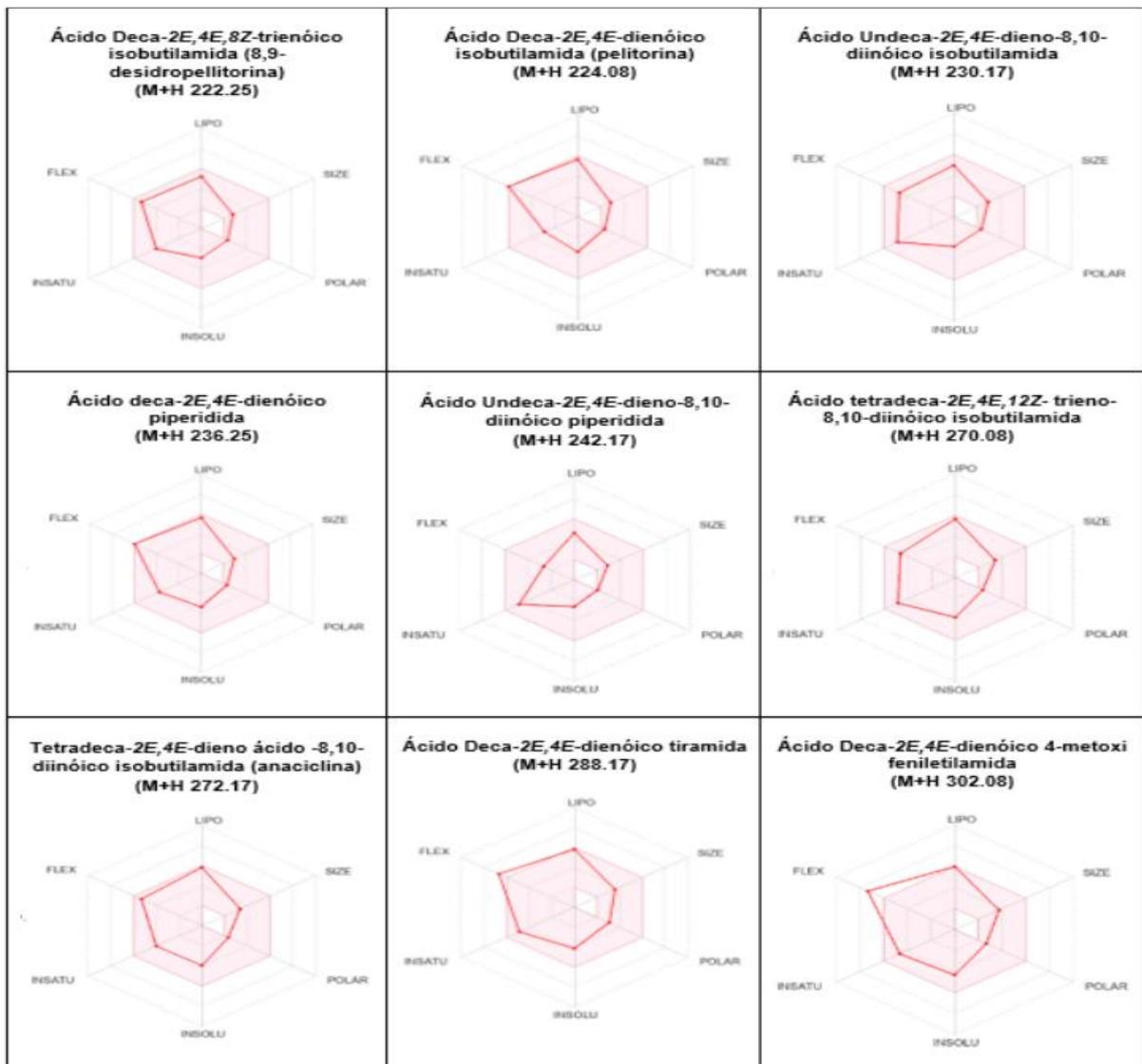
Foram utilizadas como ferramentas o SwissADME e VNN-ADMET para realizar as avaliações das características físico-químicas, farmacocinéticas e toxicidade. A plataforma SwissADME foi utilizada para avaliar as propriedades como Log P, Log S, absorção gastrointestinal, permeabilidade a barreira hematoencefálica, substrato da glicoproteína, regra de Lipinski, biodisponibilidade oral e possíveis interações com CYPs, conferindo um conjunto de preditivos rápidos, porém, robustos para identificar os melhores candidatos a se tornarem um fármaco

eficaz e seguro para os pacientes. Os resultados das análises realizadas no SwissADME estão descritos na Tabela 4. Na partir da plataforma vNN-ADMET foram avaliados os parâmetros de estabilidade microssomal, lesão hepática induzida (DILI - Drug delivery injury), citotoxicidade frente a células HepG2, bloqueio do canal hERG, verificando a possibilidade de cardiotoxicidade, teste AMES para a detecção de mutagenicidade (SCHYMAN *et.al*, 2017).

Uma das maneiras de avaliar a biodisponibilidade oral de uma determinada molécula, é a partir do Radar de biodisponibilidade que é gerado pela plataforma do SwissADME. A plataforma leva em consideração seis propriedades físico-químicas, sendo: lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. Cada propriedade físico-química foi localizada em cada eixo de um gráfico em forma de um hexágono regular, sendo a área desse polígono representada pela cor rosa. A área rosa representa a faixa ideal para cada propriedade, sendo assim, para uma avaliação da biodisponibilidade oral é importante que a molécula esteja dentro da área de coloração rosa, para que seja considerada semelhante a um fármaco.

