

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Mecanismos de ação relacionados à atividade antiúlcera de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae)

Flávia Sobreira Mendonça Gonçalves

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elfriede M. Bacchi

São Paulo/2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Mecanismos de ação relacionados à atividade antiúlcera de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae)

Flávia Sobreira Mendonça Gonçalves

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elfriede M. Bacchi

São Paulo/2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

G635m Gonçalves, Flávia Sobreira
 Mecanismos de ação relacionados à atividade
 antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers
 (Crassulaceae) / Flávia Sobreira Gonçalves. - São
 Paulo, 2017.
 134 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

1. *Kalanchoe pinnata*. 2. flavonoides. 3. úlcera
gástrica. 4. Crassulaceae. I. T. II. Bacchi,
Elfriede Marianne, orientador.

Flávia Sobreira Mendonça Gonçalves

Mecanismos de ação relacionados à atividade antiúlcera de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof^a Dr^a. Elfriede M. Bacchi
orientador/president

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais Manoel e Helenice e ao meu esposo Cleber pelo carinho, pela compreensão e apoio incondicional.

Agradecimentos

A Deus por me guiar na busca dos meus sonhos e me dar força e paciência nos momentos de dificuldades.

A Profa. Elfriede Marianne Bacchi os meus sinceros agradecimentos pela acolhida em seu grupo de pesquisa, pela contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal, pelo exemplo de competência, ética na pesquisa, pelo dom em ensinar e pela amizade ao longo destes anos.

Aos Professores Edna Tomiko Myiake Kato, Paulo Chanel Deodato de Freitas e Dominique Hermine Fischer pelas valiosas conversas as quais contribuíram para minha formação profissional e pela amizade.

Ao Doutor Ílio Montanari Junior do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp por ceder gentilmente o material vegetal utilizado neste trabalho.

À Profa. Ingrid Elida Collantes Díaz pela atenção, elucidação de substâncias neste trabalho e amizade.

À Profa. Patrícia Gama e suas alunas pelo auxílio e atenção na análise de imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. Guerra pelo auxílio na análise histológica.

Ao Prof. Felipe Rebello Lourenço pelo auxílio na análise de endotoxina e pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Prof. Jorge Mancini e suas alunas Ana Mara de Oliveira e Silva e Fernanda Carvalho de Santana pela orientação e contribuição na análise de atividade antioxidante.

À Profa. Patrícia Santos e seu aluno Fúlvio pela colaboração na análise de citotoxicidade *in vitro* e pela amizade, contribuindo na execução deste trabalho.

À Profa. Elaine Hatanaka e seus alunos pelo auxílio e atenção nas análises de potencial anti-inflamatório.

À Profa. Ivana Suffredini por disponibilizar o uso do liofilizador.

À aluna de iniciação científica Marília Parasin pela contribuição e dedicação para a realização deste trabalho.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório pela amizade e prontidão para sempre ajudar nos experimentos.

Aos amigos e colegas de laboratório Leandro, Alexandra, Angela (*in memoriam*), Alberto, Pedro, Caio, Bruno pela amizade e pela disponibilidade em sempre ajudar.

Aos funcionários do Biotério do conjunto das Químicas pela disposição e atenção no ensinamento de como manipular os animais.

Aos funcionários do Departamento de Farmácia David e Alexandre pela amizade, pelo esclarecimento de dúvidas e por sempre serem prestativos.

À funcionária Leila Aparecida Bonadio da biblioteca do Conjunto das Químicas pela revisão das referências bibliográficas.

Aos meus pais Manoel e Helenice e ao meu irmão Guilherme por sempre me apoiar em minhas escolhas e nunca medir esforços para a concretização dos meus sonhos. Amo vocês!

Ao meu esposo Cleber que sempre esteve no meu lado nos momentos de alegria e de dificuldades. Pelos seus conselhos, pela sua companhia, pelo seu carinho. Meus dias se tornam mais leves ao seu lado. Te amo!

As minhas queridas amigas (Gisele e Meiri) as quais tive a oportunidade de conhecer e conviver durante um período da pós-graduação. Levarei para sempre esta amizade comigo.

À amiga Fabi obrigada pelas nossas conversas, conselhos e prontidão para ajudar nos experimentos de análise microbiana.

À Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os colegas, amigos e familiares que contribuíram diretamente e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Não deixe que os seus medos tomem o lugar
dos seus sonhos.”*

Walt Disney

Resumo

GONÇALVES, Flávia Sobreira. **Mecanismos de Ação Relacionados à Atividade Antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae)**. 2017. 134f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae) é uma espécie muito empregada na medicina tradicional no Brasil e em outras partes do mundo, especialmente Índia, países da África e China. É indicada popularmente para diversos fins incluindo o tratamento de úlceras gástricas. A análise fitoquímica revelou a presença de vários constituintes, em especial os flavonoides. O tratamento de úlcera gástrica convencional apresenta diversos efeitos colaterais e, na maioria das vezes, não evita a recidiva da lesão. Dessa maneira, é interessante encontrar uma terapêutica mais segura e efetiva. Com o objetivo de avaliar a segurança, foi realizado ensaio de citotoxicidade do extrato bruto, *in vitro*, com valor de IC₅₀ igual a 0,926 mg/mL, sendo possível predizer um valor de LD₅₀ (1341,46 mg/kg). Já em relação ao ensaio de citotoxicidade, *in vitro*, da fração acetato de etila não foi encontrado um valor de IC₅₀. Resultados de fototoxicidade, *in vitro*, mostraram que o extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* não possuem potencial fototóxico. A contagem microbiana na droga vegetal para bactérias aeróbias/mesófilas foi de 6,9 x 10⁴ UFC/g e a contagem de bolores e leveduras foi de 2,4 x 10³ UFC/g, ambos valores dentro do limite estabelecido pela OMS. Análise de endotoxinas também foi realizada para o extrato bruto (<4,0.10⁵ UE/kg) e fração acetato de etila (<2,7.10⁵ EU/kg) de *K. pinnata*. Referente à fitoquímica, diversos flavonoides foram identificados no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*. Paralelamente ao estudo fitoquímico foi verificado que a atividade gastroprotetora do extrato bruto envolve a ação das prostaglandinas e grupamentos sulfidril. Já o mecanismo de gastroproteção da fração acetato de etila é dependente de prostaglandinas e óxido nítrico. A atividade cicatrizante do extrato bruto de *K. pinnata* também foi avaliada. De acordo com os resultados macroscópicos, as doses de 200mg/kg e 400 mg/kg reduziram a área de lesão, com uma taxa de 33% e 39%, respectivamente, após 7 dias de tratamento (p<0,05). Análise histológica dos grupos tratados com o extrato bruto (200 e 400 mg/kg) indicou melhor recuperação da lesão, verificada pela regeneração da mucosa gástrica e pelo restabelecimento da arquitetura glandular. As enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e a expressão de VEGF foram avaliadas no mecanismo de cicatrização de úlceras gástricas. Os resultados mostraram que a atividade antiulcerogênica foi mediada pela ação antioxidante da enzima SOD. Não foi evidenciado *in vivo* o aumento da expressão de VEGF e nem o sequestro do radical peroxil nos animais tratados com o extrato bruto. Os resultados dos ensaios *in vitro* (ORAC) mostraram uma maior capacidade de sequestro de radicais peroxil da fração acetato de etila (1192,35 ± 112,61 μmol equivalente de Trolox/g de amostra seca) quando comparado com o extrato bruto (431,32 ± 7,17 μmol equivalente de Trolox/g de amostra seca). A atividade anti *Helicobacter pylori* também foi avaliada, no entanto, o extrato bruto não apresentou atividade anti *H.pylori*. Ademais, o extrato bruto demonstrou um potencial anti-inflamatório, pois foi observada uma redução nos níveis de TNF-α e L-selectina, após o tratamento em neutrófilos estimulados com LPS. Analisando os resultados sugere-se que *K. pinnata* possui um potencial terapêutico no combate de úlceras gástricas e possivelmente, anti-inflamatório, sendo que os flavonoides podem estar relacionados com o efeito biológico observado.

Palavras Chave: *Kalanchoe pinnata*; Crassulaceae; úlcera gástrica; flavonoides; mecanismo de ação.

Abstract

GONÇALVES, Flávia Sobreira. **Mechanisms of action underlying antiulcer activity of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae)**. 2017. 134f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae) is a commonly used species in traditional medicine in Brazil and in other parts of the world, especially India, Africa and China, for the treatment of various diseases, including gastric ulcers. Phytochemical analysis revealed the presence of several constituents in this plant, especially flavonoids. The available pharmaceutical products to treat peptic ulcer have several side effects and, in most cases, do not prevent recurrence of the gastric lesions. Therefore, it is important to find a safer and more effective therapy. In order to evaluate safety, the *in vitro* cytotoxicity assay of crude extract from *K. pinnata* was performed. The IC₅₀ value was 0,926 mg/mL corresponding to LD₅₀ value (1341, 46 mg/kg). It was not determined IC₅₀ value *in vitro* cytotoxicity assay for ethyl acetate fraction from *K. pinnata*. Neither the crude extract nor ethyl acetate fraction from *K. pinnata* showed phototoxicity. Microbial counting was performed on the *K. pinnata*-based drug in order to investigate microbiological contamination. The microbial count for aerobic / mesophilic bacteria was 6.9×10^4 CFU/g, and yeast count was 2.4×10^3 CFU/g, both values in agreement with the limits established by WHO. Endotoxin analysis was also performed for the crude extract ($<4,0.10^5$ UE/kg) and for ethyl acetate fraction ($<2,7.10^5$ UE/kg) from *K. pinnata*. In the phytochemical analysis several flavonoids were identified in the crude extract and ethyl acetate fraction of *K. pinnata*. In parallel to the phytochemical study, it was verified that the gastroprotective activity of the crude extract of *K. pinnata* involved prostaglandins and sulfhydryl compounds. On the other hand, the mechanism of gastroprotection of the ethyl acetate fraction of *K. pinnata* is dependent on prostaglandins and nitric oxide. The healing activity of the crude extract of *K. pinnata* was also evaluated. According to the macroscopic results the dose of 200 mg/kg and 400mg/kg reduced the injury area, with a rate of 33% and 39%, respectively, after 7 days of treatment ($p < 0.05$). Histological analysis showed regeneration of the gastric mucosa and re-establishment of the glandular architecture in groups treated with the crude extract (200 and 400 mg/kg). Antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and VEGF expression were evaluated in the mechanism of gastric ulcer healing. The results showed that the antiulcerogenic activity was mediated by SOD. It was not demonstrated an increase in VEGF expression and nor in the *in vivo* sequestration of the peroxy radical in the animals treated with crude extract. The results of *in vitro* assay (ORAC) showed a greater sequestering of peroxy radical to the ethyl acetate fraction ($1192,35 \pm 112,61$ μmol equivalent of Trolox/g of ethyl acetate fraction) when compared to the crude extract ($431,32 \pm 7,17$ μmol equivalent of Trolox/g of crude extract) of *K. pinnata*. The anti *Helicobacter pylori* activity was also evaluated; however, the crude extract did not show anti *H. pylori* activity. However, the crude extract of *K. pinnata* demonstrated an anti-inflammatory potential, because TNF- α and L-selectin levels were reduced after treatment in LPS-stimulated neutrophils. The analysis of the results suggests that *K. pinnata* has a therapeutic potential against gastric ulcers and possible anti-inflammatory properties, and the flavonoids may be linked to the biological effect.

Keywords: *Kalanchoe pinnata*; Crassulaceae; gastric ulcer; flavonoids; mechanism of action.

Lista de ilustrações

Figura 1- Partes aéreas de <i>Kalanchoe pinnata</i>	25
Figura 2- Ação dos fatores lesivos sobre a barreira gástrica.....	27
Figura 3- Representação esquemática da elaboração do extrato bruto e frações de <i>Kalanchoe pinnata</i>	38
Figura 4- Histogramas da intensidade de fluorescência da análise de integridade da membrana plasmática emitida por células de duas amostras diferentes. (a) Em células íntegras não há passagem de IP pela membrana; (b) Células com membranas rompidas permitirão a entrada de IP.	54
Figura 5- Histogramas de fluorescência da análise de fragmentação de DNA, emitida por células de duas amostras diferentes. (a) Quando o IP se liga ao DNA íntegro irá emitir alta fluorescência; (b) A fragmentação de DNA acarreta uma menor ligação do IP gerando eventos com baixa fluorescência.....	55
Figura 6- Curvas de viabilidade celular após tratamento do extrato bruto, fração acetato de etila de <i>K. pinnata</i> e DMSO, em diferentes concentrações, em células de fibroblastos murinos BALB/c 3T3.....	60
Figura 7- Curvas de viabilidade celular após tratamento do extrato bruto, fração acetato de etila de <i>K. pinnata</i> e DMSO, em diferentes concentrações, em células de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 após exposição à luz UVA e ao abrigo.....	61
Figura 8- Cromatograma do extrato bruto (1mg/mL) de <i>Kalanchoe pinnata</i>	63
Figura 9- Cromatograma da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (0,1mg/mL).....	63
Figura 10- - Espectros UV-Vis pertencentes ao extrato bruto de <i>K. pinnata</i> (A) e do padrão quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (B).....	63
Figura 11- Cromatograma da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (0,05mg/mL) adicionado ao extrato bruto de <i>K. pinnata</i> (1mg/mL).....	64
Figura 12- Curva de calibração de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo por CLAE.....	64
Figura 13- Cromatograma HPLC-UV (254 nm) do extrato bruto (A) de <i>K. pinnata</i> ...	65
Figura 14- Cromatograma HPLC-UV (254 nm) da fração acetato de etila (B) de <i>K. pinnata</i> e das substâncias isoladas.....	66

Figura 15- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado.....	68
Figura 16- Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado.....	69
Figura 17- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de <i>Kalanchoe pinnata</i> em animais pré-tratados com indometacina (10 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.....	70
Figura 18- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de <i>Kalanchoe pinnata</i> em animais pré-tratados com Etoricoxibe (90 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.....	71
Figura 19- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de <i>Kalanchoe pinnata</i> em animais pré-tratados com NEM (10 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.....	72
Figura 20- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de <i>Kalanchoe pinnata</i> em animais pré-tratados com L-NAME (70 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.....	73
Figura 21- Atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por ácido acético.....	74
Figura 22- Fotomicrografia de corte histológico de parede gástrica de rato, com reprodução experimental de lesão ulcerativa induzida por ácido acético, com sete dias de tratamento com água (veículo), 200 mg/kg, 400 mg/kg de extrato bruto de <i>K. pinnata</i> e lansoprazol (30mg/kg).....	75
Figura 23- Fotomicrografia de corte histológico de parede gástrica de rato, com reprodução experimental de lesão ulcerativa induzida por ácido acético, com sete dias de tratamento com água, 200 e 400 mg/kg de extrato bruto de <i>K. pinnata</i> mostrando área com formação de tecido de granulação.....	76
Figura 24- Quantificação da marcação imuno-histoquímica, para fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), em animais submetidos à indução de úlcera gástrica por ácido acético, após tratamento de 7 dias com extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i> , em diferentes doses.....	77
Figura 25- Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para VEGF em estômago de animais submetidos ao modelo de úlceras gástricas por ácido acético, após tratamento com água, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg e Lansoprazol (30 mg/kg) por 7 dias.....	77
Figura 26- Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em estômago de ratos tratados durante 7 dias com o extrato bruto de <i>K. pinnata</i> , após indução de úlcera por ácido acético.....	78

Figura 27- Atividade antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de ORAC em estômago de ratos tratados durante 7 dias com o extrato bruto de <i>K. pinnata</i> , após indução de úlcera por ácido acético.....	79
Figura 28- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de <i>K. pinnata</i> e do isolado quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil -(1 \rightarrow 2) - α -L-ramnopiranosídeo (QAR) na integridade de membrana em neutrófilos humanos.....	80
Figura 29- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de <i>K. pinnata</i> e do isolado quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil -(1 \rightarrow 2) - α -L-ramnopiranosídeo (QAR) na fragmentação do DNA em neutrófilos humanos.....	81
Figura 30- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de <i>K. pinnata</i> e do isolado quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (QAR) na produção de TNF- α em neutrófilos humanos estimulados ou não com LPS. Dexametasona foi utilizada como controle positivo.....	82
Figura 31- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de <i>K. pinnata</i> e do isolado quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo na produção de L-selectina em neutrófilos humanos estimulados ou não com LPS. Dexametasona foi utilizado como controle positivo.....	83
Figura 32- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de <i>K. pinnata</i> e do isolado quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo na produção de IL-8 em neutrófilos humanos estimulados ou não com LPS. Dexametasona foi utilizado como controle positivo.....	84
Figura 33- Vias intracelulares envolvidas no mecanismo de cicatrização de úlceras gástricas.....	94

Lista de tabelas

Tabela1- Concentrações de extrato bruto de <i>Kalanchoe. pinnata</i> , QAR isolado de <i>Kalanchoe. pinnata</i> e dexametasona utilizados na avaliação do potencial anti-inflamatório.....	54
Tabela 2- Rendimento da droga vegetal de <i>K. pinnata</i> após o processo de secagem.....	58
Tabela 3- Rendimento do extrato bruto de <i>K. pinnata</i> após o processo de secagem.	58
Tabela 4- Rendimento das frações preparadas a partir de 80g de extrato bruto de <i>K. pinnata</i>	59
Tabela 5- - Carga microbiana encontrada na droga vegetal de <i>K. pinnata</i>	62
Tabela 6- Quantidade de endotoxinas presentes no extrato bruto e fração acetato de etila de <i>K. pinnata</i> em EU/kg.....	62
Tabela 7- Dados de RMN ¹ H (500 MHz) de mearnsetina-3-O-pentosilramnopiranosideo (2), substância isolada de <i>Kalanchoe pinnata</i>	66
Tabela 8- Identificação dos constituintes químicos do extrato bruto e fração acetato de etila de <i>K. pinnata</i> por LC-ESI-MS ²	67
Tabela 9- Atividade antioxidante pelo método ORAC do extrato bruto e fração acetato de etila de <i>K.pinnata</i> . Os resultados estão expressos como média e desvio padrão.....	79

Lista de abreviaturas e siglas

ACN	Acetonitrila
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
Cag-PAI	Ilha da patogenicidade cag
CAT	Catalase
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Enzima ciclooxigenase
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CRF	Fator de liberação de corticotrofina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização electrospray
EP-1	Receptor 1 de prostaglandina E ₂
EP-3	Receptor 3 de prostaglandina E ₂
EP-4	Receptor 4 de prostaglandina E ₂
EU	Unidade de endotoxina
GMPCc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HE	Hematoxilina-eosina
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IP	Iodeto de propídeo
LAL	Lisado de Amebócitos de Limulus
L-NAME	<i>N- nitro-L-arginine methyl-ester</i>
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
NEM	<i>N- etilmaleimide</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio

PDA	<i>Photodiode Array</i>
PGD ₂	Prostaglandina do tipo D ₂
PGE ₂	Prostaglandina do tipo E
PGF _{2α}	Prostaglandina do tipo F _{2α}
PGI ₂	Prostaciclina
PIF	<i>Photo Irradiation Factor</i>
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
QAR	Quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil -(1 \rightarrow 2) - α -L-ramnopiranosídeo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SH	Grupamento sulfidrila
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Ágar triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1.Introdução.....	20
2. Revisão Bibliográfica.....	23
2.1 <i>Kalanchoe pinnata</i>	24
2.2 Estômago.....	26
2.2.1 Mecanismos de Defesa da Mucosa Gástrica.....	26
2.2.2 Úlcera Péptica.....	29
2.2.3 Antioxidantes na Defesa da Mucosa Gástrica.....	31
2.2.4 Inflamação e Marcadores Inflamatórios.....	33
3.Objetivos.....	34
4.Metodologia.....	36
4.1 Coleta do Material Vegetal.....	37
4.2 Elaboração do Extrato Bruto e Fracionamento.....	37
4.3 Avaliação da Citotoxicidade.....	38
4.4 Avaliação da Fototoxicidade.....	39
4.5 Carga Microbiana.....	40
4.6 Endotoxinas.....	41
4.7 Avaliação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> do extrato bruto de <i>K. pinnata</i> ...	41
4.8 Quantificação da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo no Extrato Bruto de <i>K. pinnata</i>	42
4.9 Identificação de Substâncias presentes no Extrato Bruto e Fração Acetato de Etila de <i>K. pinnata</i>	43
4.10 Ensaio Biológicos.....	44
4.10.1 Animais.....	44
4.10.2 Atividade Antiúlcera Aguda do Extrato Bruto - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico.....	44
4.10.3 Atividade Antiúlcera Aguda da Fração Acetato de Etila - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico.....	45