Cada molécula gerou um gráfico de acordo com suas características físico-químicas e com sua similaridade estrutural identificada pela base de dados da plataforma SwissADME. A partir dos gráficos gerados, foi possível observar que a molécula da tiramida do ácido Deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metoxi feniletilamida do ácido Deca-2*E*,4*E*-dienóico 4-metoxi feniletilamida extrapolaram os limites gerados pelo gráfico, principalmente em direção ao eixo relacionado ao parâmetro de flexibilidade. Isso se deve ao fato dessas moléculas terem ultrapassado o número de 9 ligações rotacionáveis. As demais moléculas se apresentaram de acordo com os diferentes parâmetros, como pode ser visto na figura 35.

Figura 35- Radar de Biodisponibilidade da plataforma SwissADME.



Fonte: O autor (2023)

O coeficiente de partição óleo-água, expresso pelo Log P, está relacionado com a característica lipofílica do fármaco ou candidato, ou seja, a afinidade do composto por gordura em relação à água, sendo uma importante propriedade para a avaliação da solubilidade, absorção, capacidade de penetração na membrana, ligação às proteínas plasmáticas, distribuição e penetração dos tecidos (LOURENÇO *et al.*, 2013). Vale comentar que compostos que apresentam maior interação pela fase orgânica apresentam maior permeabilidade pelas membranas hidrofóbicas e melhor biodisponibilidade, entretanto, o cenário ideal é que exista um equilíbrio entre a hidrossolubilidade e a lipossolubilidade para uma maior biodisponibilidade oral. Estudos consideram que para uma boa biodisponibilidade

oral, é necessário que o valor de Log P se encontre entre -0,7 e +5,0 (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Com base nas análises realizadas, foi observado que todas as moléculas identificadas na partição em diclorometano apresentaram valores de Log P dentro da faixa desejada (Tabela 4).

Ao avaliar o perfil de solubilidade em água das moléculas, leva-se em consideração o parâmetro de Log S. O Log S está diretamente relacionado à solubilidade em água do composto e é definido como unidade de solubilidade comum correspondente ao logaritmo de base 10 da solubilidade de uma molécula medida em mol/L. A escala de Log S é representada em insolúvel, pouco solúvel, solúvel, muito solúvel e altamente solúvel em água, sendo considerada as seguintes faixas: insolúvel < -10 < pouco < -6 < moderadamente < -4 < solúvel < -2 < muito < 0 < altamente solúvel em água, permitindo realizar uma previsão do grau de solubilidade de cada molécula. Diante disso, segundo os dados oferecidos pelo SwissADME, foi que as moléculas isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (8,9- desidropellitorina), isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pelitorina), isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico, piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico, piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*,12*Z*-trieno-8,10-diinóico e isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico (anaciclina), apresentam uma característica solúvel e, a tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico apresentam uma característica moderadamente solúvel, devido à presença da fenila, que proporciona maior lipofilia à molécula, conforme demonstrado na Tabela 4.

A partir dos cálculos de Log P e Log S é possível fazer a previsão da absorção gastrointestinal da molécula, parâmetro crucial para determinação da biodisponibilidade e eficácia de medicamentos administrados por via oral (VERTZONI *et.al*, 2005).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura que tem a função de regular a passagem de substâncias entre o sangue o sistema nervoso central (SNC) do ser vivo, barrando a entrada de substâncias tóxicas. A avaliação da permeabilidade na BHE é um parâmetro essencial, pois a passagem de substâncias tóxicas pela BHE pode acarretar sua disfunção e ocasionar efeitos indesejáveis no SNC (FERREIRA, 2018). Entretanto, se o alvo que se deseja atingir é central, é

importante que os candidatos sejam capazes de ultrapassar BHE para uma resposta significativa.

Estudos já demonstram que as alcanidas são capazes de ultrapassar a BHE e atingir o SNC. As alcanidas vêm sendo investigadas quanto a sua afinidade por receptores endocanabinóides tipo 1 e tipo 2 (CB1 e CB2), principalmente as alcanidas do gênero *Echinacea* (WOELKART *et al.*, 2005; RADUNER *et al.*, 2006). Isso se deve a sua similaridade estrutural com a anandamida, que atua na manutenção da sinalização basal do Sistema Endocanabinoide, sendo capaz de se ligar tanto ao receptor CB1 quanto ao CB2 (BARRIE; MANOLIOS, 2017; WOODHAMS *et al.*, 2015).

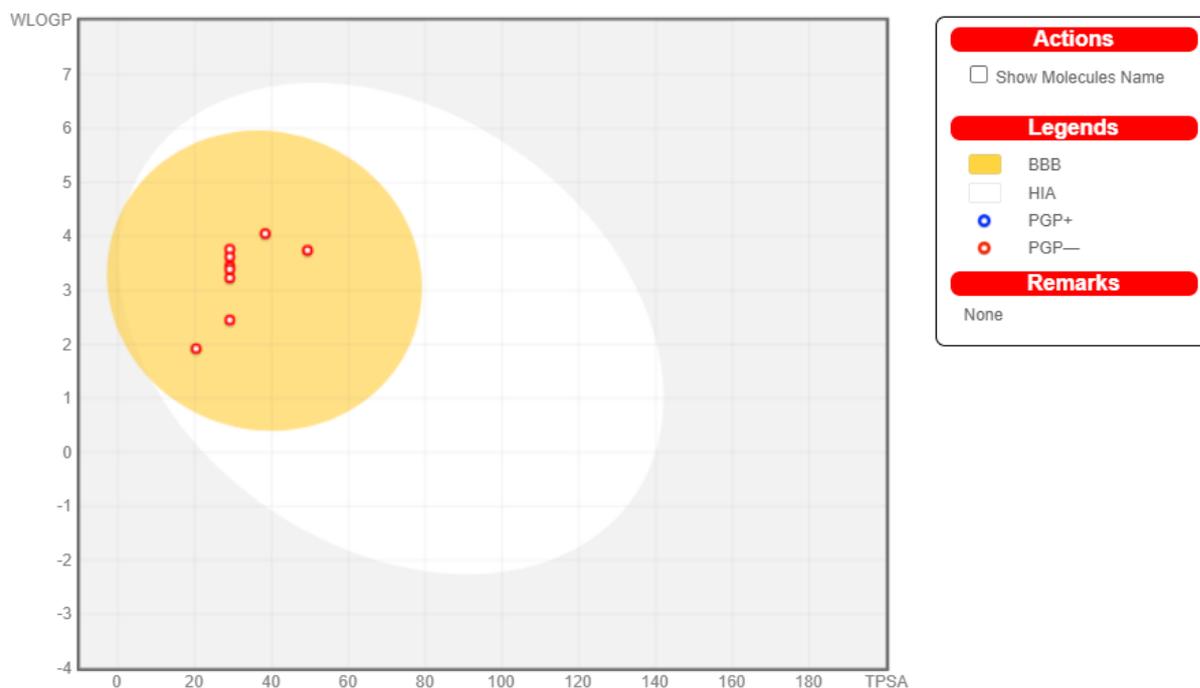
Uma forma de avaliar os parâmetros de absorção gastrointestinal passiva e a capacidade do fármaco de ultrapassar a BHE é a partir do gráfico *BOILED-Egg*, gerado a partir da plataforma SwissADME. É um gráfico que correlaciona dois descritores físico-químicos, o W Log P para indicar a lipofilicidade e o TPSA para indicar a polaridade aparente. O gráfico é composto pela parte amarela, dando a ideia de gema, que representa o espaço físico-químico para que uma substância apresente uma alta probabilidade de permear passivamente a BHE, e tem a parte branca, representando a clara do ovo, que está relacionado ao espaço físico-químico onde a absorção intestinal passiva é altamente provável. Além disso, há o espaço cinza, que representa moléculas com propriedades que indicam baixa absorção prevista e penetração cerebral limitada. Além disso, o gráfico prevê se a molécula a ser avaliada é substrato para glicoproteína-p (P-gp) ou não, sendo a molécula representada pelas cores azuis ou vermelhas, respectivamente (DAINA; ZOETE, 2016).

A P-gp é uma glicoproteína de superfície que tem sua atividade comparada a uma bomba de efluxo, pois é capaz de impedir a entrada de um fármaco na célula dependendo de sua concentração. Sendo assim, é necessário doses maiores do fármaco para atingir uma concentração efetiva por conta do efluxo. Os compostos analisados no trabalho não se apresentaram sendo substratos da P-gp, como podem ser vistos nas figuras 36 e na Tabela 4.

Ao serem avaliadas as moléculas investigadas neste trabalho, o gráfico de *BOILED-Egg* demonstrou que todas as moléculas apresentam alta probabilidade de serem absorvidos passivamente pelo intestino e apresentam capacidade de ultrapassarem a BHE, pois todas as moléculas estão localizadas na região amarela,

como pode-se observar na figura 36. Além disso, não se apresentam como substratos para P-gp, indicando não sofrerem efluxo.

Figura 36- Avaliação dos parâmetros de absorção gastrointestinal e da possibilidade de ultrapassar a BHE a partir do gráfico *BOILED-Egg*.



Fonte: Adaptado de SwissADME (2023)

Em um estudo, Lipinski e colaboradores (1997) analisaram diversos compostos e identificaram quatro propriedades físico-químicas semelhantes entre os medicamentos utilizados por via oral e candidatos a fármacos, sendo encontrado pontos comuns em 90% das substâncias avaliadas. Essas informações foram traduzidas em um conjunto de regras chamada “Regra dos 5 de Lipinski”, que está relacionado a características estruturais comuns entre fármacos com boa biodisponibilidade oral, que são: peso molecular <500 Da, presença de número ≤ 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio, presença de número ≤ 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio e $\text{LogP} \leq 5$. Baseado nestes parâmetros, compostos que apresentam 2 ou mais violações das regras, possuem grande chance de apresentarem baixa biodisponibilidade oral (PICCIRILLO, AMARAL, 2018). Como pode ser visto na Tabela 4, nenhum dos candidatos apresentou violações para a regra de Lipinski.

Tabela 4: Tabela de propriedades físico-químicas e *druglikeness*.

Estrutura	Peso Molecular (g/mol)	Log P (consenso)	Log S/classe (ESOL)	Absorção GI	Permeação BHE	Substrato P-gp	Lipinski
Isobutilamida do ácido deca-2E,4E,8Z-trienóico (8,9-desidropellitorina)	221.34	3.34	Solúvel	Alta	Sim	Não	0
Isobutilamida do ácido deca-2E,4E-dienóico (pelitorina)	223.35	3.64	Solúvel	Alta	Sim	Não	0
Isobutilamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico	229.32	3.19	Solúvel	Alta	Sim	Não	0
Piperidinamida do ácido deca-2E,4E-dienóico	235.37	3.54	Solúvel	Alta	Sim	Não	0
Piperidinamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico	227.30	2.80	Solúvel	Alto	Sim	Não	0
Isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E,12Z-trieno-8,10-diinóico	269.38	4.04	Solúvel	Alto	Sim	Não	0
Isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico (anaciclina)	271.40	4.27	Solúvel	Alto	Sim	Não	0
Tiramida do ácido deca-2E,4E-dienóico	287.40	3.84	Moderadamente solúvel	Alto	Sim	Não	0
4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2E,4E-dienóico	301.42	4.27	Moderadamente solúvel	Alto	Sim	Não	0