4.10.4 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com Indometacina.....	46
4.10.5 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com Etoricoxibe.....	46
4.10.6 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com <i>N-ethylmaleimide</i> (NEM).....	47
4.10.7 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com <i>N-nitro-L-arginine methyl-ester</i> (L-NAME).....	47
4.10.8 Úlcera Subaguda- Modelo de Indução por Ácido Acético.....	48
4.11 Análise Histológica e Imuno-Histoquímica.....	48
4.12 Ensaio de Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	49
4.13 Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes.....	50
4.14 Avaliação da Atividade Antioxidante em Homogenato de Estômago pelo Método de ORAC.....	51
4.15 Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	52
4.15.1 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio).....	52
4.15.2 Avaliação do Potencial Anti-inflamatório de <i>K. pinnata</i>	52
4.15.3 Isolamento e Cultura de Neutrófilos.....	52
4.15.4 Ensaio de Integridade de Membrana (Necrose Celular).....	54
4.15.5 Ensaio de fragmentação de DNA (Apoptose).....	55
4.15.6 Determinação de Marcadores Inflamatórios (ELISA).....	55
4.16. Forma de Análise dos Resultados.....	56
5. Resultados.....	57
5.1 Elaboração do Extrato Bruto e das Frações.....	58
5.1.1 <i>Kalanchoe pinnata</i>	58
5.2 Avaliação da Citotoxicidade.....	59
5.3 Avaliação da Fototoxicidade.....	60
5.4 Carga Microbiana.....	61
5.5 Endotoxinas.....	62
5.6 Avaliação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> do Extrato Bruto de <i>K. pinnata</i> ..	62

5.7	Quantificação da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo no Extrato bruto de <i>K. pinnata</i>	62
5.8	Identificação de Substâncias presentes no Extrato Bruto e Fração Acetato de Etila de <i>K. pinnata</i>	64
5.9	Atividade Antiúlceras.....	68
5.9.1	Atividade Antiúlceras Aguda do Extrato Bruto - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico.....	68
5.9.2	Atividade Antiúlceras Aguda da Fração Acetato de Etila - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico.....	69
5.9.3	Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com Indometacina.....	69
5.9.4	Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com Etoricoxibe.....	70
5.9.5	Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com <i>N- ethylmaleimide</i> (NEM).....	71
5.9.6	Úlceras Gástricas Induzidas por Etanol Acidificado em Animais Pré- Tratados com <i>N-nitro-L-arginine methyl-ester</i> (L-NAME).....	72
5.9.7	Úlceras Subagudas- Modelo de Indução por Ácido Acético.....	73
5.9.8	Análise Histológica e Imuno-Histoquímica.....	74
5.10	Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes.....	78
5.11	Avaliação da Atividade Antioxidante em Homogenato de Estômago pelo Método de ORAC.....	79
5.12	Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	79
5.12.1	Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio).....	79
5.13	Avaliação do Potencial Anti-inflamatório de <i>K. pinnata</i>	80
5.13.1	Ensaio de Integridade de Membrana (Necrose Celular).....	80
5.13.2	Ensaio de Fragmentação do DNA (Apoptose).....	80
5.13.3	Determinação de Marcadores Inflamatórios (ELISA).....	81
5.13.3.1	TNF- α	81
5.13.3.2	L-Selectina.....	82
5.13.3.3	IL-8.....	84

6. Discussão.....	85
7. Conclusão.....	101
Referências.....	104
Apêndice.....	119
Anexo.....	134

Introdução

1. Introdução

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae) é uma espécie muito utilizada na medicina tradicional no Brasil e em outras partes do mundo, especialmente Índia, África e China (FÜRER et al., 2016; MILAD et al., 2014). No Brasil, está incluída na Relação Nacional de Plantas com Interesse ao SUS (BRASIL, 2017). Popularmente é denominada de folha-da-fortuna, coirama, courama, courama-vermelha ou saião roxo. A espécie é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias, úlceras gástricas, queimaduras, diarreia, vômito, picadas de insetos, dores no corpo e como agente antifúngico e antibacteriano (KAMBOJ; SALUJA, 2009; FÜRER et al., 2016). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de diversas classes de compostos, em especial, os flavonoides.

Durante o mestrado (2011-2013) foram realizados experimentos de atividade antiúlcera do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa das folhas da espécie *K. pinnata*, além de estudos fitoquímicos. Devido a resultados promissores pretendeu-se dar continuidade ao estudo com esta espécie, visando seus mecanismos de ação.

A úlcera péptica é uma patologia que possui uma importância econômica global devido a sua incidência e prevalência relevantes e ampla distribuição geográfica (BUCCIARELLI et al., 2010; BI et al., 2014). De acordo com Lin et al. (2011), no período de 1980-2009 a taxa de incidência, na população mundial, de úlceras pépticas sem complicações é de aproximadamente 1 caso para 1000 pessoas/ano. Já para úlceras que apresentam complicações, tais como sangramento e perfurações, é de 0,7 caso em relação a 1000 pessoas/ano.

Diversas alternativas terapêuticas estão disponíveis no mercado para o tratamento de úlceras pépticas. Os medicamentos mais utilizados são os inibidores da bomba de prótons e os antagonistas dos receptores H₂ (GOODMAN; GILMAN, 2007). Quando a úlcera gástrica é decorrente da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* é necessário associar antimicrobianos ao tratamento com antagonistas dos receptores de H₂ ou inibidores da bomba de prótons (MÖSSER; CACA, 2005). Entretanto, há relatos de efeitos adversos associados a estas terapias, como: diarreia, tontura, náusea, ginecomastia, aumento do risco de demência em idosos, indução de hiperplasia nas células gástricas, deficiência de vitamina B₁₂, risco de pneumonia, aumento do risco de infecção por *Clostridium difficile* ocasionando colite e distúrbio na microbiota intestinal humana, hipomagnesemia, osteoporose (KESZTHELYI et al., 2010; LAM et al., 2013 ; PÉREZ-COBAS et al., 2013; TLEYJEH et al., 2013; HAENISCH et al., 2015; KSIADZYNA; SZELAG; PARADOWSKI, 2015; YU et al., 2017).

Dessa maneira, pesquisa com foco em plantas medicinais para a procura de uma alternativa para o tratamento com fármacos sintéticos é interessante, além de proporcionar recursos para alcançar a qualidade da cicatrização de úlceras e prevenir recorrências (AWAAD et al., 2013; BI et al., 2014; KANGWAN et al., 2014). Ademais, alguns flavonoides, tem atividade contra úlceras gástricas (MOTA et al., 2009).

Assim, foi proposto um estudo com a finalidade de sugerir possíveis mecanismos de ação pelos quais o extrato bruto e fração acetato de etila, obtidos das folhas *K. pinnata*, estão envolvidos na atividade gastroprotetora e cicatrizante de úlceras gástricas. Além disso, o potencial anti-inflamatório também foi avaliado, pela produção das citocinas TNF- α , IL-8 e L-selectina em neutrófilos.

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Kalanchoe pinnata*

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Figura 1), cujos sinônimos são *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, *Bryophyllum calycinum* Salisb, *Cotyledon pinnata* (Lam.) ou *Verea pinnata* (Lam.) Spreng (TROPICOS, 2017; PLANT LIST, 2017), pertence à família Crassulaceae. O gênero *Kalanchoe* compreende centenas de espécies que são nativas de áreas tropicais, como Brasil e África (MILAD et al., 2014).

K. pinnata é uma espécie herbácea originária de Madagascar. Desenvolve-se em lugares quentes e úmidos e alcança até 1,5 metro de altura. Suas folhas são opostas, suculentas, ovaladas e de margem crenada com 10 a 20 cm de comprimento. As folhas inferiores são geralmente simples, enquanto as superiores são constituídas por 3 a 7 folíolos, longo-pecioladas. Suas flores medem 5 cm de comprimento, são violáceas, pendentes e em cachos. Os frutos são membranáceos e as sementes elipsóides (KAMBOJ; SALUJA, 2009; LORENZI; MATOS, 2008).

É popularmente chamada de folha-da-fortuna, courama, coirama, folha-de-pirarucu, pirarucu, diabinho, roda-da-fortuna e folha grossa (LORENZI; MATOS, 2008). Esta espécie é utilizada na medicina tradicional de regiões tropicais, onde o clima favorece o crescimento espontâneo, tais como Brasil, Madagascar, Índia, entre outros. Folhas e caules, devido ao seu efeito adstringente, são utilizados contra diarreia, flatulência e vômito. Herbalistas na Nigéria usam o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* para o tratamento da tosse e na profilaxia da asma. Além do tratamento das diversas patologias citadas acima é reportado seu uso para o tratamento de doenças inflamatórias, úlceras gástricas, queimaduras, picadas de insetos, dores no corpo e como agente antifúngico e antibacteriano (FÜRER et al., 2016; KAMBOJ; SALUJA, 2009). Na medicina antroposófica *K. pinnata* é atualmente utilizada para o tratamento de parto prematuro e distúrbios do sono. Preparações de *K. pinnata* são manufaturadas pelo empresa multinacional Weleda AG em diversas formas galênicas, como pó, cápsulas, gotas e injetáveis (FÜRER et al., 2016).

Figura 1- Partes aéreas de *Kalanchoe pinnata*



Legenda: Folhas (1, 2) e flores (3) de *Kalanchoe pinnata*.
 Fonte: Sobreira (2013) (1); <http://www.tropicos.org/> (2,3).

A literatura aponta diversas propriedades medicinais para *K. pinnata*, tais como anti-inflamatória (AFZAL et al. 2012; FERREIRA et al., 2014), cicatrizante (NAYAK; MARSALL; ISITOR, 2010), antimicrobiana e citotóxica (EL ABDELLAOUI et al., 2010; BISWAS et al., 2011), anti-hipertensiva (BOPDA et al., 2014) hepatoprotetora (YADAV; DIXIT, 2003), leishmanicida (SILVA et al., 1995, MUZITANO et al., 2006a; MUZITANO et al., 2006b; MUZITANO et al., 2009), antialérgica (CRUZ et al., 2012), antitumoral (SUPRATMAN et al., 2001) e tocolítica (SIMÕES WÜST et al., 2010). Alguns estudos realizados revelaram a atividade antioxidante de *K. pinnata* utilizando o método *in vitro* estabelecido pela medida de capacidade sequestrante de radicais livres através do DPPH (2,2'-difetil-1-picril-hidrazila) (GUPTA et al., 2009; MAJAZ et al.; 2011; TATSIMO et al.2012).

Foram encontrados três trabalhos na literatura relatando estudos de atividade antiúlcera de *K. pinnata* (PAL; CHAUDHURI, 1991; PEREZ; CORREA; BORGES, 1999; ADESANWO et al., 2007). No entanto, esses trabalhos revelaram conclusões parciais, já que não relacionaram a atividade biológica encontrada com os componentes fitoquímicos presentes na amostra. Além disso, não abordaram o mecanismo pelo qual *K. pinnata* promove a gastroproteção e cicatrização de úlceras gástricas.

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de ácidos orgânicos (PUCHER, 1942; MARRIAGE; WILSON, 1971), alcaloides (OKWU; JOSIAH, 2006; BISWAS et al., 2011), ácidos graxos (ALMEIDA et al., 2000), bufadienolídeos (YAMAGISHI et al., 1989; SUPRATMAN et al., 2001; KAMBOJ; SALUJA, 2009), esteroides (KAMBOJ; SALUJA, 2010; BISWAS et al., 2011; AFZAL et al., 2012), gomas, carboidratos, mucilagem, (MORTON, 1990; KAMBOJ; SALUJA, 2010; BISWAS et al., 2011), saponinas (OKWU;

JOSIAH, 2006; BISWAS et al., 2011), taninos (OKWU; JOSIAH, 2006; CHATURVEDI; JOSHI; DUBEY, 2012), terpenos (SIDDIQUI et al., 1989; KAMBOJ; SALUJA, 2010) e em especial de flavonoides, sendo que vários foram isolados da espécie *K. pinnata* (GAIND; GUPTA, 1971; MUZITANO et al., 2006a; MUZITANO et al., 2006b; TATSIMO et al., 2012; FÜRER et al., 2013).

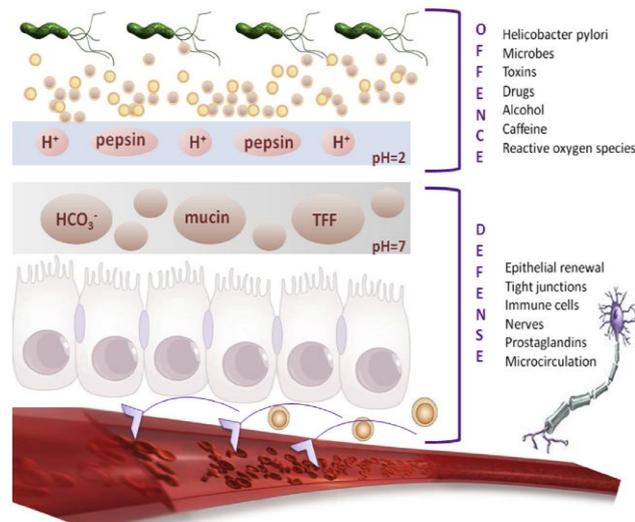
2.2 Estômago

A abordagem sobre anatomia do estômago e fisiologia gástrica foi discorrida na dissertação do mestrado (SOBREIRA et al., 2013). Assim, definiu-se abordar fatores envolvidos na proteção da mucosa gástrica e o cenário atual sobre a úlcera péptica.

2.2.1 Mecanismos de Defesa da Mucosa Gástrica

A mucosa gástrica é exposta continuamente a várias substâncias tóxicas. Dessa maneira, para assegurar a sua integridade mecanismos de defesa, que incluem componentes pré-epitelial, epitelial e pós-epitelial são primordiais (Figura 2). O componente pré-epitelial inclui barreira muco – bicarbonato garantindo a primeira linha de proteção para a parede gástrica. O componente epitelial consiste de uma contínua camada de células interconectadas por junções oclusivas formando uma barreira. Esta barreira está envolvida na produção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, entre outros. Por fim, o componente pós-epitelial da defesa da mucosa gástrica inclui contínuo fluxo sanguíneo na mucosa, geração de prostaglandinas e óxido nítrico (LAINE et al., 2008; TARNAWSKI, 2010; TARNAWSKI et al 2014).

Figura 2- Ação dos fatores lesivos sobre a barreira gástrica.



Fonte: Boltin et al., (2014).

Prostaglandinas

As prostaglandinas possuem um papel primordial na defesa da mucosa gástrica (WALLACE, 2008). A maioria das prostaglandinas produzidas pela mucosa gástrica no homem e nos roedores são PGE₂ e PGI₂, com menor quantidade de PGF_{2α} e PGD₂ (WALLACE et al., 2008). A ação protetora das prostaglandinas E₂ é mediada principalmente via receptor EP-1, enquanto que receptores EP-3 e EP-4 estão envolvidos na secreção ácida e secreção de muco, respectivamente (LAINE, 2008).

Prostaglandinas estão associadas com a proteção da mucosa gástrica, pelo fato de estimular a secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, aumentar a microcirculação gástrica, os compostos sulfidril e, na mucosa gástrica, reduzir a permeabilidade do epitélio e consequentemente, a retro-difusão de ácido, além de reduzir a liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1, entre outros, e diminuir a aderência dos leucócitos no endotélio vascular (BRZOZOWSKI, 2005; LAINE et al., 2008; WALLACE, 2008). Todos estes efeitos corroboram para acelerar a cicatrização de úlceras gástricas (WALLACE, 2008).

Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO), em conjunto com as prostaglandinas, são importantes mediadores envolvidos na gastroproteção, já que promovem a vasodilatação dos vasos

sanguíneos do sistema gastrointestinal contribuindo para a manutenção da integridade da mucosa gástrica. Há três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial e NOS neuronal, ambas são constitutivas, e NOS induzível, expressa em macrófagos e neutrófilos. O NO é sintetizado pela conversão de L-arginina para L-citrulina pela NOS. O NO se difunde para o endotélio dos músculos lisos, onde reage com guanilil ciclase solúvel (GCs), conduzindo a um aumento celular do segundo mensageiro, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc age via proteína quinase G, relaxando as células dos músculos lisos, com subsequente aumento do diâmetro do vaso e também do fluxo sanguíneo (LANAS, 2008; SZLACHCIC, 2013; MAGIEROWSKI, 2015).

Grupamento Sulfidrila (SH)

Os grupamentos sulfidrila também participam do mecanismo de gastroproteção evidenciado pelos agentes alquilantes, como *N-etilmaleimide* (NEM) que reverte qualquer forma de proteção da mucosa gástrica (SZABO, 2014).

Compostos sulfidrila tais como a glutathiona reduzida (GSH), encontrada em altas concentrações no estômago, sequestram radicais livres que são responsáveis por ocasionar injúria ao tecido. Também estão relacionados com a produção e manutenção do muco gástrico e com efeito vasoprotetor. Depleção de GSH aumenta a peroxidação lipídica (SZABO, 1990; AVILA et al., 1996)

Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

A angiogênese é uma etapa fundamental para o restabelecimento da microvasculatura gástrica tornando-se essencial para a cicatrização de úlceras gástricas (TARNAWSKI et al., 2014). O VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) induz a migração celular endotelial na cicatrização de lesões através de dois mecanismos, quimiotaxia (interação de células de adesão com a matriz extracelular) e vasodilatação, mediada pelo óxido nítrico e prostaciclina (BAO et al., 2009). O fator desencadeante é a hipóxia tecidual, ativando o gene que codifica este fator de crescimento ocasionando a migração, proliferação e formação de vasos capilares restaurando a rede microvascular a partir de células endoteliais (TARNAWSKI et al., 2014).

2.2.2 Úlcera Péptica

A úlcera péptica representa relevante importância clínica, pois é uma das mais comuns patologias do sistema digestório (MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL; 2009; ARAUJO; BORINI; GUIMARÃES, 2014). São lesões que podem se localizar na mucosa gástrica ou duodenal. Apresenta-se como descontinuidade da mucosa do trato alimentar que se estende através da muscular da mucosa em direção à submucosa ou mais profundamente. São lesões crônicas, geralmente, solitárias com menos de 4 cm de diâmetro (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Histologicamente a úlcera consiste em duas grandes estruturas: a margem da úlcera formada pela mucosa adjacente não necrosada (o componente epitelial) e o tecido de granulação na base da úlcera (componente de tecido conectivo), que consiste de fibroblastos, macrófagos e a ocorrência de proliferação de células endoteliais formando microvasos (TARNAWSKI, 2005, 2010).

De acordo com a revisão publicada de Araújo et al. (2014), a úlcera duodenal é geralmente diagnosticada em pacientes jovens, principalmente homens. Já a úlcera gástrica ocorre mais comumente em pacientes adultos e idosos. No Brasil, dados epidemiológicos revelaram que úlceras duodenais são mais prevalentes do que úlceras gástricas, na proporção de 3:1, respectivamente. No Reino Unido a incidência de úlcera péptica foi 12% maior em homens do que em mulheres (ARAUJO; BORINI; GUIMARÃES, 2014). A alta incidência desta doença ocorre geralmente em fumantes e usuários regulares de AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais). A taxa de recorrência da úlcera após o tratamento é alta, em torno de 60%. Além disso, apresenta um significativo impacto econômico. Por exemplo, o custo médio anual com serviços médicos para seu tratamento é de US\$23819 nos Estados Unidos (BI et al., 2014).

A patogênese das úlceras pépticas é resultante do desequilíbrio entre fatores protetores (prostaglandinas, muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, NO, dentre outros) e lesivos (pepsina, ácido clorídrico e radicais livres) (KUMAR et al.; 2008; MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL, 2009). Vários estímulos estão relacionados à produção de fatores lesivos. Abaixo serão comentados os principais.

O estômago é exposto a uma quantidade maior de etanol ingerido, que qualquer outro órgão (BOLTIN et al., 2014). O contato direto da mucosa gástrica com o etanol induz modificações funcionais e metabólicas, entre elas dano ao endotélio vascular da mucosa

gástrica, desordem na microcirculação e isquemia resultando em aumento da produção de radicais livres (PAN et al., 2008; DOS REIS LÍVERO et al., 2016).

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (bactéria gram-negativa) também é um fator que pode desencadear o aparecimento lesões gástricas. Estudos epidemiológicos revelaram a forte associação entre a infecção por *H. pylori* com úlceras gástricas e duodenais. Aproximadamente 50% da população mundial está infectada por *H. pylori*. Cerca de 1 a 10% dos pacientes infectados desenvolverão úlceras pépticas e 0,1 a 3% serão acometidos com carcinoma gástrico. No entanto, grande parte dos infectados nunca desenvolverão os sintomas relacionados com a infecção desta bactéria. (MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL, 2009; MALNICK et al., 2014). Dados epidemiológicos, reportados em um trabalho de revisão, revelaram a prevalência da infecção em uma limitada população em vários estados brasileiros. Alta prevalência (59,5% e 96%) foi observada no Rio de Janeiro (RJ) e em São Luis (MA), respectivamente. Em São Paulo (SP), a prevalência foi abaixo de 65,6% em população de classe alta (ARAUJO; BORINI; GUIMARÃES, 2014). Diversos fatores, que incluem o sistema imune do hospedeiro e a cepa da bactéria, estão envolvidos com a severidade da doença associada à infecção com *H. pylori*. Cepas de *H. pylori* que contém um fragmento genômico que codifica a ilha da patogenicidade *cag* (*cag-PAI*) são mais virulentas em comparação com as cepas de *H.pylori* que não possui esta ilha de patogenicidade (FARZAEI; ABDOLLAHI; RAHIMI, 2015).