Fonte: O autor (2023)

Estudos relacionados à interação farmacocinética e farmacodinâmica de medicamentos convencionais utilizados pela população com plantas que

apresentam alcaloides em sua constituição têm sido explorados. Não foram identificados riscos de interações clínicas entre plantas contendo alcaloides, como na *Echinacea spp.* e fármacos que sejam substratos de P-gp (GURLEY *et al.*, 2008; HELLUM; NILSEN, 2008). Os alcaloides são metabolizados pelo sistema citocromo P450 e estudos *in vitro* e *in vivo* corroboram ao demonstrarem que a interação entre medicamentos convencionais e constituintes da planta não é clinicamente significativa (TOSELLI; MATTHIAS; GILLAM, 2009). De forma geral, imagina-se que seja pouco provável que os alcaloides representem sérios problemas.

As enzimas do CYP P450 são pertencentes ao grupo de uma superfamília de heme-proteínas distribuídas no organismo, onde destacam-se dez isoformas do citocromo P450, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 e CYP3A5 (KIM, 2018). Essas enzimas são responsáveis por cerca de 80% do metabolismo oxidativo de fase I de diversas xenobióticos, sendo a CYP3A4 a mais importante delas, pois está envolvida no metabolismo de 50% dos fármacos clinicamente disponíveis. As isoformas do citocromo P450 são diferenciadas uma das outras por conta de suas sequências de aminoácidos e nas diferentes reações que catalisam (WIENKERS; HEATH, 2005). As reações catalisadas por essas enzimas apresentam importância toxicológica, por participarem de reações que envolvem produção de compostos reativos como em processos de hepatotoxicidade e carcinogênese (RIBEIRO, 2013.). Sendo assim, a interação de possíveis candidatos a fármacos com essas enzimas pode resultar em um aumento da toxicidade e diminuir sua eficácia terapêutica.

A partir das previsões realizadas no SwissADME foi avaliada a inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. As estruturas isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico isobutilamida (8,9- desidropellitorina) e piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico não inibiram nenhuma das isoformas que foram avaliadas, sendo um resultado considerado bem satisfatório. As estruturas da isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pellitorina), isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico e piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico inibiram apenas a CYP1A2. Já a estrutura da isobutilamida do tetradeca-2*E*,4*E*-dieno ácido -8,10-diinóico (anaciclina) inibiu as isoformas CYP 1A2 e 2C9, enquanto a isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*,12*Z*- trieno-8,10-diinóico, tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metoxi

feniletilamina do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico inibiram pelo menos três CYPs (Tabela 5).

A CYP3A4 é responsável por metabolizar a grande parte dos fármacos disponíveis, o risco dessa inibição ocasionar interação medicamentosa é alto, enquanto a inibição de outras isoformas não é tão preocupante. Entretanto, apenas as alcamidas Isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico isobutilamida (anaciclina) e 4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico apresentaram o potencial de inibição para a CYP3A4.

Tabela 5: Dados farmacocinéticos das moléculas avaliadas.

Alcamidas	Inibe CYP1A2	Inibe CYP2C19	Inibe CYP2C9	Inibe CYP2D6	Inibe CYP3A4
Isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> -trienóico (8,9- desidropellitorina)	Não	Não	Não	Não	Não
Isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienóico (pelitorina)	Sim	Não	Não	Não	Não
Isobutilamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico	Sim	Não	Não	Não	Não
Piperidinamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienóico	Sim	Não	Não	Não	Não
Piperidinamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico	Não	Não	Não	Não	Não
Isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -trieno-8,10-diinóico	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Isobutilamida do ácido tetradeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico (anaciclina)	Sim	Não	Sim	Não	Não
Tiramida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienóico	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienóico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Fonte: O autor (2023)

A avaliação de possibilidade de cardiotoxicidade é realizada a partir do teste de bloqueio do canal de hERG, que pode resultar alterações rítmicas. O canal do hERG codifica um canal de íons de potássio envolvido na atividade de repolarização cardíaca do coração, controlando o intervalo QT do eletrocardiograma. Ao induzir o bloqueio da função hERG por medicamentos, essa indução pode causar síndrome do QT longo, resultando em arritmia e morte (SCHYMAN *et al.*, 2017)

Ao avaliar todos os candidatos a fármacos quanto sua possibilidade de cardiotoxicidade, foram observados resultados somente para isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pelitorina), tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico, onde não apresentaram perigos cardiotóxicos. Entretanto, para os íons moleculares isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (8,9- desidropellitorina), isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico, piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico, piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*,12*Z*-trieno-8,10-diinóico e isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico (anaciclina), a plataforma do vNN-ADMET não conseguiu calcular, isso acontece quando dentro da base de dados que a plataforma utiliza, ela não consegue identificar similaridades entres as moléculas testadas, não resultando em informações correspondentes ao parâmetros avaliados (Tabela 6). É um resultado satisfatório, tendo em vista que diante das moléculas que obtiveram resultados, todos os resultados foram considerados positivos para a investigação.

Tabela 6: Toxicidade dos candidatos à fármaco.