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) são medicamentos que promovem efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, sendo assim, muito utilizados pela população mundial. Seu uso, entretanto, é associado a complicações maléficas na mucosa gástrica (GOLDSTEIN; CRYER, 2015). O principal mecanismo dos AINES está relacionado com a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), prejudicando a produção de prostaglandinas. Além disso, altera o metabolismo do ácido araquidônico da via COX para via da 5-lipoxigenase (LOX), conduzindo a produção de leucotrienos. Portanto, os leucotrienos estão sendo investigados como potenciais mediadores no dano da mucosa gástrica (BOLTIN, 2014).

O estresse é uma ameaça aguda à homeostase de um organismo, que pode facilitar o desenvolvimento de úlceras gástricas. O fator de liberação de corticotrofina (CRF) é um importante mediador na resposta fisiológica ao estresse (BHATIA; TANDON, 2005). Em situação de estresse ocorrerá a liberação de adrenalina e cortisol pela glândula suprarrenal. O excesso da liberação de ambos pode ocasionar o aumento de secreção de ácido clorídrico e pepsinogênio, diminuição da liberação de muco acarretando no aparecimento dessas lesões (MARSOLLA, 2009).

O tabagismo também é um risco importante que contribui para a patogênese da úlcera péptica e também para o retardo na cicatrização dessas lesões. Há mais de 5000 substâncias presentes no cigarro, dentre estas 150 são alcaloides, compostos fenólicos, aldeídos voláteis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), nitrosaminas e metais pesados. Estes grupos de substâncias podem ocasionar morte celular, inibir a renovação celular, diminuição do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, além de estarem envolvidos com o aparecimento de vários tipos de câncer do trato gastrointestinal (LI et al., 2014).

2.2.3 Antioxidantes na Defesa da Mucosa Gástrica

O estresse oxidativo é um estado de nível elevado de espécies reativas de oxigênio (ROS) que ocasiona uma variedade de condições que estimulam tanto a produção adicional de ROS ou o declínio da defesa antioxidante (SUZUKI et al., 2012). Espécies reativas de oxigênio são produzidas em resposta a radiação ultravioleta, cigarro, consumo exacerbado de bebidas alcoólicas, ingestão de AINE (anti-inflamatório não esteroidal), poluição, entre outros. Estes fatores têm sido implicados em diversas patologias, incluindo a úlcera péptica (BHATTACHARYYA et al., 2014). Isso porque a interação dos radicais com DNA, lipídeos e proteínas resulta no dano celular e injúria ao tecido, acarretando no desenvolvimento da inflamação (NILE et al., 2012; RUBIÓ; MOTILVA; ROMERO, 2013). Entretanto, a exposição aos radicais livres provenientes de várias fontes conduziu o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa podendo ser preventivos, reparadores e de defesa antioxidante. Defesas antioxidantes enzimáticas incluem superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Antioxidantes não-enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenoides, flavonoides, entre outros (VALKO, et al., 2007).

Catalase (CAT)

A catalase (CAT) é uma enzima que contém o grupamento heme no centro catalítico. Está envolvida na conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e O_2 . Esta enzima é encontrada em organelas celulares, como peroxissomos e também nas mitocôndrias e retículo endoplasmático, porém em quantidades menores (LIMÓN PACHECO; GONSEBATT, 2009; PRIYA; PARMINDER; JASPREET, 2012).



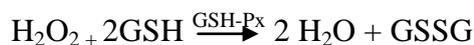
Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio como produto final da dismutação. Há três isoformas de SOD que estão localizadas no citoplasma, mitocôndria ou no compartimento extracelular. Todas possuem um íon metal como centro catalítico. A SOD citoplasmática e extracelular possui íons cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), enquanto que a SOD mitocondrial possui íon manganês (Mn-SOD). Outra isoforma de SOD contém ferro no centro catalítico, no entanto, esta enzima é predominante em células procariontes, como por exemplo, bactérias (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; KWIECIEN et al., 2014).



Glutathiona Peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase (GPx) possui um importante papel na proteção das células contra efeitos deletérios da decomposição de peróxidos. Isoenzimas de GPx são encontradas em compartimentos citoplasmático, mitocondrial e extracelular. A GPx converte a glutathiona (GSH), um tripeptídeo que consiste de glutamato, cisteína e glicina, em glutathiona oxidada (GSSG) ocorrendo a redução do peróxido de hidrogênio em água e de hidroperóxidos lipídicos em correspondentes alcoóis estáveis (BHATTACHARYYA et al., 2014; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009).



Kwiecien et al. (2014) relataram que a formação de lesões gástricas está relacionada à alteração do status antioxidante da mucosa gástrica, acompanhada pela diminuição da atividade de SOD, bem como da depleção de GSH. Antioxidantes são substâncias biologicamente ativas, podendo ser provenientes de alimentos, na maioria oriundos de plantas (PRIYA; PARMINDER; JASPREET, 2012; PHAM-HUY; HE; HAM-HUY, 2008) que fornecem benefícios à saúde. Compostos polifenólicos, que incluem os flavonoides, possuem um potencial antioxidante. Estes compostos agem no sequestro de radicais livres, na redução de peróxidos, na interrupção de reação em cadeia dos radicais, nas propriedades

de quelação dos metais e na ativação de enzimas antioxidantes, como CAT e SOD (FARZAEI; ABDOLLAHI; RAHIMI, 2015).

2.2.4 Inflamação e Marcadores Inflamatórios

A inflamação em qualquer órgão é a primeira defesa fisiológica, que inicia com rápidas mudanças vasculares (aumento de permeabilidade e fluxo sanguíneo), seguida por eventos celulares (infiltração de células inflamatórias, característica de inflamação aguda ou crônica) (SZABO et al., 2014).

Neutrófilos, também denominados de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são células sanguíneas brancas mais abundantes na circulação humana. Estas células se originam rapidamente da proliferação de células progenitoras localizadas na medula óssea marrom. Possuem um papel crucial na defesa imune inata contra patógenos (bactérias e fungos) e também estão envolvidos no desenvolvimento da reação inflamatória. A migração dos neutrófilos para o sítio inflamatório ocorre quando há uma injúria tecidual e/ou infecções. É resultante de uma série de eventos altamente coordenados envolvendo a super-regulação da expressão de moléculas de adesão e apresentação dos quimioatraentes. Estes eventos incluem dilatação arteriolar, devido ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido, adesão dos neutrófilos circulantes ao endotélio e aumento da permeabilidade de capilares e vênulas às proteínas plasmáticas e fluidos. O processo de captura e subsequente rolamento dos leucócitos até o endotélio é regulado pelas selectinas. L-selectina é expressa nos leucócitos e contribui para que os neutrófilos se liguem a células endoteliais, que são ativadas pelas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF e outras produzidas em locais de inflamação (IVETIC; RIDLEY, 2004; ABBAS et al., 2011).

A secreção de citocinas é de fundamental importância na resposta inflamatória. Fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) são as principais citocinas envolvidas na inflamação. Possuem efeitos no endotélio, nos leucócitos e fibroblastos e induzem reações sistêmicas de fase aguda, estimulando a expressão das moléculas de adesão endotelial e secreção de outras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanoides e NO (KUMAR et al., 2010). A IL-8 é um dos mais potentes quimioatraentes para neutrófilos. Esta quimiocina é produzida em resposta a vários estímulos pro-inflamatórios produzidos por neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, entre outras (KOBAYASHI et al., 2010).

Objetivos

3. Objetivos

O presente projeto visa ao estudo das folhas de *Kalanchoe pinnata*, como um novo potencial terapêutico mais efetivo e seguro no combate de úlceras gástricas.

São objetivos específicos:

- Avaliar o potencial citotóxico e fototóxico do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.
- Verificar a carga microbiana na droga vegetal e no extrato bruto de *K. pinnata*;
- Verificar a presença de endotoxina no extrato bruto e na fração acetato de etila de *K. pinnata*, por meio de ensaio *in vitro*;
- Avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori* do extrato bruto de *K. pinnata*;
- Realizar o perfil cromatográfico do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* e identificar substâncias (prováveis marcadores);
- Quantificar a substância majoritária quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopiranosídeo no extrato bruto de *K. pinnata*;
- Avaliar os mecanismos de ação envolvidos na ação gastroprotetora do extrato bruto e na fração acetato de etila de *K. pinnata*, por meio do envolvimento de COX-1, COX-2, NO e grupamentos sulfidríla;
- Avaliar a atividade cicatrizante do extrato bruto de *K. pinnata*, por meio de análise histológica e imuno-histoquímica, bem como avaliar a atividade antioxidante das enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase possivelmente envolvidas nos mecanismos de ação;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* e do homogenato de estômago de ratos tratados com extrato bruto de *K. pinnata* pela metodologia de ORAC;
- Verificar o potencial anti-inflamatório do extrato bruto de *K. pinnata* e da sua substância majoritária, quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopiranosídeo, em neutrófilos humanos estimulados por LPS, por meio da produção das citocinas TNF- α , IL-8 e L-selectina.

Metodologia

4. Metodologia

4.1 Coleta do Material Vegetal

Folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae), foram fornecidas pelo Dr. Ílio Montanari Junior, Coordenador da Divisão de Agrotecnologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP). Diversas coletas foram realizadas ao longo de dois anos. Exsicata de *K. pinnata* foi depositada no herbário CPMA (Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas), localizado no CPQBA-UNICAMP, sob número 337. A espécie foi identificada pela botânica Kátia Calago.

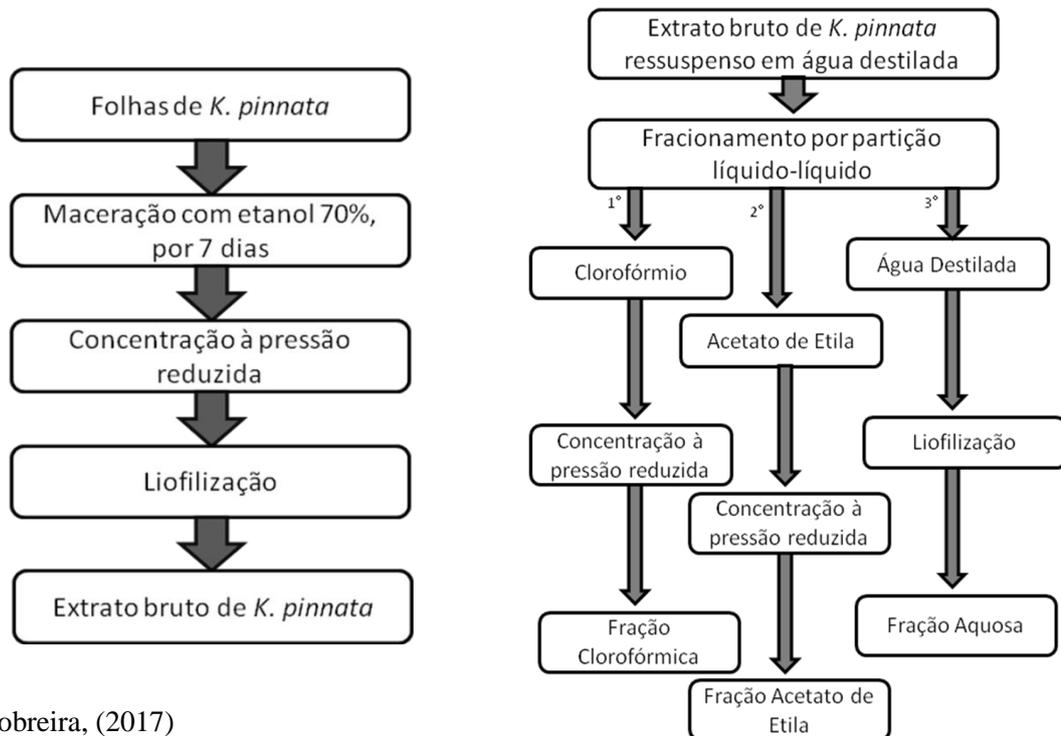
4.2 Elaboração do Extrato Bruto e Fracionamento

As folhas de *K. pinnata* foram rasuradas e secas em estufa de circulação de ar, à uma temperatura de 40°C até completa secagem.

O extrato bruto foi elaborado por maceração. No processo por maceração, as folhas rasuradas ficaram em contato com o líquido extrator, etanol 70% por 7 dias, na proporção 1:10 (massa da droga vegetal *versus* líquido extrator). O procedimento foi realizado de acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). O extrato hidroetanólico 70% foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 40°C, resultando no extrato bruto. A água remanescente do extrato bruto foi retirada pelo processo de liofilização.

O extrato bruto liofilizado de *K. pinnata*, ressuspenso em água destilada, foi fracionado por partição líquido-líquido com clorofórmio e acetato de etila na proporção de 10g de extrato para 100 mL de solvente. Foram realizadas três extrações com cada solvente. Primeiramente, a amostra foi dissolvida em água destilada e transferida para um funil de separação. Efetuada esta etapa, foi adicionado o solvente clorofórmio. Essa mistura foi submetida à agitação. A fração clorofórmica foi recolhida, filtrada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida à temperatura de 40°C. Da mesma maneira ocorreu a extração com o solvente acetato de etila. A fração aquosa foi liofilizada (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática da elaboração do extrato bruto e frações de *Kalanchoe pinnata*.



Fonte: Sobreira, (2017)

4.3 Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob coordenação da Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Santos Lopes.

A avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* foi realizada em células de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 clone A31 ATCC CCL-163, com passagem celular correspondente a P21 (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010). As amostras foram diluídas em DMSO (0,5%) e as diluições realizadas em meio DMEM, suplementado com Soro Bovino Fetal (10%). A interferência do DMSO foi avaliada, testando-os nas mesmas concentrações e condições nas amostras. As concentrações testadas para o extrato bruto de *K. pinnata* foram de 0,11 a 1,6 mg/mL. Já as concentrações testadas para a fração acetato de de etila de *K. pinnata* foram de 0,03 a 0,4 mg/mL. Para ambas as diluições foram utilizadas o fator de diluição de 1,47 (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010), obtendo-se seis concentrações intermediárias as anteriormente descritas.

Foram semeadas 20.000 células de BALB/c 3T3 em cada poço, em placa de 96 poços e incubadas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, por 24 horas. Em seguida, 100 µL de cada diluição, em sextuplicata, foram adicionadas. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados com solução salina a 0,9% (p/v) e, então, adicionados 100 µL de corante vital Neutral Red em meio de cultura. Passados três horas, os poços foram aspirados e foram adicionados 150 µL de solução “dessorb” (49% (v/v) de água destilada, 1% (v/v) de ácido acético glacial e 50% (v/v) de álcool etílico) e após 10 minutos de agitação em agitador de placas, a leitura das absorbâncias foi realizada em 540 nm em Leitor de Placas *Multi - Detection microplate reader Synergy* – BIOTEK.

Os resultados foram analisados pelo programa Phototox® e calculados os valores de IC₁₀ (concentração que inibe 10% de células desafiadas) e IC₅₀ (concentração que inibe 50% de células desafiadas). O valor de IC₅₀ foi utilizado para predizer um valor de DL₅₀, com o auxílio da equação abaixo (Equação 1), podendo ser utilizado como dose de início no ensaio de toxicidade oral aguda (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010).

Equação 1. Determinação da Dose Letal Mediana para Misturas

$$\text{Log LD}_{50} (\text{mg/kg}) = 0,372 \times \text{log IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2,024$$

Onde:

LD₅₀ - dose letal mediana; IC₅₀ - concentração que inibe 50% de células desafiadas (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010).

4.4 Avaliação da Fototoxicidade

O ensaio de fototoxicidade foi realizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob coordenação da Prof^a Dr^a Patrícia Santos Lopes.

O ensaio de fototoxicidade foi realizado para o extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*, conforme o teste validado preconizado pela Organisation for Economic Co-operation and Development (2004). DMSO (0,5%) foi utilizado para solubilizar as amostras e as diluições realizadas em PBS suplementado com 0,1% de cálcio e 0,13% de magnésio. Foram preparadas concentrações entre 0,01 a 0,18 mg/mL para o extrato bruto de *K. pinnata* e 0,003 a 0,04 mg/mL para a fração acetato de etila de *K. pinnata*, utilizando 1,47 como fator de diluição.

Foram semeadas 20.000 células de BALB/c 3T3 clone A31 (ATCC CCL-163) em cada poço, em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas. A passagem celular para o experimento corresponde a P7. Foram preparadas duas placas para cada amostra (extrato bruto, fração acetato de etila de *K. pinnata* e DMSO). As placas foram condicionadas por 1 hora em incubadora de CO₂, antes da exposição à radiação UVA. Três placas de amostras foram submetidas à exposição da luz UVA, enquanto que as três restantes foram mantidas nas mesmas condições, porém sem a exposição da luz UVA, durante 1 hora e 30 minutos, para alcançar 5 J/cm². Após o período de exposição, as amostras foram retiradas e os poços lavados com PBS suplementado. Em seguida o tampão foi retirado e acrescentado meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa (37°C / 5% CO₂) por 24h. Após esse período, 100 µL de corante vital Neutral Red foi adicionado nos poços viáveis. Passados três horas, os poços foram aspirados e foram adicionados 150 µL de solução “dessorb” (49% (v/v) de água destilada, 1% (v/v) de ácido acético glacial e 50% (v/v) de álcool etílico) e após 10 minutos de agitação em agitador de placas, a leitura das absorvâncias foi realizada em 540 nm em Leitor de Placas *Multi - Detection microplate reader Synergy* – BIOTEK.

Para análise da fototoxicidade foi utilizado o *Photo Irradiation Factor* (PIF) calculado a partir dos resultados obtidos. Foi utilizado o programa Phototox[®] para a obtenção deste valor. O valor de PIF é calculado pela divisão dos valores de IC₅₀ (-Irr) que corresponde a 50% de morte celular na ausência de luz e de IC₅₀ (+Irr) que corresponde a 50% de morte celular na presença de luz. A equação segue abaixo (Equação 2).

Equação 2. Determinação do valor de PIF

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Onde: IC₅₀ (-Irr) que corresponde a 50% de morte celular na ausência de luz e de IC₅₀ (+Irr) que corresponde a 50% de morte celular na presença de luz (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2004).

4.5 Carga Microbiana

Análise microbiológica foi realizada para verificar a carga microbiana da droga vegetal e do extrato bruto de *K. pinnata* por meio da contagem de micro-organismos viáveis totais, empregando-se o método de contagem em placas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Amostras de 10g da droga e de extrato bruto de *K. pinnata* foram dispersas em 90 mL de tampão fosfato pH 7,2. Alíquotas de 10 mL de cada dispersão foram adicionadas em 100 mL de água peptonada e realizadas diluições seriadas. Foi adicionado 1 mL de cada diluição em placa de Petri e vertido ágar triptona de soja (TSA) e ágar Sabouraud dextrose. Foram utilizadas duas placas para cada diluição e para cada meio de cultura. A placa com ágar triptona de soja (TSA) foi incubada a 37,5°C por 48 horas para crescimento bacteriano e em ágar Sabouraud dextrose foi incubada a 25°C por 7 dias, para crescimento de bolores e leveduras (SOUSA, 2006).

4.6 Endotoxinas

Quantificação de endotoxinas foi realizada para o extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*. Este experimento foi executado no laboratório de controle de qualidade microbiológico na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob orientação do prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço.

Trata-se de ensaio cinético que consiste na detecção de endotoxinas, complexos relacionados à membrana externa de bactérias Gram-negativas. Para o teste utilizou-se o kit Lonza®-Limulus Amebocyte Lysate Pyrogen™-5000. As amostras foram misturadas com o reagente reconstituído de Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL) e o monitoramento foi realizado durante 60 minutos, em leitor de microplacas, para a verificação do aparecimento da turbidez. O tempo de reação é inversamente proporcional à quantidade de endotoxinas presentes nas amostras. A concentração de endotoxinas nas amostras foi calculada através da curva de calibração utilizando *E. coli* 055:B5.