Alcamidas	Cardiotoxicidade (bloqueio HERG)
Isobutilamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico	-
Piperidinamida do ácido undeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dieno-8,10-diinóico	Não
Isobutilamida do ácido deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> -trienóico (8,9-desidropellitorina)	-

Tiramida do ácido deca-2E,4E-dienóico	-
Isobutilamida do ácido deca-2E,4E-dienóico (pelitorina)	-
Isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E,12Z- trieno-8,10-diinóico	-
Piperidinamida do ácido deca-2E,4E-dienóico	-
Isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico (anaciclina)	Não
4-metóxi feniletilamida do ácido deca-2E,4E-dienóico	Não

Fonte: O autor (2023)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há diversos estudos e pesquisas acerca do uso medicinal das plantas, e isso se deve ao fato da presença de uma vasta diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas. A presença de metabólitos secundários possibilita a descoberta de possíveis fármacos para diferentes patologias. Diante disso, ao se realizar o estudo fitoquímico da partição em diclorometano oriunda do extrato das raízes de *Achillea millefolium*, foram identificadas a presença das alcamidas isobutilamida do ácido deca-2E,4E,8Z-trienóico (8,9- desidropellitorina), isobutilamida do ácido deca-2E,4E-dienóico (pelitorina), isobutilamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico, piperidinamida do ácido deca-2E,4E-dienóico, piperidinamida do ácido undeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E,12Z-trieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca-2E,4E-dieno-8,10-diinóico (anaciclina), tiramida do ácido deca-2E,4E-dienóico e o 4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2E,4E-dienóico com variedade estrutural, como cadeias olefínicas e acetilênicas, e porções isobutilamida, piperidinamida e tiramida.

Os resultados das análises antioxidantes foram considerados promissores, pois evidenciam a presença de alcamidas conjugadas nas raízes de *A. millefolium* e

que podem estar envolvidas com a atividade antioxidante. Apesar do extrato bruto não ter apresentado uma atividade desejada, a partição em diclorometano foi capaz de apresentar uma atividade de CE_{50} de 6.9 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando ter um resultado melhor quando comparado ao flavonoide utilizado como controle positivo, a quercetina, cuja CE_{50} foi de 12.84 $\mu\text{g/mL}$, e sendo considerada uma atividade antioxidante muito promissora.

De acordo com os resultados apresentados ao investigar as características físico-químicas e farmacocinéticas das moléculas em estudo, com auxílio das plataformas SwissADME e vNN-ADMET, foi possível evidenciar que todos os candidatos apresentaram um valor de Log P dentro da faixa desejada, sendo assim, consideradas com boa biodisponibilidade oral, com alta absorção no trato gastrointestinal (TGI) sendo capaz de permear a BHE. Além disso, mostraram-se não substratos para a P-gp e não violaram nenhuma das regras de Lipinski, ou seja, apresentaram Peso molecular menor que 500 Da, não apresentaram número de grupos doadores de ligação de hidrogênio igual ou superior a 5, não apresentaram número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio maior ou igual a 10 e obtiveram um valor de Log P igual ou maior que 5. Entretanto, a isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (8,9- desidropellitorina), isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pelitorina), isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico, piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico, piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico e a isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*,12*Z*-trieno-8,10-diinóico, isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico (anaciclina) foram classificados como moléculas solúveis, já a tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico foram considerados como moderadamente solúveis.

De acordo com as investigações realizadas pelo SwissADME, foram obtidas previsões das possíveis interações de cada candidato a fármaco com as isoformas da CYP P450. Ao final da análise, foi possível observar que a isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (8,9- desidropellitorina) e a piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico não apresentam potencial de inibição para nenhuma das CYPs. Já a isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pelitorina), isobutilamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico e piperidinamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico apresentam-se capazes de inibirem a CYP1A2, porém não sendo inibidores das CYPs 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4. A isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*, 4*E*, 12*Z*-

trieno-8,10-diinóico apresentou um perfil inibidor para as CYPs 1A2, 2C19 e 2C9. O candidato isobutilamida do ácido tetradeca-2*E*,4*E*-dieno -8,10-diinóico (anaciclina) demonstrou características de um perfil inibidor para as CYPs 1A2 e 2C9. Já a tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico só não foi capaz de inibir a CYP 2D6 e o 4-metoxi feniletilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico se apresentou como inibidor para todas as CYPs selecionadas pela plataforma SwissADME para a avaliação.

Foram somente obtidos resultados para a isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico isobutilamida (pelitorina), tiramida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico e 4-metoxi feniletilamida do ácido Deca-2*E*,4*E*-dienóico, que apresentaram não possuem riscos cardiotoxicos.

Diante de todas as buscas realizadas na literatura, nas análises fitoquímicas, nas avaliações antioxidante, físico-químicas, farmacocinéticas e cardiotoxicas, foi possível identificar que algumas moléculas apresentaram potenciais resultados para se tornar um candidato a fármaco com propriedades antioxidantes satisfatórias. As alcamidasisobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*,8*Z*-trienóico (8,9- desidropellitorina) e piperidinamida do ácido undeca-2*E*,4*E*-dieno-8,10-diinóico se apresentaram perfil físico-químico e farmacocinético dentro de todos os parâmetros avaliados no trabalho. Já a isobutilamida do ácido deca-2*E*,4*E*-dienóico (pelitorina), apesar de ser um inibidor da CYP1A2, demonstrou resultados dentro dos limites desejados em cada análise e ao ser avaliado o parâmetro de cardiotoxicidade se apresentou não sendo capaz de bloquear os canais de hERG. Sendo assim, as alcamidascandidatas configuram-se como moléculas interessantes dada sua grande variabilidade estrutural e que podem servir como modelo para o planejamento de fármacos para o tratamento de diversas patologias relacionadas ao sequestro de radicais livres. Vale ressaltar que este é o primeiro trabalho acerca de atividade biológica das raízes de *A. millefolium* e demonstra o potencial dessa parte do vegetal para ser utilizado como fitoterápico ou ainda, o isolamento das alcamidas para uso como fitofármacos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, G. P. **Validação dos sistemas computadorizados empregados na determinação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e da abamectina**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-14122016-144958/en.php>. Acesso em: 01 dez 2023.
- ALVES, J.A.N.R. *et al.* **Envelhecimento normal**. Florianópolis, 2005. 51f. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- AL QARAGHULI, M. M.; KUBIAK-OSSOWSKA, K.; MULHERAN, P. A. Thinking outside the Laboratory: Analyses of Antibody Structure and Dynamics within Different Solvent Environments in Molecular Dynamics (MD) Simulations. **Antibodies**, v. 7, n. 3, p. 21, 24 jun. 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4468/7/3/21>. Acesso em: 03 dez 2023.
- ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. **Aditivos em Alimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1984
- APPLEQUIST, W. L.; MOERMAN, D. E. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research¹. **Economic Botany**, v. 65, n. 2, p. 209–225, 14 abr. 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12231-011-9154-3>. Acesso em: 01 dez 2023.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of Curcuma longa L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723–728, 1 jul. 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/w5RscYLJtTTFsCT8XYMCm9P/>. Acesso em: 01 dez 2023.
- ARTARIA, C. *et al.* Lifting properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. v. 33, n. 4, p. 328–333, 1 fev. 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1468-2494.2010.00629>. Acesso em: 03 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00629.x>
- BADSHAH, S. L. *et al.* Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111596, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34126315/>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111596.
- BARBOSA, A. F. Avaliação química e biológica do Jambu (*Acmella oleracea* L.) seco com ar frio e liofilizado. **tede.ufrj.br**, 15 dez. 2016. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/handle/jspui/2026>. Acesso em: 01 dez 2023.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, jan. 2006. Disponível

em:<https://www.scielo.br/j/qn/a/K9hDbHkb3D3KPkgpLz7fg7k/>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1 ago. 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rn/a/bzHBTqBfJr8jmJn3ZXx9nMs/>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52731999000200001>.

BARRIE, N.; MANOLIOS, N. The endocannabinoid system in pain and inflammation: Its relevance to rheumatic disease. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, n. 3, p. 210–218, 15 set. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29164003/>. Acesso em: 02 dez 2023. DOI: 10.5152/eurjrheum.2017.17025.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 89-97, 1996. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/biotechnology/pdf/0167-7799\(96\)80929-2.pdf](https://www.cell.com/trends/biotechnology/pdf/0167-7799(96)80929-2.pdf). Acesso em: 01 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80929-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80929-2)

BOONEN, J. *et al.* Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 563–590, 1 ago. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874112003480>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.038>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643895800085>. Acesso em 03 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html. Acesso em: 01 dez 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 272, DE 14 DE MARÇO DE 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0272_14_03_2019.pdf. Acesso em: 01 dez 2023.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. **Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines**. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4841-4844, 2001

CANDAN, F. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2-3, p. 215–220, ago. 2003. Disponível

em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874103001491>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00149-1).

CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HARVEY, M. J. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, compositae. **Economic Botany**, v. 36, n. 2, p. 203–223, abr. 1982. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02858720>. Acesso em: 01 dez 2023.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. Revista **Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 20 jul. 2009. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/51/98>. Acesso em: 05 dez 2023.

COUTINHO, M. R. *et al.* Partial Purification of Anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage). **Separation Science and Technology**, v. 39, n. 16, p. 3769–3782, 12 jan. 2004. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/SS-200036539>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1081/SS-200036539>.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a Free web Tool to Evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 3 mar. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep42717>. Acesso em: 01 dez 2023.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117–1121, 24 maio 2016. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.201600182>. Acesso em: 05 dez 2023.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/viewFile/540/453>. Acesso em: 01 dez 2023.

DORNAS, W. C. A. *et al.* Flavonóides : potencial terapêutico no estresse oxidativo. **repositorio.ufop.br**, 2007. Disponível em: <https://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/774>. Acesso em 5/12/2023.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4–29, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661816000232>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>.

EL-ACHKAR, T. M. *et al.* Tamm-Horsfall protein translocates to the basolateral domain of thick ascending limbs, interstitium, and circulation during recovery from acute kidney injury. v. 304, n. 8, p. F1066–F1075, 15 abr. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23389456/>. Acesso em: 03 dez 2023. DOI: 10.1152/ajprenal.00543.2012.

FABRI, R. L. *et al.* Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 183–189, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/kRx5PNhfjqM4Y3xWzpk9TSg/>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000200009>.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

FERREIRA, A. C. B. B. **Disfunção da Barreira Hematoencefálica na Esclerose Múltipla: a chave do problema ou da solução?**. 2018. Dissertação de Mestrado. Disponível em acesso: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/84372>. Acesso em: 02 dez 2023.

GOMES, M., G. S. Extrato bruto de *Acmella oleracea* obtido por aparato de Soxhlet: caracterização química por CLUE-EM e isolamento de alcaloides por CPC. 3 ago. 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/238654>. Acesso em: 05 dez 2023.

GORNI, P. H. Promoção de crescimento e atividade elicitora do ácido salicílico em *Achillea millefolium* L. **Unoeste.br**, 2015. Disponível em: <http://bdtd.unoeste.br:8080/tede/handle/tede/604>. Acesso em: 01 dez 2023.

GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992

GREGER, H. Alkamides: Structural Relationships, Distribution and Biological Activity¹. **Planta Medica**, v. 50, n. 05, p. 366–375, out. 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6395155/>. Acesso em 03 dez 2023. DOI: 10.1055/s-2007-969741.