4.7 Avaliação da Atividade Anti - *Helicobacter pylori* do Extrato Bruto de *K. pinnata*

Este experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia da FCF/UNESP em Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

Para o desenvolvimento da técnica foi utilizada a cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, empregando a técnica de microdiluição para determinar valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM). *H. pylori* foi inoculado em placas de ágar Mueller-Hinton contendo 5% de sangue ovino e incubados a 36°C por 72 horas, em atmosfera de CO₂ 10%. Inóculos foram preparados no mesmo meio e a densidade ajustada para padrão de McFarland igual a

2,0. A suspensão de micro-organismo foi diluída para 1:10 e um volume de 100µL foi adicionado em cada poço da microplaca. Em seguida foram acrescentados mais 100µL de meio Mueller-Hinton suplementado com soro bovino fetal a 10%. Concentrações de 0,5 a 1000 µg/mL foram obtidas a partir de 100µL do extrato bruto de *K. pinnata*, transferidos para o primeiro poço de cada coluna da placa de 96 poços e diluídos serialmente. As soluções para o extrato bruto foram preparadas em DMSO 2%. Amoxicilina foi utilizada como controle e a CIM foi obtida após incubação das microplacas a 36°C por 72 horas em atmosfera de CO₂ a 10%. As CIMs foram determinadas como a menor concentração onde não foi observado crescimento. A revelação foi facilitada pela adição de 20 µL de solução de resazurina (100 µg/mL) em cada poço, com incubação de 2 horas. A coloração rosa indica o crescimento bacteriano, já a coloração azul indica o contrário. O ensaio foi realizado em triplicata (SILVA et al, 2015).

4.8 Quantificação da Quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo no Extrato Bruto de *K. pinnata*

A substância quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo foi isolada da fração acetato de etila de *K. pinnata* e identificada por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (SOBREIRA et al., 2017). Esta substância foi selecionada para tal análise, pois foi considerada como marcador da espécie *K. pinnata* em um estudo de atividade anti-leishmania, no qual os autores relataram que a mesma está presente em abundância na espécie (MUZITANO et al., 2006b). O extrato bruto e a substância isolada foram analisados no equipamento Shimadzu[®] com bombas LC-20A, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific[®] C18 ODS Hypersil[®] de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Após eluições de otimização foi estabelecido um sistema isocrático (A: água Mili-Q com ácido trifluoracético 0,1%, B: 23% de acetonitrila-ACN). Para a identificação da substância isolada no extrato bruto de *K. pinnata* foram feitas comparações dos tempos de retenção encontrados no extrato bruto com o tempo de retenção da substância isolada. Após esta análise preliminar, foram realizadas injeções de uma quantidade estabelecida (0,05 mg/mL) da substância isolada adicionada ao extrato bruto (1,0 mg/mL) e analisados novamente o tempo de retenção e área do pico.

A quantificação da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo foi realizada pelo método de padrão externo, utilizando a curva de calibração construída a partir deste mesmo flavonoide (área do pico x massa mg/mL), através da integração dos picos. Foram preparadas seis concentrações diferentes (0,16 mg/mL, 0,14 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,08 mg/mL e 0,06 mg/mL) da substância isolada. A quantidade de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo no extrato bruto de *K. pinnata* foi obtida analisando-se a área deste flavonoide no extrato bruto de *K. pinnata* com as áreas obtidas utilizando soluções com concentrações conhecidas preparadas a partir deste mesmo flavonoide. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.9 Identificação de Substâncias presentes no Extrato Bruto e Fração Acetato de Etila de *K. pinnata*

O extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* foram submetidos à análises cromatográficas e de identificação com o propósito de realizar uma comparação fitoquímica entre ambos.

A separação do extrato bruto de *K. pinnata* foi realizado em equipamento Shimadzu[®] com bombas LC-20AD, detector SPD-20A, injetor automático SIL 20AC, fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific[®] C18 ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. A amostra foi eluída no seguinte sistema isocrático: A: água Mili-Q com ácido fórmico 0,1%, B: 23% de acetonitrila-ACN. O espectrômetro de massas acoplado ao HPLC utilizado foi Esquire 3000 Plus- Bruker Daltonics[®] com ionização eletrospray (ESI) e detecção no modo positivo, nas seguintes condições: voltagem do capilar 4500 V, temperatura de dessolvatação 325°C, fluxo de gás de secagem (N₂ g) igual a 9 l/min e fluxo da fase móvel para amostra 100 μ L/min.

A separação da fração acetato de etila de *K. pinnata* foi executada em equipamento Shimadzu[®] com bombas LC-20AD, detector SPD-20A, injetor automático SIL 20AC, fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific[®] C18 ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. . A amostra foi eluída no seguinte sistema isocrático: A: água Mili-Q com ácido fórmico 0,1%, B: 23% de acetonitrila-ACN . O espectrômetro de massas acoplado ao HPLC utilizado foi Esquire 3000 Plus- Bruker Daltonics com ionização eletrospray (ESI) em modo positivo, nas seguintes condições: voltagem do capilar 4500 V,

temperatura de dessolvatação 325°C, fluxo de gás de secagem (N₂ g) igual a 9 l/min e fluxo da fase móvel para amostra 100 µL/min.

A fração acetato de etila também foi eluída em sistema CLAE semi-preparativo composto por equipamento Shimadzu[®] com bomba LC-6AD, detector UV-Vis SPD- 20^a, fluxo de 10 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack PREP-ODS de 250 mm x 20 mm, tamanho de partícula 5 µm. Utilizou-se o sistema solvente descrito acima.

Para a identificação, a substância isolada por CLAE semi-preparativo foi solubilizada em DMSO deuterado, (CD₃)₂SO, e submetida à análises de Ressonância Magnética Nuclear por ¹H em equipamento Bruker 300 operado a 500 MHz para obter o espectro de hidrogênio. Os deslocamentos químicos foram expressos em *ppm* relativo ao sinal do solvente.

4.10 Ensaios Biológicos

4.10.1 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos (150 a 200g) provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Foram mantidos em gaiolas apropriadas, com ciclo de claro-escuro regulado para 12 horas, com umidade aproximada de 55±10%. O projeto foi submetido à CEUA da FCF-USP e aprovado sob o número de CEUA/FCF/426.

4.10.2 Atividade Antiúlcera Aguda do Extrato Bruto - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico

Para a avaliação da relação dose-efeito da atividade antiúlcera gástrica foi empregado o modelo de indução aguda por etanol acidificado (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

Ratos Wistar machos foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso à água. Os testes foram realizados com grupos de 7 animais. Aos animais foram administrados, por via oral, técnica de gavagem, suspensão aquosa do extrato bruto de *K. pinnata* nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg, controle negativo (água 10 mL/kg) e controle positivo (cloprostenol 150 µg/kg). O cloprostenol é um análogo da prostaglandina PGF-2 α , que possui atividade citoprotetora na mucosa gástrica (NEUGHEBAUER et al., 1992). Transcorridos trinta minutos, foi administrado, por via oral, ácido clorídrico a 0,3M (10 ml/kg) em etanol a 60% a todos os animais. Após uma hora da

administração do indutor, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus[®].

Os resultados foram apresentados através das medidas de Área Total da Lesão (ATL), em mm², e Área Relativa da Lesão (ARL), em porcentagem, calculada segundo a fórmula abaixo (Equação 3).

Equação 3. Área relativa da lesão (%).

$$ARL = ATL / AT \times 100$$

Onde: ARL= Área relativa da lesão (%); ATL= Área total de lesão (mm²); AT= Área total do estômago (mm²);

4.10.3 Atividade Antiúlcera Aguda da Fração Acetato de Etila - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico

Para a avaliação da relação dose-efeito da atividade antiúlcera gástrica foi empregado o modelo de indução aguda por etanol acidificado (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

Ratos Wistar machos foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso à água. Os testes foram realizados com grupos de 7 animais. Foram administrados aos animais a fração acetato de etila nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Para os animais do grupo controle negativo foi administrado, por via oral, técnica de gavagem, água (1ml/100g de animal) e para os animais do grupo controle positivo, Cloprostenol (150µg/kg).

Transcorridos trinta minutos, foram administrados, por via oral, ácido clorídrico 0,3 M (10 ml/kg) em etanol a 60% a todos os animais. Após uma hora da administração do indutor, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus[®].

Os resultados foram apresentados através das medidas de Área Total da Lesão (ATL), em mm², e Área Relativa da Lesão (ARL), em porcentagem, calculada segundo a equação 3.

Equação 3. Área relativa da lesão (%).

$$ARL=ATL/AT \times 100$$

Onde: ARL= Área relativa da lesão (%); ATL= Área total de lesão (mm²); AT= Área total do estômago (mm²).

4.10.4 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com Indometacina

Para a avaliação do envolvimento da via COX na ação gastroprotetora, ratos Wistar machos (150-200g) em jejum de 12 horas foram utilizados. Os animais foram divididos em oito grupos. Primeiramente, a quatro grupos de animais foi administrada, por via subcutânea, indometacina na dose de 10 mg/kg (Indocid[®]) e aos quatro grupos restantes foi administrada salina (10 mL/kg). Indometacina foi solubilizada em NaHCO₃ 0,5% e diluída em salina. Trinta minutos após a administração de indometacina e salina, os animais receberam por via oral, água (1mL/ 100g), cloprostenol (150µg/kg) e dose mais ativa do extrato bruto (400 mg/kg) e da fração acetato de etila (200 mg/kg) de *K. pinnata*. Passados 30 minutos, foi administrado o agente ulcerativo (ácido clorídrico 0,3 M em etanol a 60%), por via oral. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus[®] (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

4.10.5 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com Etoricoxibe

Com a finalidade de avaliar o envolvimento da COX-2 na gastroproteção, ratos Wistar machos (150-200g) em grupos com 7 animais foram utilizados. Os animais foram divididos em oito grupos. Primeiramente, a quatro grupos de animais foram administrados, por via subcutânea, etoricoxibe (Arcoxia[®]) na dose de 90 mg/kg e nos quatro grupos restantes foi administrada salina, via subcutânea (10 mL/kg). 30 minutos após a administração de etoricoxibe e salina, os animais receberam por via oral (gavagem), água (1mL/ 100g), cloprostenol (150µg/kg), e dose mais ativa do extrato bruto (400 mg/kg) e da fração acetato de etila (200 mg/kg) de *K. pinnata*. Passados 30 minutos, foi administrado o agente

ulcerativo (ácido clorídrico 0,3 M em etanol a 60%), por via oral. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus[®] (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

4.10.6 Úlcera gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com *N-ethylmaleimide* (NEM)

Para avaliar o envolvimento dos grupos sulfidrila na ação gastroprotetora, ratos Wistar machos (150-200g) em jejum de 12 horas foram divididos em grupos (n=7). Os animais foram divididos em oito grupos. Primeiramente, a quatro grupos de animais foram administrados, por via intraperitoneal, NEM (10 mg/kg) e nos quatro grupos restantes foi administrada salina volume (10 mL/kg), via intraperitoneal. 30 minutos após a administração de NEM e salina, os animais receberam, por via oral, água (1mL/ 100g), cloprostenol (150µg/kg), e dose mais ativa do extrato bruto (400 mg/kg) e da fração acetato de etila (200 mg/kg) de *K. pinnata*. Passados 30 minutos, foi administrado o agente ulcerativo (ácido clorídrico 0,3M em etanol a 60%), por via oral. Uma hora depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus[®] (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

4.10.7 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com *N-nitro-L- arginine methyl-ester* (L-NAME)

A fim de avaliar o envolvimento de óxido nítrico (NO) na ação gastroprotetora, ratos Wistar machos (150-200g) em jejum de 12 horas foram divididos em grupo com 7 animais. Os animais foram divididos em oito grupos. Primeiramente, a quatro grupos de animais foram administrados, por via intraperitoneal, L-NAME, inibidor da oxido nítrico sintase (70 mg/kg) e nos quatro grupos restantes foi administrada salina, via intraperitoneal (10 mL/kg). 30 minutos após a administração de L-NAME e salina, os animais receberam, por via oral, água (1mL/ 100g), cloprostenol (150µg/kg), e dose mais ativa do extrato bruto (400 mg/kg) e da fração acetato de etila (200 mg/kg) de *K. pinnata*. Passados 30 minutos, foi administrado o agente ulcerativo (ácido clorídrico 0,3 M em etanol a 60%), por via oral. Uma hora

depois, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior e prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa Image Pro-Plus[®] (ADAPTADO DE MATSUDA, 1999).

4.10.8 Úlcera Subaguda- Modelo de Indução por Ácido Acético

A avaliação da atividade antiúlcera subaguda foi realizada conforme a técnica escrita por Okabe e Amagase (2005). Foram utilizados 08 animais por grupo (controle, tratado e fármaco de referência). Antes da incisão cirúrgica, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas com livre acesso à água.

Primeiramente, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Logo depois, foi utilizado um fórceps modificado para a aplicação e contenção de ácido acético 100% na região da serosa do estômago, em uma região de 5 mm de diâmetro. Após 60 segundos, a solução de ácido acético foi removida do estômago e substituída por salina para a limpeza do local. O abdômen do animal foi suturado e o corte tratado com álcool iodado. A partir do segundo dia após a cirurgia, o extrato bruto das folhas de *K. pinnata* foi administrado, por via oral, diariamente nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, durante 7 dias. Já, para os animais do grupo controle negativo foi administrado, por via oral, água (1mL/100g de animal). O fármaco de referência utilizado foi o lansoprazol Prazol[®](30mg/kg).

No final do tratamento os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. As ulcerações foram avaliadas pelo programa de Image Pro-Plus[®]. Os resultados foram expressos em porcentagem de área relativa de lesão.

Foi necessário executar dois experimentos utilizando esta metodologia. Isso porque o material de análise, neste caso o estômago, do animal, foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante *in vivo* e para a análise imuno-histoquímica. Infelizmente, o material de estudo não foi utilizado para ambas análises simultaneamente por questões de processamentos diferentes e quantidade insuficiente do material.

4.11 Análise Histológica e Imuno-Histoquímica

Os estômagos foram fixados em formol a 10% e após o processo de desidratação e diafanização o material foi incluído em parafina formando blocos para a realização de cortes (5 µm). As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para a realização de análise

histológica. Foi realizada também a coloração de tricrômico de Mallory para verificação de fibras colágenas.

Para a detecção imuno-histoquímica de VEGF, anticorpo monoclonal de camundongo anti-VEGF (Abcam ab1316) (1:800) foi utilizado em cortes (5 µm) de tecido gástrico, que foram desparafinados em xilol e re-hidratados em banhos consecutivos de álcool. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato 10mM pH 6,0 em panela de pressão (Pascal, DakoCytomation, USA). Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado o peróxido de hidrogênio 6% em temperatura ambiente e para o bloqueio de proteínas inespecíficas o CAS-Block[™] (Invitrogen), por 10 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário, por 60 minutos em temperatura ambiente. A detecção do complexo antígeno/anticorpo foi realizada com Picture Max (Invitrogen). O processo de coloração usado foi com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation) e a contra coloração com hematoxilina de Harris. Os cortes foram analisados em microscópio óptico Olympus BX51 acoplado com o software de captura de imagens Image-ProPlus[®] *version 5.1.2*. Para a análise quantitativa foram selecionados 3-5 campos diferentes da margem direita da úlcera para cada lâmina e os resultados foram expressos em porcentagem. Esta análise foi realizada no laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento sob orientação da prof^a. Dr^a. Patrícia Gama.

4.12 Ensaios de Atividade Antioxidante *in vivo*

A atividade antioxidante *in vivo* das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) e a capacidade de seqüestrar radical peroxil, pelo método de ORAC, foram avaliadas em homogenato de estômago de todos animais ensaiados, os quais foram submetidos a indução de úlcera subaguda e tratados com extrato bruto de *K. pinnata* durante 7 dias. Esta etapa da pesquisa foi realizada no laboratório de Lípidos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP sob coordenação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho.

Preparo do homogenato do estômago

O estômago foi homogeneizado em homogeneizador Ultra Turrax, em banho de gelo, com 1mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para determinar a

atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) e para avaliar a atividade antioxidante pelo método de ORAC.

4.13 Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes

Catalase (CAT)

A catalase promove a detoxificação do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Neste experimento foi quantificada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, a um comprimento de onda de 230 nm. O meio reacional foi composto por H_2O_2 10 mM (10 μL de peridrol 30% em 10 mL de H_2O ultrapura, tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8,0. Foi utilizado 985 μL do meio de reação e 15 μL do homogenato. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 37°C e a leitura realizada a cada minuto, durante 6 minutos. Esta metodologia foi descrita por Beutler (1975). As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima que permitiu a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 37 °C em pH 8,0.

Superóxido Dismutase (SOD)

A metodologia utilizada foi de McCord e Fridovich (1969). A SOD catalisa a dismutação dos ânions peróxidos a H_2O_2 e O_2 . Nesta análise foi verificada a produção de ânion superóxido produzido pela xantina oxidase na presença da xantina. O ânion superóxido produzido reduz o citocromo C. A leitura foi realizada a cada minuto, durante 6 minutos a 550 nm a uma temperatura de 25°C. O meio de reação foi composto por citocromo C 100 mM, xantina 500 μM , EDTA 1 mM, KCN 200 μM em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. Foi utilizado 1 mL do meio reacional, 10 μL de xantina oxidase diluída em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8 e 15 μL do homogenato. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Considerou-se uma unidade (U), a atividade da enzima que promoveu 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8.

Glutathione Peroxidase (GPx)

A metodologia utilizada para a determinação da GPx foi descrita por Sies (1979). Nesta análise ocorre a oxidação do NADPH durante a redução da glutathione oxidada (GSSG) catalisada pelas enzimas glutathione redutase. O meio reacional foi composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, EDTA 5 mM pH 7,0, glutathione 1M - 0,1 mL, glutathione redutase 0,1 U/mL, NADPH 20 mM e água ultrapura. Foi utilizado 1mL deste meio, 10 µL do homogenato e 10 µL de peróxido de terc-butila 0,5 mM. A leitura foi realizada a cada minuto no período de 6 minutos, a uma temperatura de 30°C em um comprimento de onda de 340 nm. As análises foram feitas em duplicadas e os resultados expressos em U/mg de proteína.

Uma unidade (U) da enzima foi definida como atividade da enzima que oxidou 1 µmol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

4.14 Avaliação da Atividade Antioxidante em Homogenato de Estômago pelo Método de ORAC

A atividade antioxidante do homogenato de estômago foi determinada pelo método de ORAC utilizando Leitor de Placas *Multi - Detection microplate reader Synergy* – BIOTEK (Vermont, ESTADOS UNIDOS), excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20). Foram adicionados em uma placa de 96 poços, 25µL do homogenato de estômago e 150 µL de uma solução de fluoresceína 40 nM. Esta mistura foi incubada a uma temperatura de 37°C por 15 min antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidroclorato (APPH) 153 mM a 37°C, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 1 hora.

A capacidade antioxidante do homogenato foi determinada pela equação de regressão entre uma curva padrão de Trolox e a área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC), e os resultados foram expressos em mM equivalentes de Trolox/mg de proteínas. Os poços externos foram preenchidos com 200 µL de água para garantir à homogeneidade térmica a placa (ADAPTADO DE CAO et al, 1993).

Quantificação de Proteínas do Homogenato de Estômago

A determinação do conteúdo de proteínas presente no homogenato de estômago foi realizada segundo o método de Bradford (1985). Foi feita uma curva com solução padrão de

albumina bovina (0,8 a 20 µg), com a finalidade corrigir os resultados pela concentração de proteínas presentes no homogenato.

4.15 Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

4.15.1 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

A Capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi avaliada de acordo com Prior e colaboradores (2003). Foram adicionados, em microplacas de 96 poços, 25µL de extrato bruto e da fração acetato de etila de *K. pinnata*, solubilizadas em tampão fosfato 75 mM pH 7,4 e 150 µL de uma solução de fluoresceína 40 nM. Esta mistura foi incubada a uma temperatura de 37°C por 15 min antes da adição de 25 µL da solução do radical peroxila 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto (APPH) 153 mM, que dá início à reação. A intensidade de fluorescência foi verificada a cada 1 minuto até o tempo final de 1 hora, em Leitor de Placas *Multi - Detection microplate reader Synergy* – BIOTEK excitação em 493 nm (filtro 485/20) e emissão em 515 nm (filtro 528/20).

A capacidade antioxidante foi determinada pela equação de regressão entre uma curva padrão de Trolox e a área sob a curva de decaimento de fluoresceína (AUC), e os resultados foram expressos em µmol equivalente de Trolox/g de amostra seca. Os poços externos foram preenchidos com 200 µL de água para garantir a homogeneidade térmica da placa.

4.15.2 Avaliação do Potencial Anti-inflamatório de *K. pinnata*

4.15.3 Isolamento e Cultura de Neutrófilos

Esta etapa do projeto foi realizada na Universidade Cruzeiro do Sul, sob orientação da prof^a. Dr^a. Elaine Hatanaka. O projeto foi submetido à CEP-Cruzeiro do Sul e aprovado sob o número de 077/2015.