GREGER, V. *et al.* Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Human Genetics**, v. 83, n. 2, p. 155–158, set. 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2550354/>. Acesso em: 03 dez 2023. DOI: 10.1007/BF00286709.

GURLEY, B. J. *et al.* Gauging the clinical significance of P-glycoprotein-mediated herb-drug interactions: Comparative effects of St. John's wort, Echinacea, clarithromycin, and rifampin on digoxin pharmacokinetics. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 7, p. 772–779, jul. 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.200700081>. Acesso em: 03 dez 2023.

HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **British journal of experimental pathology**, v. 70, n. 6, p. 737–757, 1 dez. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2040729/>. Acesso em: 03 dez 2023.

HAYASE, F.; KATOI, H. Antioxidative components of sweet potatoes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 30, n. 1, p. 37–46, 1984. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv1973/30/1/30_1_37/_article/-char/ja/. Acesso em: 01 dez 2023.

HELLUM, B. H.; NILSEN, O. G. In vitro Inhibition of CYP3A4 Metabolism and P-Glycoprotein-Mediated Transport by Trade Herbal Products. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, n. 5, p. 466–475, maio 2008. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-7843.2008.00227.x>. Acesso em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00227.x>.

HERNÁNDEZ Á., M.; PRIETO G., E. A. Plantas que contienen polifenoles: Antioxidantes dentro del estilo de vida. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 18, n. 1, p. 12–12, 1 abr. 1999. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03001999000100004&script=sci_arttext. Acesso em 01 dez 2023.

HINSCHINCK, J.; FERREIRA, W. V.; PINHEIRO, A. C. **Avaliação in silico das propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas de novas estruturas derivadas de β -Carbolinas**. 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpel.edu.br/bitstream/handle/prefix/10182/AVALIA%C3%87%C3%83O%20IN%20SILICO%20DAS%20PROPRIEDADES%20FARMACOCIN%C3%89TICAS%2C%20FARMACODIN%C3%82MICAS%20E%20TOXICOL%C3%93GICAS%20DE%20NOVAS%20ESTRUTURAS%20DERIVADAS%20DE%20%CE%B2-CARBOLINAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 01 dez 2023.

JIANG, Z.-P.; WANG, Y. Input-to-state stability for discrete-time nonlinear systems. *Automatica*, v. 37, n. 6, p. 857–869, jun. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0005109801000280>. Acesso em: 03 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-1098\(01\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0005-1098(01)00028-0).

KIM, Vera. **Frequência de polimorfismos nos genes responsáveis pela absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de medicamentos na população brasileira**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5168/tde-12092018-100648/?gathStatIcon=true>. Acesso em: 02 dez 2023.

LAKSHMI, T. *et al.* Yarrow (*Achillea millefolium linn*). A herbal medicinal plant with broad therapeutic use-A review. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 9, n. 2, p. 136-141, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285763271_Yarrow_Achillea_millefolium_Linn_a_herbal_medicinal_plant_with_broad_therapeutic_use_-_A_review/. Acesso em: 01 dez 2023.

LANÇAS, F. M. *et al.* A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/7134917/mod_resource/content/0/A%20Cromatografia%20L%C3%ADQUIDA%20MODERNA%20-%20v1n2a4.pdf. Acesso em: 01 dez 2023.

LANGER, S. M.; LONGIN, C. F. H.; WÜRSCHUM, T. Phenotypic evaluation of floral and flowering traits with relevance for hybrid breeding in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Breeding**, v. 133, n. 4, p. 433–441, 29 maio 2014. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pbr.12192>. Acesso em: 03 dez 2023.
DOI: <https://doi.org/10.1111/pbr.12192>.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3–25, jan. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X96004231>. Acesso em: 02 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).

LOURENÇO, A. R. N. *et al.* **Administração tópica de fármacos: das restrições aos desafios**. 2013. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <https://recil.ensinolusofona.pt/handle/10437/4575>. Acesso em: 02 dez 2023.

MAMEDE, M. E. O. DE.; PASTORE, G. M.. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, 2004. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/viewFile/1192/993>. Acesso em 02 dez 2023.

MAZUTTI, M. A. *et al.* Atividade antioxidante (ROO·, O₂·-e DPPH) e composta fenólicos majoritária para folha, flor, ramo e inflorescência da *Achillea millefolium*. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 3, p. 1487-1495, 2016. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4675/467547716036.pdf>. Acesso em: 01 dez 2023.

MAURICIO, A. Q.. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. 2006. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/11707>. Acesso em: 06 dez 2023.

NUNES, R. J. L.; SANTOS, J. U. M. DOS; SIMÕES, A. O. Estudos em Asteraceae (Astereales, Magnoliophyta) da Serra dos Martírios/ Andorinhas e Área de Proteção Ambiental de São Geraldo do Araguaia, Pará, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e193111637366–e193111637366, 5 dez. 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/37366>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i16.37366>.

OLIVEIRA, A.L. **Curso de estética**. v. 2. São Paulo: Yendis, 2008.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, G. L. S. Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH•method: review study. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 17, n. 1, p. 36–44, 1 mar. 2015. Disponível: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/5Wrr5LFLJVJDN5yYQnFGyWd/>. Acesso em 5/12/2023.

PAUL, M.; BHANJA, N.; DAR, A. B. Gold, gold mining stocks and equities- partial wavelet coherence evidence from developed countries. **Resources Policy**, v. 62, p. 378–384, ago. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301420718307098>. Acesso em: 03 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2019.04.012>.

PERES, D. D. Ácido Ferúlico em Protetores Solares: Desenvolvimento e Eficácia Multifuncional in vitro, ex vivo e in vivo. In: **Ácido Ferúlico em Protetores Solares:**

Desenvolvimento e Eficácia Multifuncional in vitro, ex vivo e in vivo. University of São Paulo São Paulo, SP, Brazil, 2015. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b766/f7bdc8b49dd85959af1cdf9bee4e305f67e9.pdf>. Acesso em 5/12/2023.

PICCIRILLO, E.; AMARAL, A. T. DO. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, p. 662-677, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/RtZhvxbSYmcgnTzw6cTHT3v/?lang=pt>. Acesso em: 02 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170210>.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 15 jul. 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12291-014-0446-0>. Acesso em: 01 dez 2023.

RADUNER, S. *et al.* Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics: cannabinoid type 2 receptor-dependent and-independent immunomodulatory effects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14192-14206, 2006. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)78063-4/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)78063-4/abstract). Acesso em: 02 dez 2023.

REFLORA – Herbário Virtual. **Solanaceae**. Online. Disponível em: <https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/> Acesso em 5/12/2023.

RIBEIRO, C.J. **Cosmetologia aplicada a Dermoestética**. 1. ed. São Paulo: Pharmabook, 2006.

RIBEIRO, J. F. R. **Estudo in vitro do metabolismo microsossomal hepático de agentes tripanossomicidas**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-04042013-145753/en.php>. Acesso em: 02 dez 2023.

ROBER, R. Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico. 2005. Disponível: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/101808>. Acesso em 5/12/2023.

SALVAGNINI, L. E. *et al.* Evaluation of efficacy of preservatives associated with *Achillea millefolium* L. extract against *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 75–77, 1 mar. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/9HCMXBjpyLLWmPX6VV36Fm/>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100014>.

SANTOS, C. C. Integração de diferentes abordagens para a avaliação de atividade antiparasitária, propriedades ADMET e alvos celulares de novas Arilimidamidas sobre *Trypanosoma cruzi*. **2016. Tese de Doutorado**. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/23073>. Acesso em: 01 dez 2023.

SCHYMAN, P. *et al.* vNN web server for ADMET predictions. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 889, 2017. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00889/full>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00889>

SCHYMAN, P. *et al.* vNN Web Server for ADMET Predictions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 889, 2017. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255418/>. Acesso em: 05 dez 2023.

SOARES, S. E.. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rn/a/mZxTyVMspZY9WJgC7SSFnbh/> Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>.

STRUTZEL, E. *et al.* Análise dos fatores de risco para o envelhecimento da pele: aspectos gerais e nutricionais. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 22, n. 2, p. 139-45, 2007.

SOUSA, A. I. F. D. S. **Monografia da *Achillea Millefolium***. 2017. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <https://recil.ensinolusofona.pt/handle/10437/8374>. Acesso em: 05 dez 2023.

STRINGHETA, P. C. *et al.* Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde.

Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2009. Disponível em:

https://www.academia.edu/download/42556020/LUTENA_PROPRIEDADES_ANTIOXIDANTES_E_BENE20160210-3699-1i9lisy.pdf. Acesso em: 02 dez 2023.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas em plantas: Distribución e importancia.

Avance y perspectiva, v. 20, n. Noviembre-Diciembre, p. 377-387, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Molina-Torres/publication/242260227_Alcamidas_en_plantas_Distribucion_e_importancia/links/54a19be60cf256bf8baf7612/Alcamidas-en-plantas-Distribucion-e-importancia.pdf.

Acesso em: 03 dez 2023.

TOSELLI, F.; MATTHIAS, A.; GILLAM, E. M. J. Echinacea metabolism and drug interactions: The case for standardization of a complementary medicine. **Life Sciences**, v. 85, n. 3, p. 97–106, 15 jul. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320509002021>. Acesso em:

03 dez 2023. DOI: doi.org/10.1016/j.lfs.2009.04.023.

VAN A., S. A. B. E. *et al.* Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331–342, jan. 1996. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0891584995020470>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02047-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02047-0).

VERYSER, L. *et al.* N-alkylamide profiling of *Achillea ptarmica* and *Achillea millefolium* extracts by liquid and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 1, p. 34–47, 1 fev. 2017. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177916301010>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.09.005>.

VERTZONI, M. *et al.* Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. **European Journal of**

Pharmaceutics and Biopharmaceutics. v. 60, n. 3, p. 413–417, 1 ago. 2005.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15893920/>. Acesso em: 06 dez 2023.

Wagner, H. *Plant Drug Analysis*, 2 ed., 195 (1996)

WIENKERS, L. C.; HEATH, T. G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 10, p. 825–833, out. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16224454/>. Acesso em: 02 dez 2023. DOI: 10.1038/nrd185.

WOELKART, K. *et al.* The Endocannabinoid System as a Target for Alkamides from *Echinacea angustifolia* Roots. ***Planta Medica***, v. 71, n. 8, p. 701–705, ago. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16142631/>, Acesso em: 02 dez 2023. DOI: 10.1055/s-2005-871290.

WOODHAMS, S. G. *et al.* The role of the endocannabinoid system in pain. ***Pain control***, p. 119-143, 2015. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-46450-2_7. Acesso: 02 dez 2023.

XU, C.-C. *et al.* Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. ***Chinese Journal of Natural Medicines***, v. 15, n. 10, p. 721–731, out. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875536417301036>. Acesso em: 01 dez 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30103-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30103-6).

YEN, G.-C.; LAI, H.-H.; CHOU, H.-Y. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. ***Food Chemistry***, v. 74, n. 4, p. 471–478, set. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814601001650>. Acesso em: 02 dez 2023.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. **Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.** *J. Agric. Food Chemistry*. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001.