Neutrófilos foram obtidos de voluntários humanos saudáveis, em dias diferentes. Ao sangue doado foi adicionado Histopaque® e levado à centrifugação por 30 minutos a 4° C em 400G. Após a centrifugação, fases diferentes foram formadas (plasma, linfócitos/monócitos, Histopaque® e eritrócitos/neutrófilos). O plasma, linfócitos/monócitos e Histopaque® foram desprezados. Os eritrócitos/ neutrófilos foram resuspendidos em tampão fosfato (PBS-NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM- pH= 7,2-7,3). Aos eritrócitos foi adicionada solução lise (NH₄Cl 150 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA Na 0,1 mM- pH=7,3) e submetidos a centrifugação por 10 minutos a 4° C em 400G. A solução lise foi utilizada até que o pellet de neutrófilos ficasse bem claro. Após a obtenção do pellet de neutrófilos, este foi ressuspendido em PBS e realizada a contagem de células com uso de câmara de Neubauer.

As condições de incubação dos neutrófilos foram: meio de cultura RPMI – 1640 com 10% suplementado com SBF (soro bovino fetal) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) adição de 10⁶ células por poço em placa de cultura, à 37° C e 5% de CO₂. O número de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer por exclusão de trypan blue em microscópio óptico. Tratamentos foram preparados dissolvendo o extrato bruto de *K. pinnata* e quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (QAR), substância majoritária isolada da fração acetato de etila de *K. pinnata*, em PBS. Dexametasona foi utilizado como referência de fármaco anti-inflamatório. Foi empregado o sal de fosfato dissódico da dexametasona, pois é solúvel em água. A concentração do extrato bruto de *K. pinnata* foi determinada após a quantificação do flavonoide isolado presente no extrato. Para o controle foram usadas células não tratadas. As análises foram realizadas em duplicatas para cada um dos três voluntários.

Os neutrófilos foram transferidos para placas de 96 poços na concentração de 10⁶ células por poço (densidade de células= 3x 10⁷ cel/mL) e foi adicionado o extrato bruto de *K. pinnata*, QAR e dexametaxona. Esses tratamentos também foram testados com a adição concomitante de um estímulo positivo, LPS (5 μ g/mL) para a verificação de produção de citocinas. As concentrações utilizadas estão na tabela abaixo (Tabela 1). Após o tempo de incubação, por 4 horas, as placas de cultura foram centrifugadas a 400G por 5 min a 4° C. O precipitado (pellet) foi utilizado para as análises de necrose e apoptose em citômetro de fluxo (Citômetro BD, ACCURI C6). O sobrenadante foi armazenado em freezer -80°C para o doseamento de citocinas (BORGES et al., 2014).

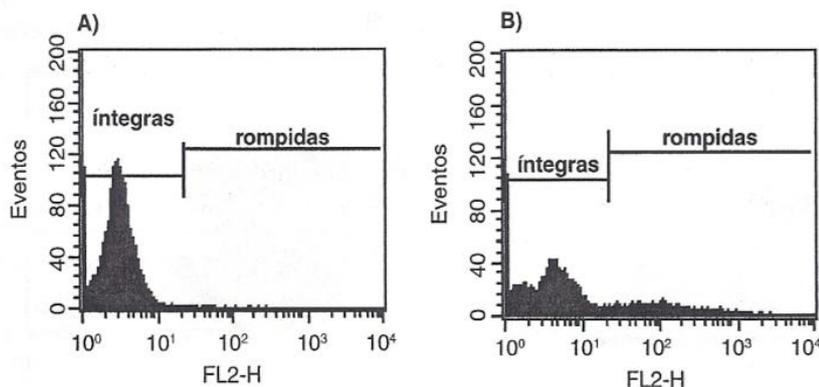
Tabela 1. Concentrações de extrato bruto de *Kalanchoe. pinnata*, QAR isolado de *Kalanchoe. pinnata* e dexametasona utilizados na avaliação do potencial anti-inflamatório.

Amostras	Concentração
Extrato bruto de <i>K. pinnata</i>	0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 mg/mL
QAR	0,004; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,12 mg/mL
Dexametasona	1; 2 μ M/mL

4.15.4 Ensaio de Integridade de membrana (Necrose Celular)

As placas de cultura foram cultivadas conforme descrito acima. O precipitado (pellet) foi ressuspensionado em 150 μ L de PBS e 15 μ L de iodeto de propídio (IP) (1 mg de IP em 10 mL de PBS) e as placas analisadas por citometria de fluxo (Citômetro BD, ACCURI C6). O iodeto de propídio (IP) é um composto fluorescente altamente solúvel em água que não penetra em membranas celulares íntegras, permitindo identificar células com perda de integridade de membrana (Figura 4). A fluorescência foi medida usando o canal FL2 (laranja – vermelho 585/42 nm). Dez mil eventos foram analisados por experimento e as células com fluorescência foram analisadas pelo software Cell Quest (Becton– Dickinson) (BORGES et al., 2014).

Figura 4- Histogramas da intensidade de fluorescência da análise de integridade da membrana plasmática emitida por células de duas amostras diferentes. (a) Em células íntegras não há passagem de IP pela membrana; (b) Células com membranas rompidas permitirão a entrada de IP.

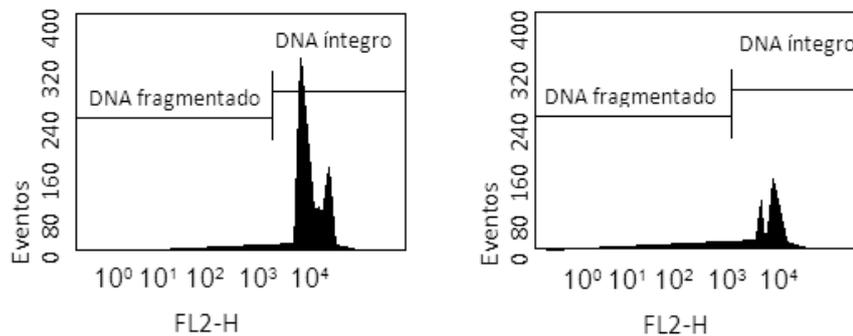


Fonte: Peres e Curi (2005).

4.15.5 Ensaio de fragmentação de DNA (Apoptose)

Após o tempo de incubação, por 4 horas, as placas de cultura foram centrifugadas a 400G por 5 min a 4° C. O precipitado (pellet) foi ressuspendido em 200 µL de solução hipotônica (0.1% citrato de sódio, 0.1% Triton-X-100, 0.1% de iodeto de propídeo em PBS), e então incubado por 30 min a 4°C. Esse detergente permeabiliza as células permitindo a entrada do corante que se incorpora a fragmentos de DNA. As células com DNA íntegro emitirão alta fluorescência. Em contrapartida, as células que apresentarem DNA fragmentado emitirão menor fluorescência, indicando apoptose. A fluorescência foi medida usando o canal FL2 (laranja – vermelho 585/42 nm). Dez mil eventos foram analisados por amostra pelo software Cell Quest (Becton– Dickinson) (Figura 5) (BORGES et al., 2014).

Figura 5- Histogramas de fluorescência da análise de fragmentação de DNA, emitida por células de duas amostras diferentes. (a) Quando o IP se liga ao DNA íntegro irá emitir alta fluorescência; (b) A fragmentação de DNA acarreta uma menor ligação do IP gerando eventos com baixa fluorescência.



Fonte: Peres e Curi (2005).

4.15.6 Determinação de Marcadores Inflamatórios (ELISA)

A determinação dos níveis de citocinas (TNF- α , IL-8 e L-selectina) foi avaliada pelo método de Elisa, com a utilização de Kits adquiridos da R&D Systems (DuoSet kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

4.16 Forma de Análise dos Resultados

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico, através da análise de variância (ANOVA) e Tukey ou Dunnett.

Os dados originais foram transformados em raiz quadrada ou Box Cox para corrigir erros de normalidade e/ou da heterocedasticidade. Já, os dados de citocinas foram normalizados dividindo pelo valor da média. Efetuado isso, tratamento estatístico foi empregado, através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett. As análises foram feitas através de comparações entre o grupo controle negativo e grupos que receberam o tratamento com os extratos vegetais, com $p < 0,05$. Para realização dos cálculos foi utilizado o software Graph-Prism 5.

Resultados

5 Resultados

5.1 Elaboração do Extrato Bruto e das Frações

5.1.1 *Kalanchoe pinnata*

Para a elaboração do extrato bruto, o processo extrativo utilizado foi a maceração. Foram realizadas cinco coletas durante o período de três anos. Os dados dos rendimentos referentes à droga vegetal, preparação do extrato bruto e ao fracionamento seguem abaixo (Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 2- Rendimento da droga vegetal de *K. pinnata* após o processo de secagem.

Data da coleta	Folhas frescas (g)	Droga vegetal (g)	Rendimento (%)
13/08/2013	5176,65	476,13	9,2
31/10/2013	5229,74	486,69	9,3
27/05/2014	4983,72	553,18	11,1
07/11/2014	2161,21	246,72	11,4
12/03/2015	5816,93	530,59	9,1

Tabela 3- Rendimento do extrato bruto de *K. pinnata* após o processo de secagem.

Data da coleta	Droga vegetal (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento (%)
13/08/2013	465,09	52,29	11,2
31/10/2013	486,69	51,59	10,6
27/05/2014	553,18	54,52	9,8
07/11/2014	246,72	36,89	15,0
12/03/2015	530,59	79,97	15,1

O fracionamento foi realizado utilizando 80g de extrato bruto.

Tabela 4- Rendimento das frações preparadas a partir de 80g de extrato bruto de *K. pinnata*.

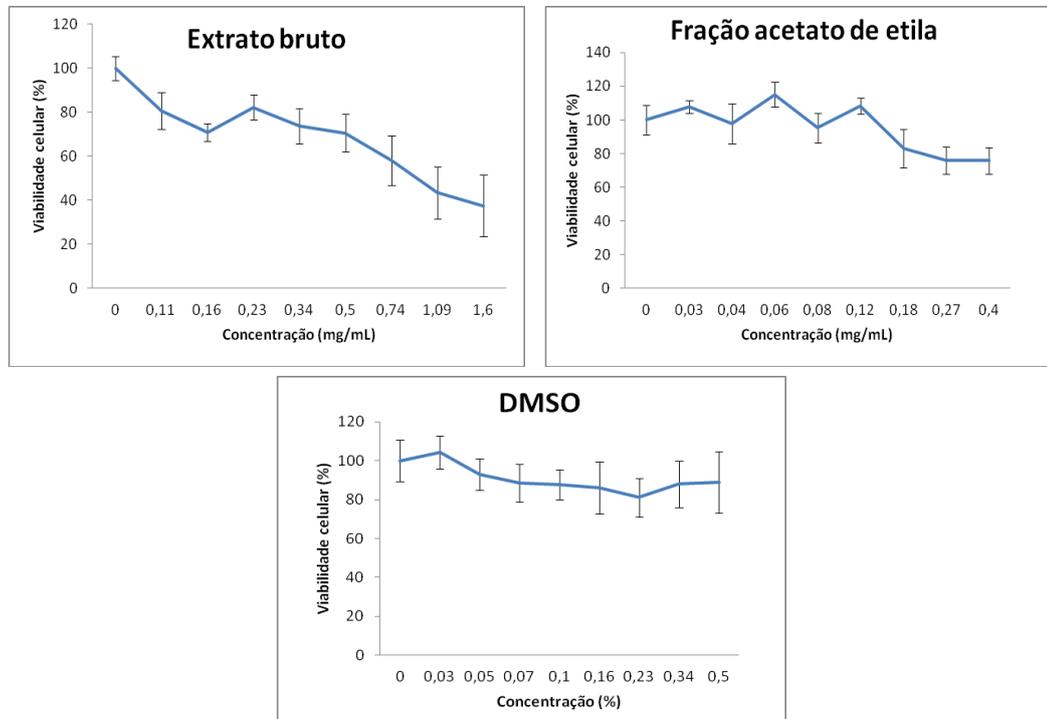
Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Clorofórmica	6,3g	7,9%
Acetato de Etila	2,4g	3,0%
Aquosa	44,3g	55,4%
Total	53g	66,3%

5.2 Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando oito concentrações diferentes para o extrato bruto e fração acetato de etila, obtidas a partir do fator de diluição de 1,47. A curva de viabilidade celular foi calculada a partir dos resultados de absorbância provenientes do ensaio de citotoxicidade. Foram realizados vários experimentos e as representações gráficas dos resultados se referem ao último experimento (Figura 6). Não foram encontrados valores de IC₅₀ para o controle de DMSO, dessa maneira, verifica a ausência de interferência do solvente na viabilidade celular do extrato bruto e da fração acetato de etila de *K. pinnata*. Os valores percentuais de viabilidade celular foram expressos como média ± erro padrão. O valor de IC₅₀ foi obtido pelo programa Phototox[®].

O extrato bruto de *K. pinnata* apresentou viabilidade celular de 80,49% ± 8,40% a 37,48% ± 13,89% nas concentrações de 0,11 a 1,6 mg/mL. Já a fração acetato de etila de *K. pinnata* exibiu viabilidade celular de 107,94% ± 3,79% a 75,83 ± 7,81 nas concentrações de 0,03 a 0,4 mg/mL. O valor encontrado para o extrato bruto de *K. pinnata* referente ao IC₁₀ e ao IC₅₀ foi de 0,060 mg/mL e 0,926 mg/mL, respectivamente. O valor da DL₅₀, calculada a partir do valor de IC₅₀ foi de 1341,46 mg/kg. Já para a fração acetato de etila não foi possível obter valor de IC₅₀ nas concentrações testadas (0,03-0,4 mg/mL).

Figura 6- Curvas de viabilidade celular após tratamento do extrato bruto, fração acetato de etila de *K. pinnata* e DMSO, em diferentes concentrações, em células de fibroblastos murinos BALB/c 3T3.

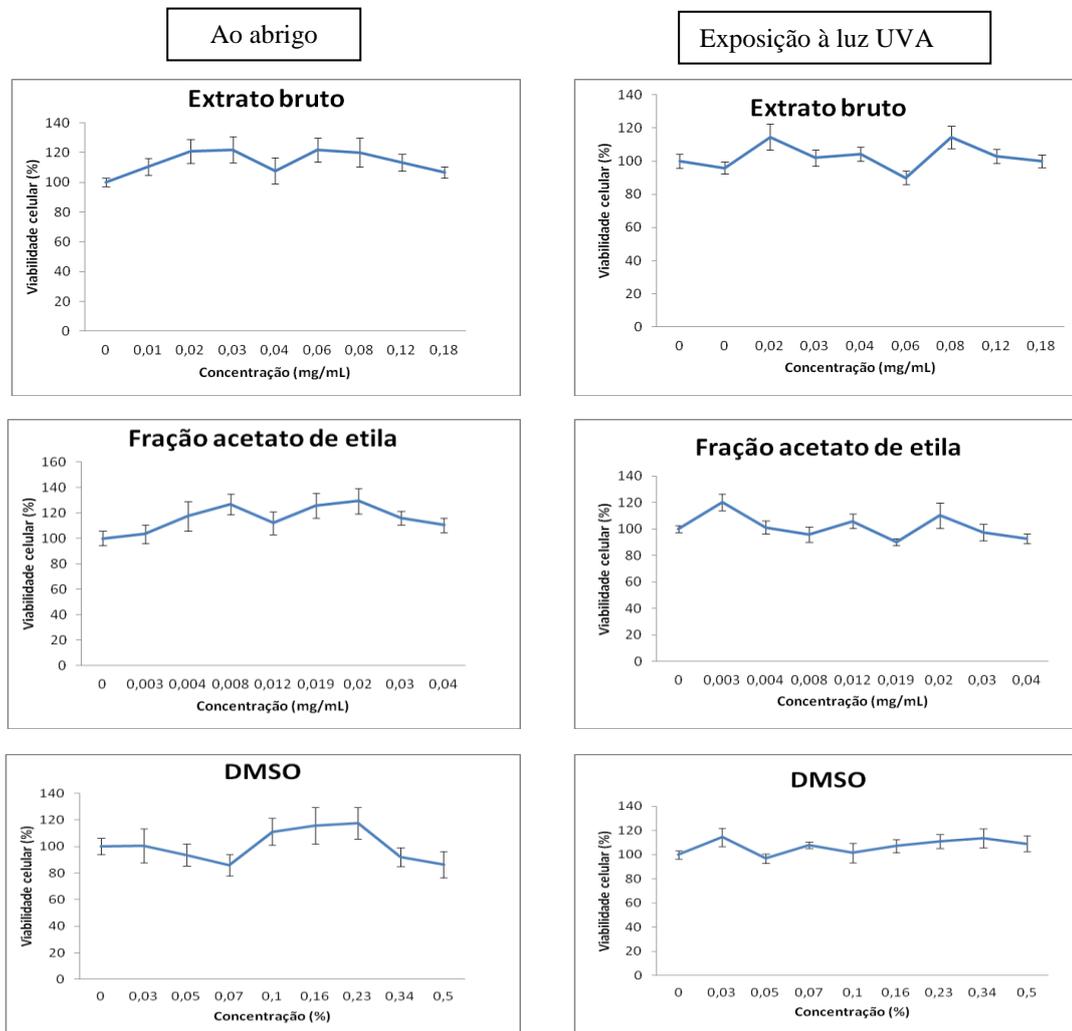


5.3 Avaliação da Fototoxicidade

No ensaio de fototoxicidade utilizaram-se oito concentrações diferentes de extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* e foram obtidos valores de *Photo Irradiation Factor* (PIF) pelo programa Phototox[®] (Figura 7). De acordo com o guia da Organisation for economic Co-operation and Development (2004), valores de PIF < 2 prevê ausência de fototoxicidade; PIF > 2 e < 5 prevê provável fototoxicidade; e PIF > 5.

O extrato bruto de *K. pinnata* apresentou valor de PIF= 1,00, indicando ausência de fototoxicidade. Ausência de fototoxicidade também foi observada para fração acetato de etila, pois apresentou o seguinte valor PIF=1,00.

Figura 7- Curvas de viabilidade celular após tratamento do extrato bruto, fração acetato de etila de *K. pinnata* e DMSO, em diferentes concentrações, em células de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 após exposição à luz UVA e ao abrigo.



5.4 Carga microbiana

A contagem microbiana foi realizada para bactérias aeróbias/mesófilas e bolores e leveduras na droga vegetal e extrato bruto de *K. pinnata*. Os resultados foram comparados com aqueles estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde-OMS (WHO, 2007). No extrato bruto não houve contagem para nenhum dos micro-organismos analisados. Abaixo, os resultados da contagem microbiana na droga vegetal de *K. pinnata* (Tabela 5).

Tabela 5- Carga microbiana encontrada na droga vegetal de *K. pinnata*.

	Carga Microbiana (Droga Vegetal)	Máximo OMS UFC/g
Bactérias	6,9x10 ⁴ UFC/g	10 ⁵
Bolores e Leveduras	2,4x 10 ³ UFC/g	10 ³

5.5 Endotoxinas

O ensaio de endotoxinas foi realizado para o extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*. A metodologia utilizada foi Limulus Amebocyte Lysate (LAL). Na tabela 6 estão apresentados os resultados. De acordo com a Farmacopeia Americana (USP) a dose máxima permitida que o ser humano possa receber é de 5 UE/kg, por via endovenosa (USP, 2012).

Tabela 6- Quantidade de endotoxinas presentes no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* em EU/kg.

Amostras	Quantidade de endotoxinas em UE/kg
Extrato bruto	<4,0.10 ⁵ UE/kg
Fração acetato de etila	<2,7.10 ⁵ UE/kg

5.6 Avaliação da atividade anti - *Helicobacter pylori* do Extrato Bruto de *K. pinnata*

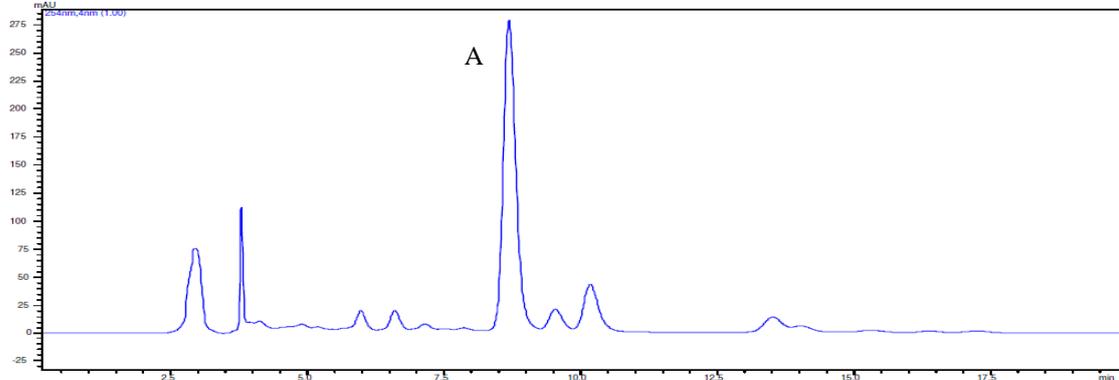
O extrato bruto de *K. pinnata* foi avaliado para a verificação da atividade anti *Helicobacter pylori*. No entanto, a amostra testada não teve atividade com Concentração Inibitória Mínima (CIM) >1000 ug/mL. Amoxicilina, controle positivo, apresentou uma CIM de 31,25 ug/mL.

5.7 Quantificação da Quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo no Extrato Bruto de *K. pinnata* por CLAE

O cromatograma do extrato bruto de *K. pinnata* nas condições otimizadas está ilustrado na Figura 8. O cromatograma do flavonoide quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo está apresentado na Figura 9. Os espectros UV-Vis do pico A e pico B estão detalhados na Figura 10. Na Figura 11 está apresentado o cromatograma de uma

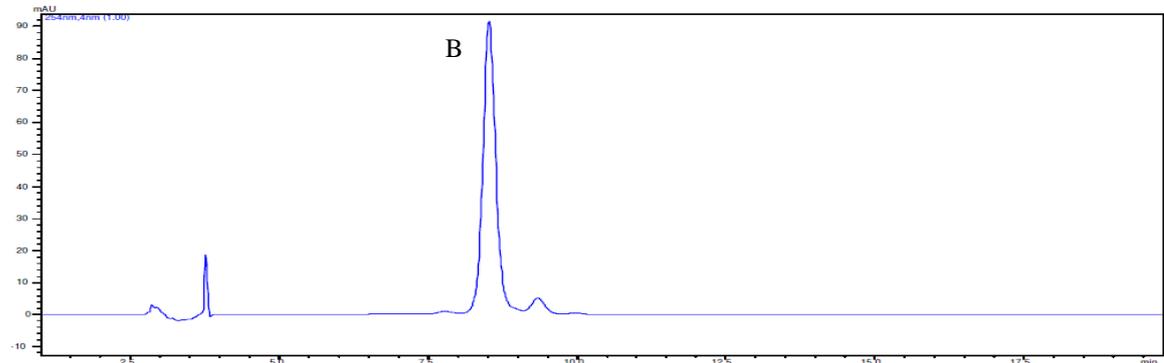
quantidade estabelecida (0,05 mg/mL) da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo adicionada ao extrato bruto de *K. pinnata* (1mg/mL).

Figura 8- Cromatograma do extrato bruto (1mg/mL) de *Kalanchoe pinnata*.



Legenda: Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific® C18ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Isocrático de ACN (23%) em H₂O + TFA a 0,1% em 20 min.

Figura 9- Cromatograma da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (0,1mg/mL).



Legenda: Equipamento Shimadzu com bombas LC- 20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific® C18 ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Isocrático de ACN (23%) em H₂O + TFA a 0,1% em 20 min.

Figura 10- Espectros UV-Vis pertencentes ao extrato bruto de *K. pinnata* (A) e do padrão quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (B).

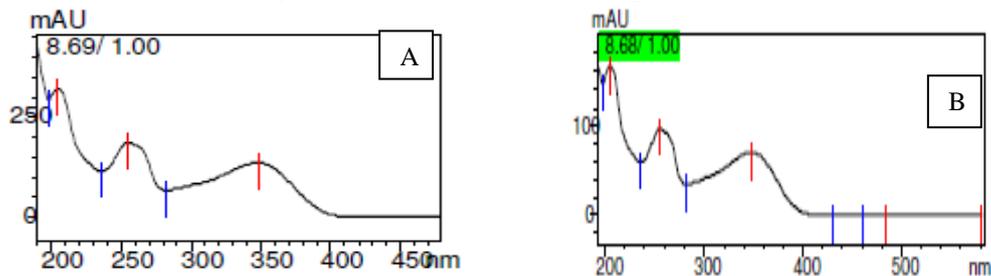
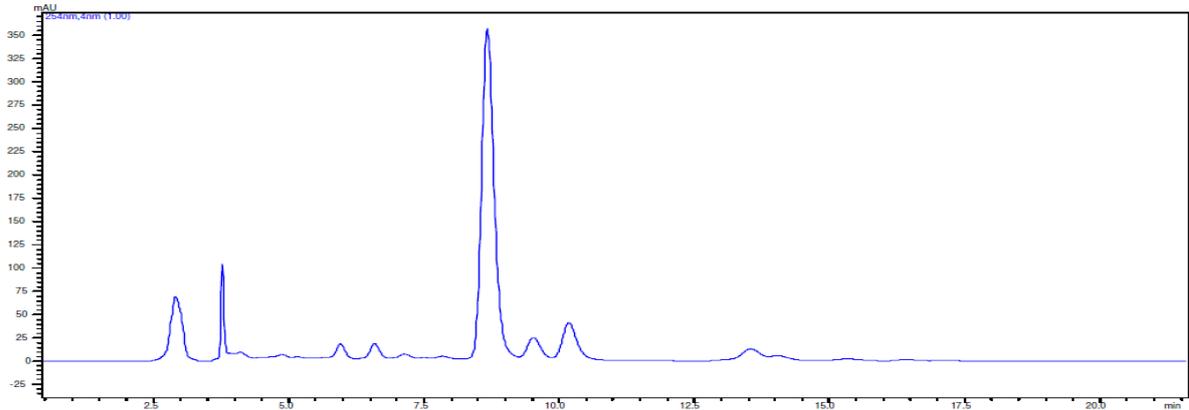


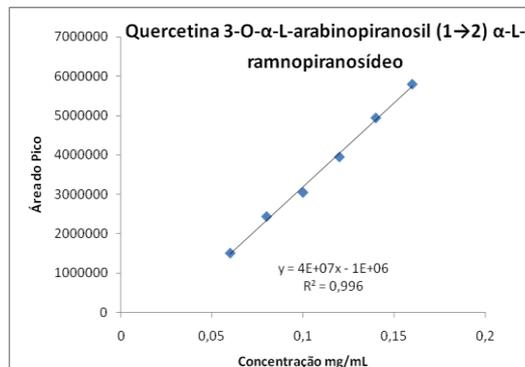
Figura 11- Cromatograma da quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (0,05mg/mL) adicionado ao extrato bruto de *K. pinnata* (1mg/mL).



Legenda: Equipamento Shimadzu com bombas LC- 20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific[®] C18 ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Isocrático de ACN (23%) em H₂O + TFA a 0,1% em 20 min.

A curva de calibração de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo foi realizada em triplicata (Figura 12). A quantificação deste flavonoide no extrato bruto também foi realizada em triplicata.

Figura 12- Curva de calibração de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo por CLAE.



Verificou-se que a concentração de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo no extrato bruto de *K. pinnata* foi de $9,64 \pm 2,3$ g/100g de extrato bruto, o que corresponde a 0,11% na planta fresca.

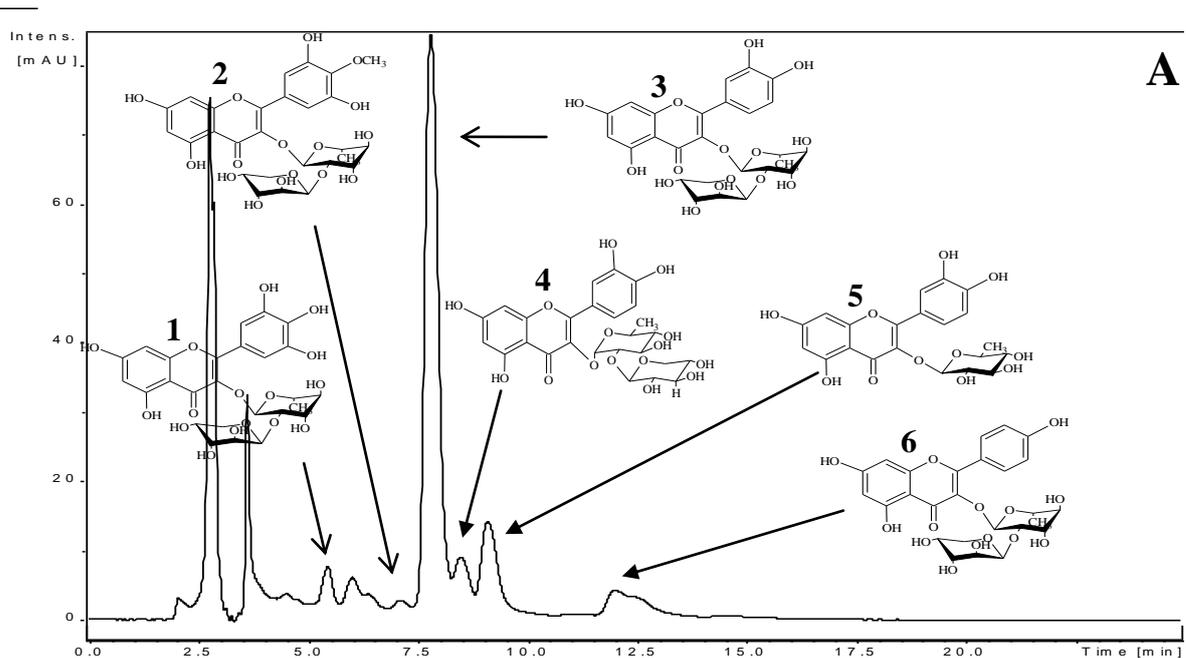
5.8 Identificação de Substâncias presentes no Extrato Bruto e Fração Acetato de Etila de *K. pinnata*

Foram identificados 6 (1, 2, 3, 4, 5 e 6) substâncias no extrato bruto e 8 (1, 1.1, 2, 3, 4, 5, 5.1 e 6) substâncias na fração acetato de etila de *K. pinnata*. As substâncias identificadas

foram: miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo (**1**), miricetina-3-*O*-rhamnopiranosideo (**1.1**), mearnsetina-3-*O*-pentosilramnopiranosideo (**2**), quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo (**3**), quercetina 3-*O*- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo (**4**), e quercitrina (**5**), 4',5,7-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-*O*- β -D-glicopiranosideo (**5.1**), kaempferol-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo (**6**). As substâncias 3 e 5 já foram previamente isoladas e identificadas na fração acetato de etila (ICHIKAWA; OGURA; IJIMA, 1986; MUZITANO et al., 2006a; 2006b; SOBREIRA et al., 2017) (Figura 13 e Figura 14).

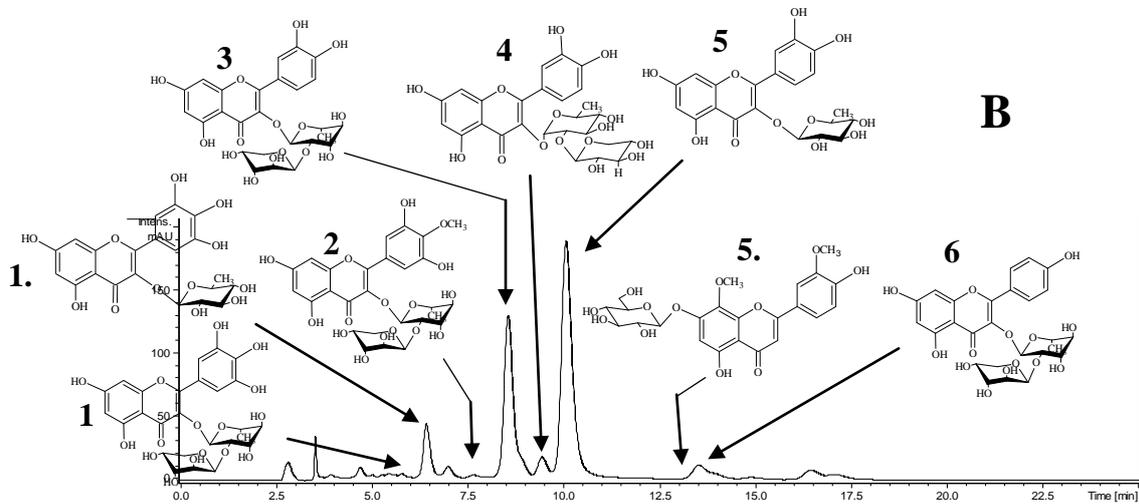
Usou-se o recurso dos dados provenientes da ressonância magnética nuclear de ^1H e espectrometria de massas para identificação da substância **2** (Tabela 7). As demais substâncias foram identificadas pela análise do espectro de massas e seus fragmentos (Tabela 8). Os dados de espectro de massas ESI⁺ e MS² e de espectro de H estão no apêndice.

Figura 13- Cromatograma HPLC-UV (254 nm) do extrato bruto (A) de *K. pinnata*.



Legenda: Equipamento Shimadzu com bombas LC-20AD, loop de 20 μL , detector SPD-20A, fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific[®] C18 ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μm . Isocrático de ACN (23%) em H₂O + ácido fórmico a 0,1% em 25 min. (**1**) miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo; (**2**) mearnsetina-3-*O*-pentosilramnopiranosideo; (**3**) quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo; (**4**) quercetina 3-*O*- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo; (**5**) quercitrina; (**6**) kaempferol-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo.

Figura 14- Cromatograma HPLC-UV (254 nm) da fração acetato de etila (B) de *K. pinnata* e das substâncias isoladas.



Nota: Equipamento Shimadzu com bombas LC- 20AD, loop de 20 μ L, detector SPD-20A, fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific[®] C18 ODS Hypersil de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Isocrático de ACN (23%) em H₂O + ácido fórmico a 0,1% em 25 min. (1) miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo; (1.1) miricetina-3-*O*-rhamnopiranosídeo; (2) mearnsetina-3-*O* pentosilramnopiranosídeo; (3) quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo; (4) quercetina 3-*O*- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo; (5) quercitrina; (5.1) 4',5,7-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-*O*- β -D-glicopiranosídeo; (6) kaempferol-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo.

Tabela 7- Dados de RMN ¹H (500 MHz) de mearnsetina-3-*O*-pentosilramnopiranosídeo (2), substância isolada de *Kalanchoe pinnata*.

N ^o	H ¹ -NMR, (CD ₃) ₂ SO, ppm
6	6.19, <i>d</i> , <i>J</i> =2.15 Hz
8	6.36, <i>d</i> , <i>J</i> =1.85 Hz
2'	6.88 <i>s</i>
6'	6.88 <i>s</i>
OCH ₃	3.79 <i>s</i>
1''	5.19 <i>s</i>
2''	3.97 <i>m</i>
3''	3.53 <i>m</i>
4''	3.15 <i>m</i>
5''	3.32 <i>m</i>
6''	0.84 <i>d</i> , <i>J</i> =6.1 Hz
1'''	4.14, <i>d</i> , <i>J</i> =7.0 Hz
2'''	
3'''	δ 4.91 - 3.56
4'''	
5'''	

Tabela 8- Identificação dos constituintes químicos do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* por LC-ESI-MS²

Pico	m/z	Extrato bruto				Identificação	Fração acetato de etila				Referências				
		TR (min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ m/z	MS ²		Fragmentação de íons	TR (min)	UV λ_{max} (nm)	[M+H] ⁺ m/z		MS ²	Fragmentação de íons		
1	596	5.4	209	596.9	542.8	[M+H-3H ₂ O] ⁺ [M+H-Ara] ⁺ [M+H-Ara-2H ₂ O] ⁺ [M+H-Ara-Rham] ⁺	Miricetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo	5.9	208	597.3	465	465	447	[M+H-Ara] ⁺ [M+H-Ara-H ₂ O] ⁺ [M+H-Ara-Rham] ⁺	FÜRER et al., 2013
			349		428.9						319				
					318.6										
1.1	*	*	*	*	*	*	Miricetina 3- <i>O</i> -ramnopiranosídeo	6.5	208	465.2	318.9	[M+H-Rham] ⁺	FÜRER et al., 2013		
2	610	7.1	206	611	583.9	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-pentose] ⁺ [M+H-pentose-2H ₂ O] ⁺ [M+H-pentose-Rham] ⁺	Mearnsetina 3- <i>O</i> -pentosilramnopiranosídeo	7.7	202	611.2	479	479	333	[M+H-pentose] ⁺ [M+H-pentose-Rham] ⁺	MAHMOUD, et al., 2001
			266		478.8						269				
			348		442.7						347				
					332.6										
3	580	7.8	205	581	448.8	[M+H-Ara] ⁺ [M+H-Ara-Rham] ⁺	Quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranosídeo	8.7	205	581.2	449	449	302.9	[M+H-Ara] ⁺ [M+H-Ara-Rham] ⁺	MUZITANO et al. 2006b, ICHIKAWA, 1986
			255		302.6						348				
			348												
4	580	8.5	206	581.2	476.7	[M+H-Xyl] ⁺ [M+H-Xyl-2H ₂ O] ⁺ [M+H-Xyl-Rham] ⁺	Quercetina 3- <i>O</i> - β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranosídeo	9.5	205	581.3	449	449	431	[M+H-Xyl] ⁺ [M+H-Xyl-H ₂ O] ⁺ [M+H-Xyl-2H ₂ O] ⁺ [M+H-Xyl-Rham] ⁺	SLOWING et al., 1994
			255		448.7						255				
			348		412.6						347				
					302.6										
5	448	9.1	205	448.7	430.7	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-Rham] ⁺	quercitrina	10.2	204	449.1	302.9	302.9		[M+H-Rham] ⁺	MUZITANO. et al. 2006a
			255		302.5						348				
			349												
5.1	492	*	*	*	*	*	4',5,7-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo	13.2	254	493.2	331	[M+H-Glc] ⁺	MUZITANO et al. 2006b, FÜRER et al., 2016		
6	564	11.8	206	565	432.8	[M+H-Ara] ⁺ [M+H-Ara-2H ₂ O] ⁺ [M+H-Ara-Rham] ⁺	Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo	13.6	201	565.3	433	433	415.1	[M+H-Ara] ⁺ [M+H-Ara-H ₂ O] ⁺ [M+H-Ara-2H ₂ O] ⁺ [M+H-Ara-Rham] ⁺	FÜRER et al., 2013
			264		396.6						263				
			339		286.6						341				
											286.9				

Legenda: TR- tempo de retenção; m/z- relação massa/carga; [M+H]⁺- íon molecular; * não foi identificado no extrato bruto de *K. pinnata*.

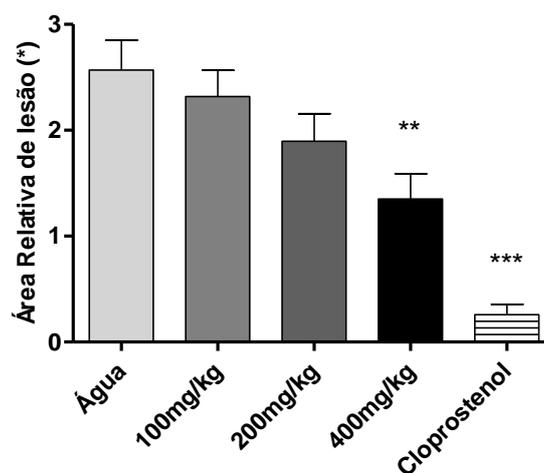
5.9 Atividade Antiúlcera

Todos os ensaios foram realizados em datas diferentes no período da manhã, porém, na mesma sala de procedimentos do Biotério da FCF-USP. Os resultados dos ensaios de atividade antiúlcera aguda com o extrato bruto e a fração acetato de etila de *K. pinnata* estão apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Já os ensaios de mecanismo de ação envolvidos na gastroproteção estão demonstrados nas Figuras 17, 18, 19 e 20. As Figuras 21, 22, 23, 24 e 25 exibem os resultados relacionados à atividade antiúlcera subaguda. Os resultados estão expressos em média de área relativa de lesão (%) com seus respectivos erro padrão.

5.9.1 Atividade Antiúlcera Aguda do Extrato Bruto - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico

O gráfico abaixo representa o resultado da avaliação de atividade antiúlcera, em ratos, do extrato bruto de *K. pinnata* após a administração de três doses diferentes (100, 200 e 400 mg/kg) e do indutor etanol acidificado (Figura 15).

Figura 15- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado.

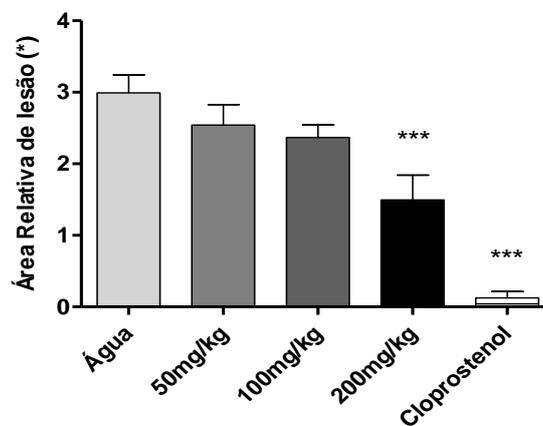


Legenda: n=6-7; Dose de Cloprostenol (controle positivo): 150 µg/kg. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. ANOVA seguido do teste de Dunnett com **p<0,01 e ***p<0,001.

5.9.2 Atividade Antiúlcera Aguda da Fração Acetato de Etila - Modelo de Indução por Etanol e Ácido Clorídrico

O gráfico abaixo representa o resultado da avaliação de atividade antiúlcera em ratos, após a administração de três doses diferentes da fração acetato de etila (50, 100 e 200 mg/kg) e do indutor etanol acidificado (Figura 16).

Figura 16- Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado.

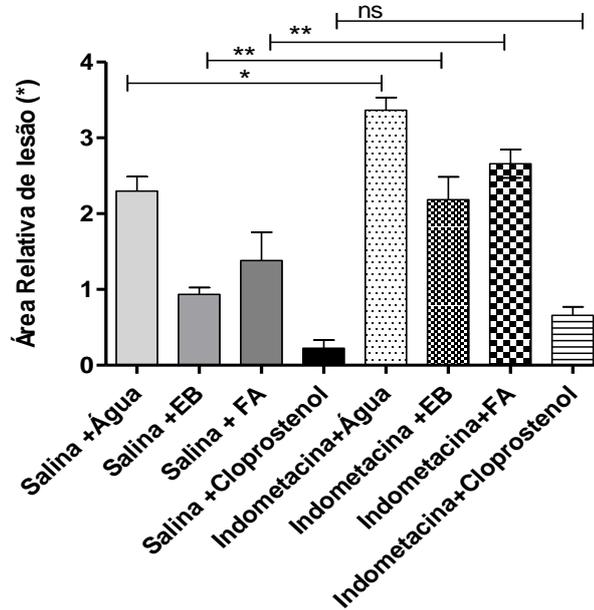


Legenda: n=7; Dose de Cloprostenol (controle positivo): 150µg/kg. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. ANOVA seguido do teste de Dunnett com ***p<0,001.

5.9.3 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com Indometacina

Neste modelo experimental foi avaliado o envolvimento da via COX, na ação gastroprotetora do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* após pré-tratamento dos ratos com indometacina (Figura 17).

Figura 17- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de *Kalanchoe pinnata* em animais pré-tratados com indometacina (10 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.

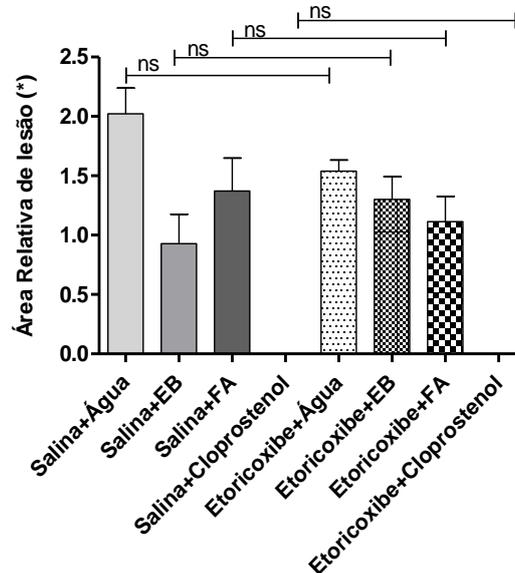


Legenda: n=6-7; Dose de Cloprostenol (controle positivo): 150 μ /kg. Dados expressos em média \pm erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. As barras horizontais indicam comparações entre grupos pré- tratados com salina e indometacina realizadas pelo ANOVA seguido do teste de Tukey * p<0,05, ** p<0,01 e ns não significativo.

5.9.4 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com Etoricoxibe

Neste modelo experimental foi avaliado o envolvimento da via COX-2, através do pré-tratamento com etoricoxibe, na ação gastroprotetora do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* (Figura 18).

Figura 18- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de *Kalanchoe pinnata* em animais pré-tratados com Etoricoxibe (90 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.

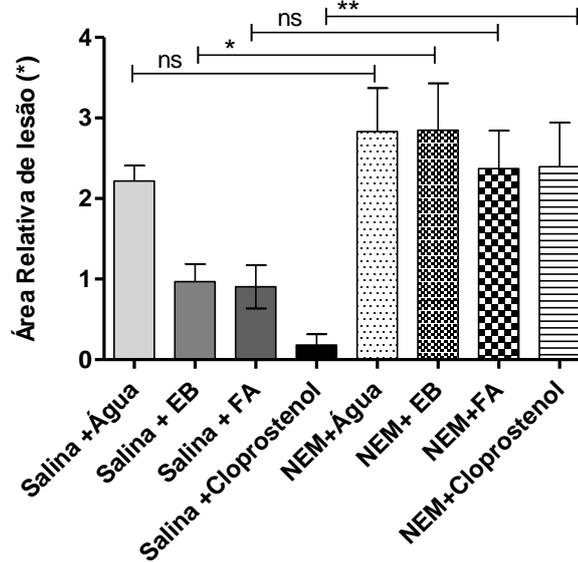


Legenda: n=4-7; Dose de Cloprostenol (controle positivo): 150 μ /kg. Dados expressos em média \pm erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. As barras horizontais indicam comparações entre grupos pré- tratados com salina e etoricoxibe realizadas pelo ANOVA seguido do teste de Tukey; ns não significativo.

5.9.5 Úlcera gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com *N- ethylmaleimide* (NEM)

Neste modelo experimental foi avaliada a participação dos grupamentos sulfidrila, através do pré-tratamento com *N- ethylmaleimide* (NEM), na ação gastroprotetora do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* (Figura 19).

Figura 19- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de *Kalanchoe pinnata* em animais pré-tratados com NEM (10 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.

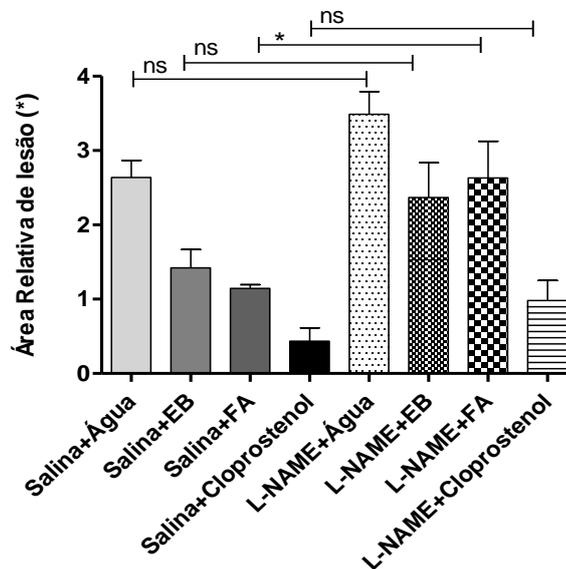


Legenda: n=7; Dose de Cloprostenol (controle positivo): 150 μ /kg. Dados expressos em média \pm erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. As barras horizontais indicam comparações entre grupos pré- tratados com salina e NEM realizadas pelo ANOVA com teste posterior de Tukey, * $p < 0,05$, $p < 0,01$, ns não significativo.

5.9.6 Úlcera Gástrica Induzida por Etanol Acidificado em Animais pré-tratados com *N- nitro-L-arginine methyl-ester* (L-NAME)

Neste modelo experimental foi avaliada a participação do óxido nítrico, através do pré-tratamento com *N- nitro-L-arginine methyl-ester* (L-NAME), na ação gastroprotetora do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* (Figura 20).

Figura 20- Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto - EB (400mg/kg) e fração acetato de etila - FA (200 mg/kg) de *Kalanchoe pinnata* em animais pré-tratados com L-NAME (70 mg/kg) após indução de úlcera por etanol acidificado.

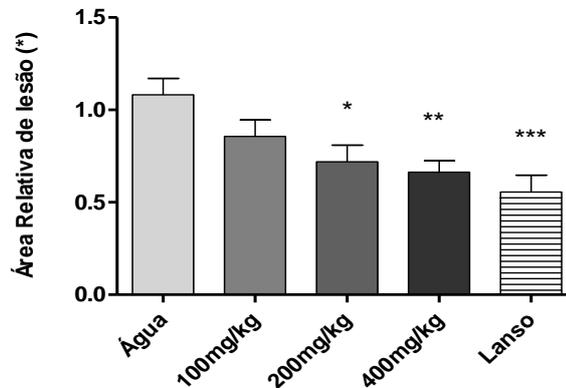


Legenda: n=7; Dose de Cloprostenol (controle positivo): 150 μ /kg. Dados expressos em média \pm erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. As barras horizontais indicam comparações entre grupos pré- tratados com salina e L-NAME realizadas pelo ANOVA seguido do teste de Tukey, * p<0,05; ns não significativo.

5.9.7 Úlcera Subaguda- Modelo de Indução por Ácido Acético

A avaliação macroscópica dos estômagos dos animais com úlceras gástricas (modelo subagudo) foi realizada após o tratamento com o extrato bruto de *K. pinnata* nas doses de 200, 400 mg/kg e lansoprazol (30 mg/kg) durante 7 dias (Figura 21).

Figura 21- Atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por ácido acético.

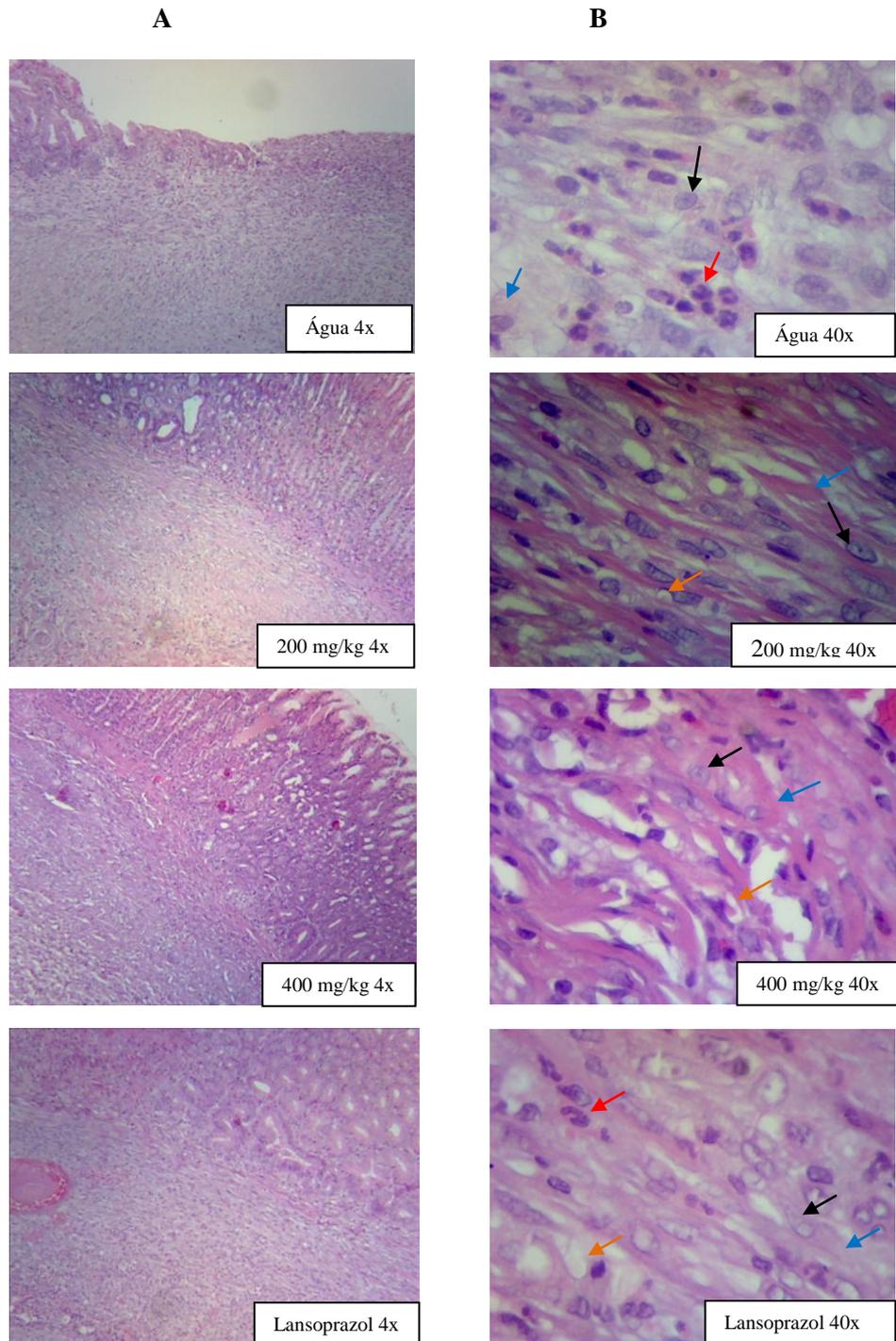


Legenda: n=7-8; Dose de Lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. (*) Os dados foram transformados para raiz quadrada. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo tratado com água. ANOVA seguido do teste de Dunnett com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.9.8 Análise Histológica e Imuno-Histoquímica

Foi realizada análise histológica subjetiva dos estômagos de animais submetidos à indução de úlcera gástrica, por ácido acético, após 7 dias de tratamento, com o extrato bruto de *K. pinnata* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, água e lansoprazol (30 mg/kg). Observou-se que os grupos tratados com as doses de 200 e 400 mg/kg de extrato bruto de *K. pinnata* e lansoprazol exibiram uma melhor resposta em relação à cicatrização quando comparados com cortes histológicos do grupo controle (água). O grupo 100 mg/kg não demonstrou uma melhora da cicatrização das lesões gástricas em relação ao controle negativo (Figura 22).

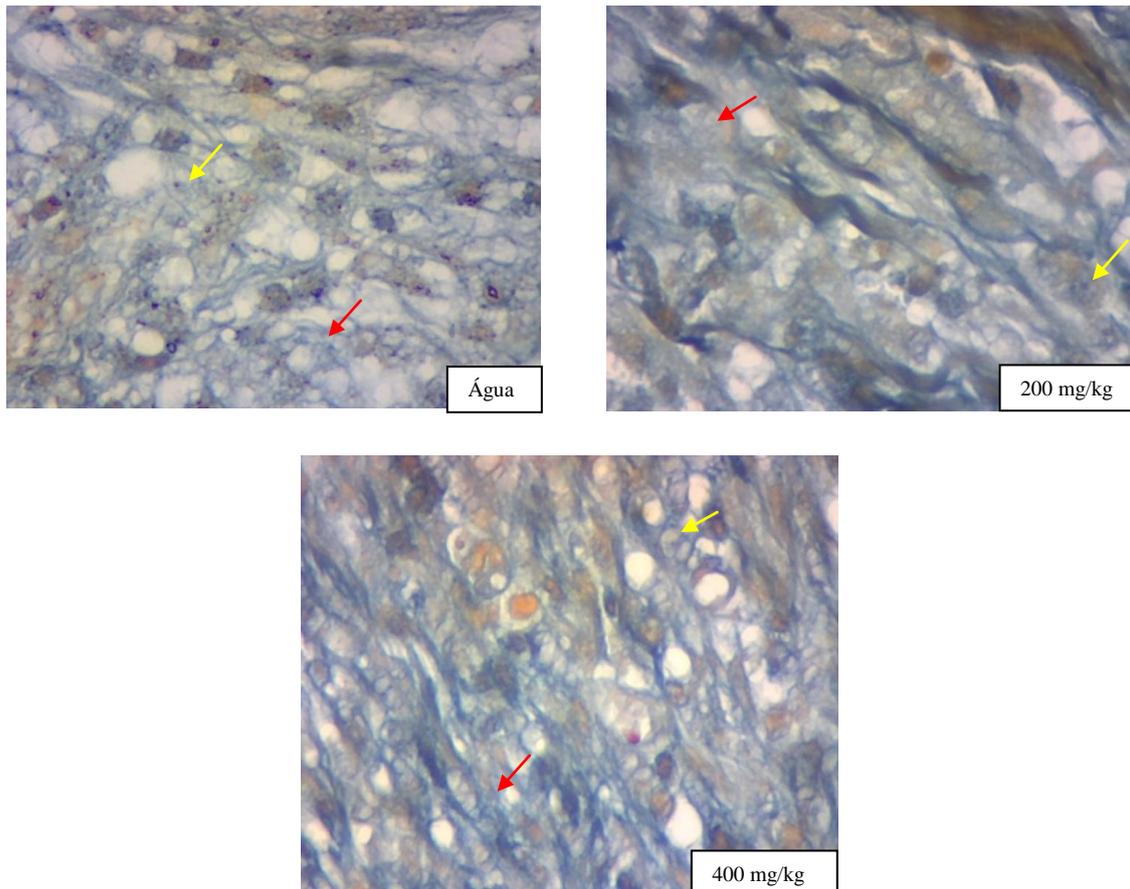
Figura 22- Fotomicrografia de corte histológico de parede gástrica de rato, com reprodução experimental de lesão ulcerativa induzida por ácido acético, com sete dias de tratamento com água, 200 mg/kg, 400 mg/kg de extrato bruto de *K. pinnata* e lansoprazol (30mg/kg).



Legenda: A coluna **A** mostra a fase de transição entre a área lesionada e área cicatrizada (grupo Água) e as demais figuras indicam a fase de transição entre a área regenerada e não lesionada. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 4x. A coluna **B** apresenta a área com formação de tecido de granulação e depósito de feixes de fibras colágenas discretos (↑), fibroblastos (↑) infiltrado inflamatório moderado com predomínio de células polimorfonucleares (neutrófilos) (↑) (grupo Água). As figuras seguintes demonstram a área com formação de tecido de granulação exuberante, inúmeros fibroblastos e depósito de feixes de fibras colágenas (↑) e vaso neoformado (↑). Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 40x.

Cortes histológicos representativos de cada grupo foram submetidos à coloração por tricômico de Mallory para a avaliação subjetiva da deposição de feixes de fibras colágenas (Figura 23).

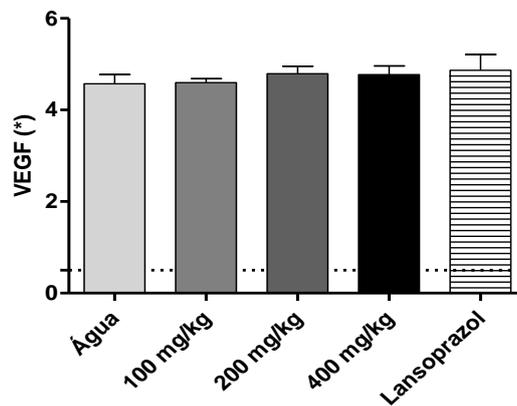
Figura 23- Fotomicrografia de corte histológico de parede gástrica de rato, com reprodução experimental de lesão ulcerativa induzida por ácido acético, com sete dias de tratamento com água, 200 e 400 mg/kg de extrato bruto de *K. pinnata* mostrando área com formação de tecido de granulação.



Legenda: Na figura correspondente ao grupo água nota-se uma proliferação fibroblástica (↑) e depósito de feixes de fibras colágenas (↑) discretos. Nas figuras referentes aos grupos 200 e 400 mg/kg de extrato bruto de *K. pinnata* observou-se uma proliferação fibroblástica exacerbada (↑) e grande quantidade de depósito de colágeno (↑).

Na análise de imuno-histoquímica foi avaliada a expressão de VEGF na mucosa gástrica de ratos, lesionada com ácido acético, após o tratamento com o extrato bruto de *K. pinnata* por 7 dias (Figura 24).

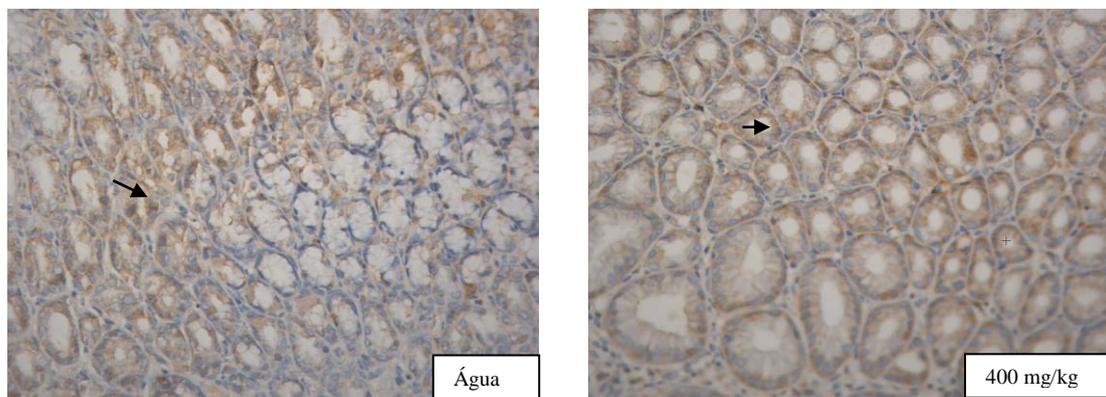
Figura 24- Quantificação da marcação imuno-histoquímica, para fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), em animais submetidos à indução de úlcera gástrica por ácido acético, após tratamento de 7 dias com extrato bruto de *Kalanchoe pinnata*, em diferentes doses.



Legenda: n=6-8 Efeito do tratamento do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* em três doses diferentes, após 7 dias de tratamento na marcação imuno-histoquímica para VEGF. (*) Os dados foram transformados para Box Cox valor de $\lambda=0,5$. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. A comparação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Dunnett.

A figura 25 exibe a reação imuno-histoquímica para VEGF na mucosa gástrica de ratos, após o tratamento por 7 dias com o extrato bruto de *K. pinnata*. Abaixo duas fotomicrografias pertencentes ao grupo água e ao grupo 400 mg/kg demonstrando que não houve diferença estatística na marcação deste fator de crescimento, em células de estômago, nos grupos tratados com o extrato bruto de *K. pinnata* quando comparados com o grupo controle (água).

Figura 25- Fotomicrografia da reação imuno-histoquímica para VEGF em estômago de animais submetidos ao modelo de úlceras gástricas por ácido acético, após tratamento com água, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg e Lansoprazol (30 mg/kg) por 7 dias. Aumento 40x.

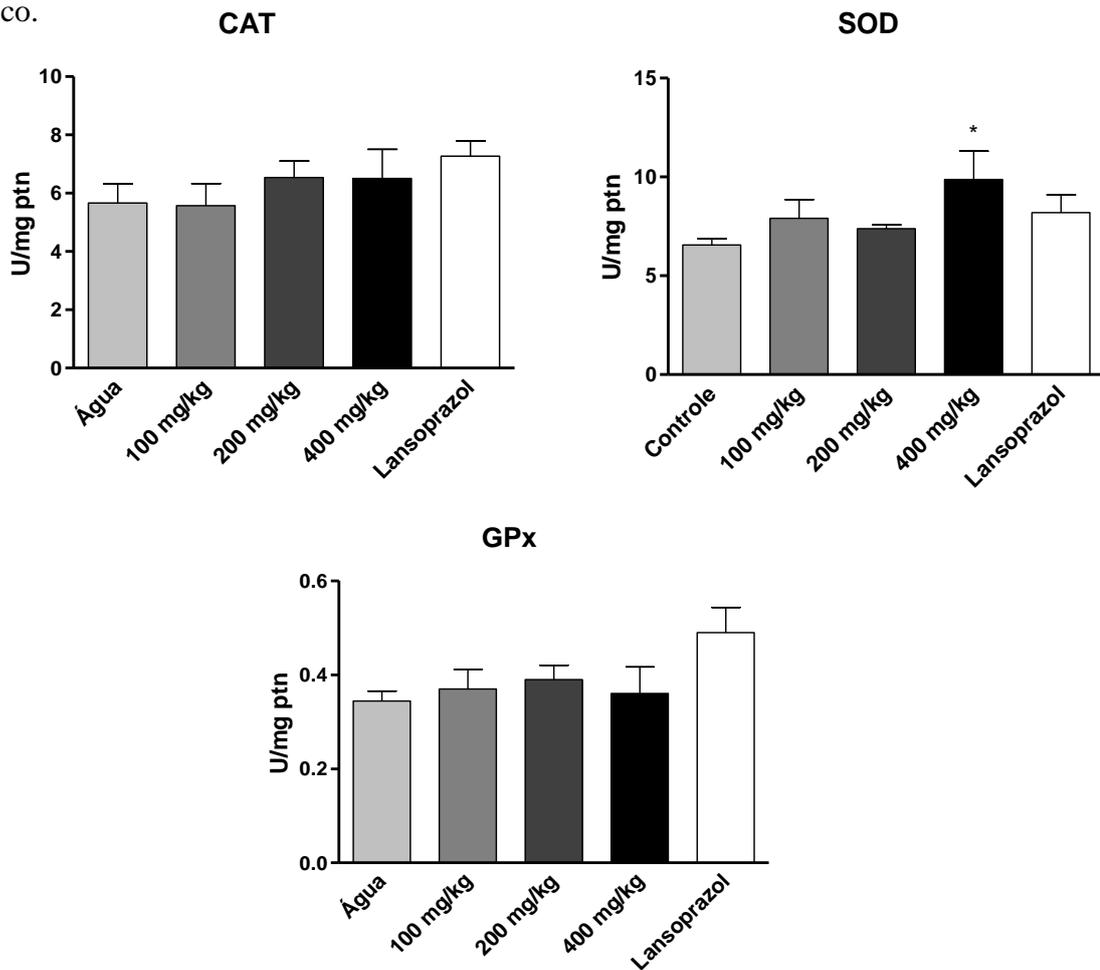


Legenda: As setas () mostram células da mucosa gástrica positivas para marcação de VEGF.

5.10 Determinação da Atividade de Enzimas Antioxidantes

Os gráficos abaixo demonstram a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx), após indução de úlcera por ácido acético e tratamento com o extrato bruto de *K. pinnata* durante 7 dias (Figura 26).

Figura 26- Atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx em estômago de ratos tratados durante 7 dias com o extrato bruto de *K. pinnata*, após indução de úlcera por ácido acético.

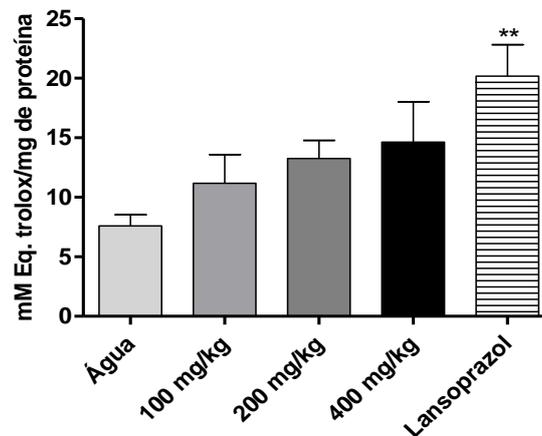


Legenda: Lansoprazol (30 mg/kg) e extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg (n=7-8), após modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético. Os resultados são expressos como média±SD. ANOVA seguido do teste de Dunnett *p<0,05.

5.11 Avaliação da Atividade Antioxidante em Homogenato de Estômago pelo Método de ORAC

A figura abaixo demonstra a avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto de *K. pinnata*, pelo método de ORAC, em homogenato de tecido de estômago de animais tratados durante 7 dias (Figura 27).

Figura 27- Atividade antioxidante *in vitro* pelo método de ORAC em estômago de ratos tratados durante 7 dias com o extrato bruto de *K. pinnata*, após indução de úlcera por ácido acético



Legenda: Lansoprazol (30 mg/kg) e extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg (n=6-8), após modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético. Os resultados foram expressos como média±erro padrão. ANOVA seguido do teste de Dunnett com **p<0,01.

5.12 Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro*

5.12.1 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

Os resultados de atividade antioxidante pelo método de ORAC do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9- Atividade antioxidante pelo método ORAC do extrato bruto e fração acetato de etila de *K.pinnata*. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão.

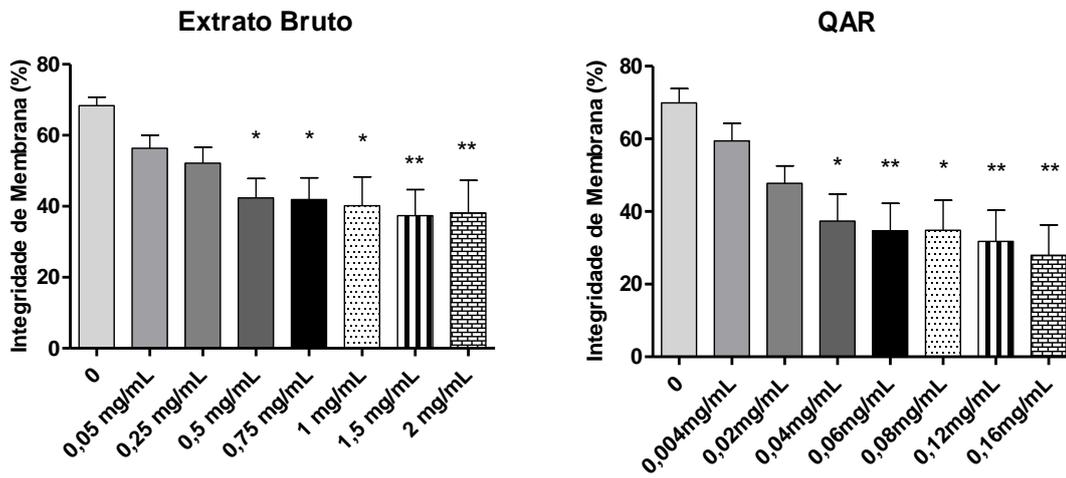
Amostras	µmol equivalente de Trolox/g de amostra seca
Extrato bruto	431,32 ± 7,17
Fração acetato de etila	1133,14 ± 112,61

5.13 Avaliação do Potencial Anti-inflamatório de *K. pinnata*

5.13.1 Ensaio de Integridade de Membrana (Necrose celular)

Após a incubação do extrato bruto e da substância majoritária (QAR) de *K. pinnata* com neutrófilos isolados de voluntários humanos, verificou-se que houve perda na integridade de membrana (células em necrose) a partir da dose de 0,5 mg/mL para o extrato bruto e 0,04 mg/mL para o QAR (Figura 28).

Figura 28- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de *K. pinnata* e do isolado quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil -(1 \rightarrow 2) - α -L-ranopiranosídeo (QAR) na integridade de membrana em neutrófilos humanos.

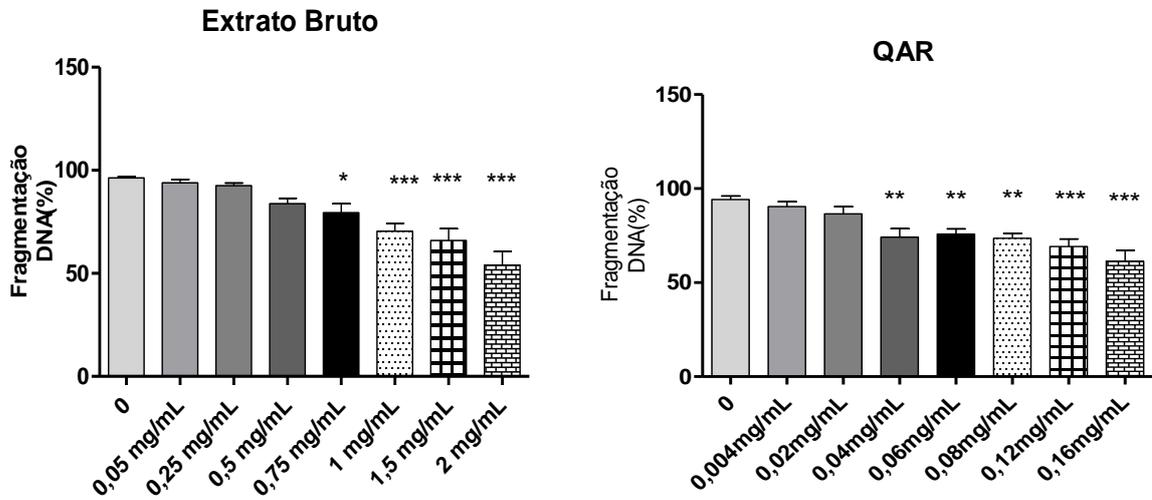


Legenda: Os dados em porcentagem foram expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$ de três diferentes experimentos realizados em duplicatas. ANOVA seguido do teste de Dunnett, com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.13.2 Ensaio de Fragmentação do DNA (Apoptose)

Após a incubação do extrato bruto e da substância majoritária (QAR) de *K. pinnata* com neutrófilos isolados de voluntários humanos, observou-se que a fragmentação do DNA (células em apoptose) ocorreu a partir da dose de 0,75 mg/mL para o extrato bruto e 0,04 mg/mL para o QAR (Figura 29).

Figura 29- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das follhas de *K. pinnata* e do isolado quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil -(1 \rightarrow 2) - α -L-ramnopiranosídeo (QAR) na fragmentação do DNA em neutrófilos humanos.



Legenda: Os dados em porcentagem foram expressos como média \pm erro padrão de três diferentes experimentos realizados em duplicatas. ANOVA seguido do teste de Dunnett, com * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001.

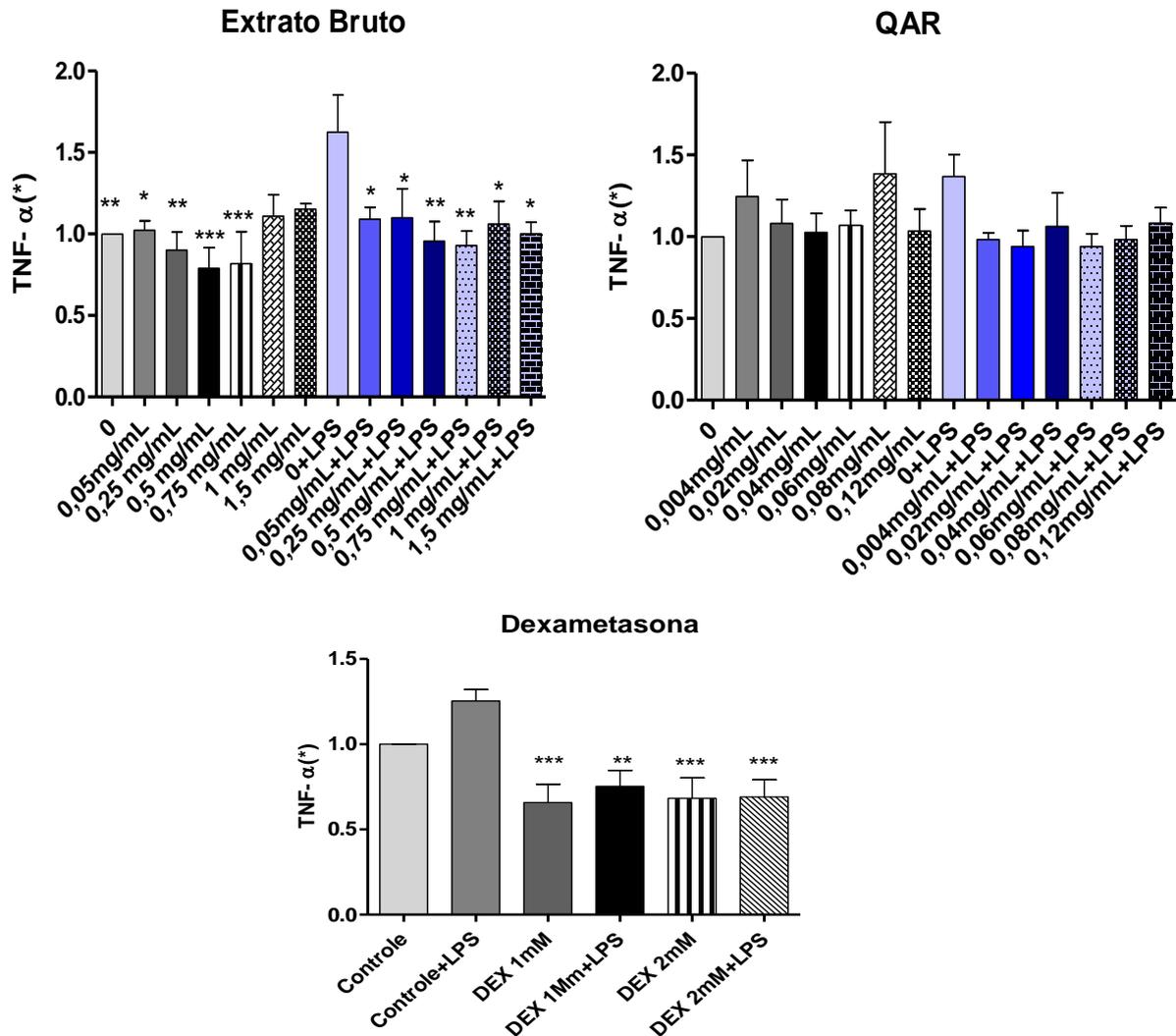
5.13.3 Determinação de Marcadores Inflamatórios (ELISA)

Os resultados relacionados com a detecção de citocinas, após o tratamento com o extrato bruto e o QAR em neutrófilos isolados de voluntários humanos estimulados ou não com LPS estão a seguir.

5.13.3.1 TNF- α

Os resultados para verificação do nível de TNF- α em células tratadas com o extrato bruto e QAR de *K. pinnata* indicaram que houve uma diminuição do nível de TNF- α em células tratadas com o extrato bruto de *K. pinnata*. No entanto, o mesmo evento não foi observado para o QAR em doses não citotóxicas (Figura 30).

Figura 30- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de *K. pinnata* e doisolado quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (QAR) na produção de TNF- α em neutrófilos humanos estimulados ou não com LPS. Dexametasona foi utilizada como controle positivo.

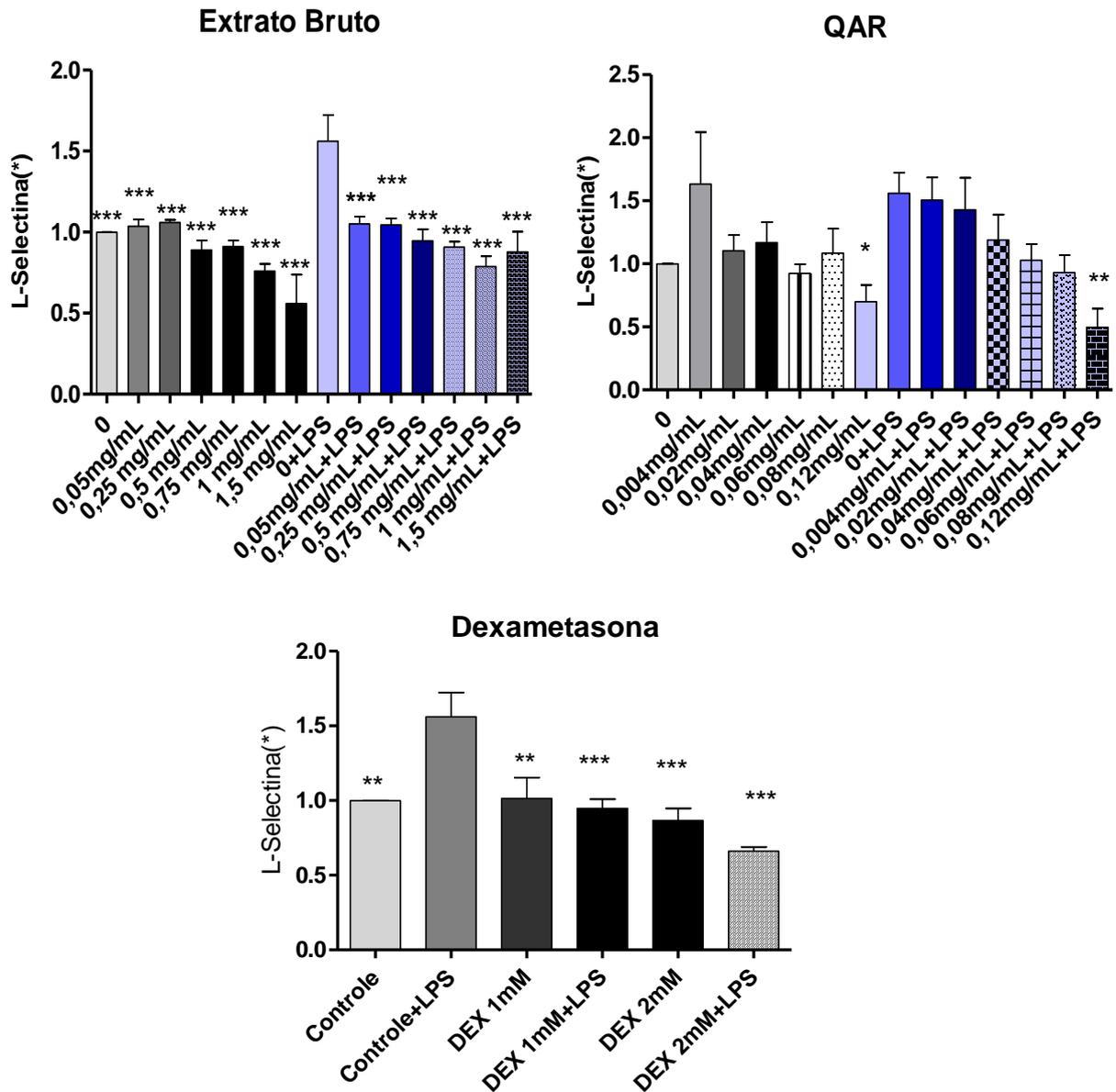


Legenda: (*) Os dados foram normalizados dividindo pelo valor do controle. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de três diferentes experimentos realizados em duplicatas. ANOVA seguido do teste de Dunnett, com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os valores foram comparados com o grupo controle estimulado com LPS. DEX=dexametasona.

5.13.3.2 L-Selectina

Os resultados para verificação do nível de L-selectina exibiram diferença estatística do nível desta citocina, em relação ao grupo controle estimulado com LPS em células tratadas com o extrato bruto de *K.pinnata*. Em relação ao tratamento com QAR esta diferença não foi observada em doses não citotóxicas (Figura 31).

Figura 31- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de *K. pinnata* e do isolado quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ranopiranosídeo na produção de L-selectina em neutrófilos humanos estimulados ou não com LPS. Dexametasona foi utilizado como controle positivo.

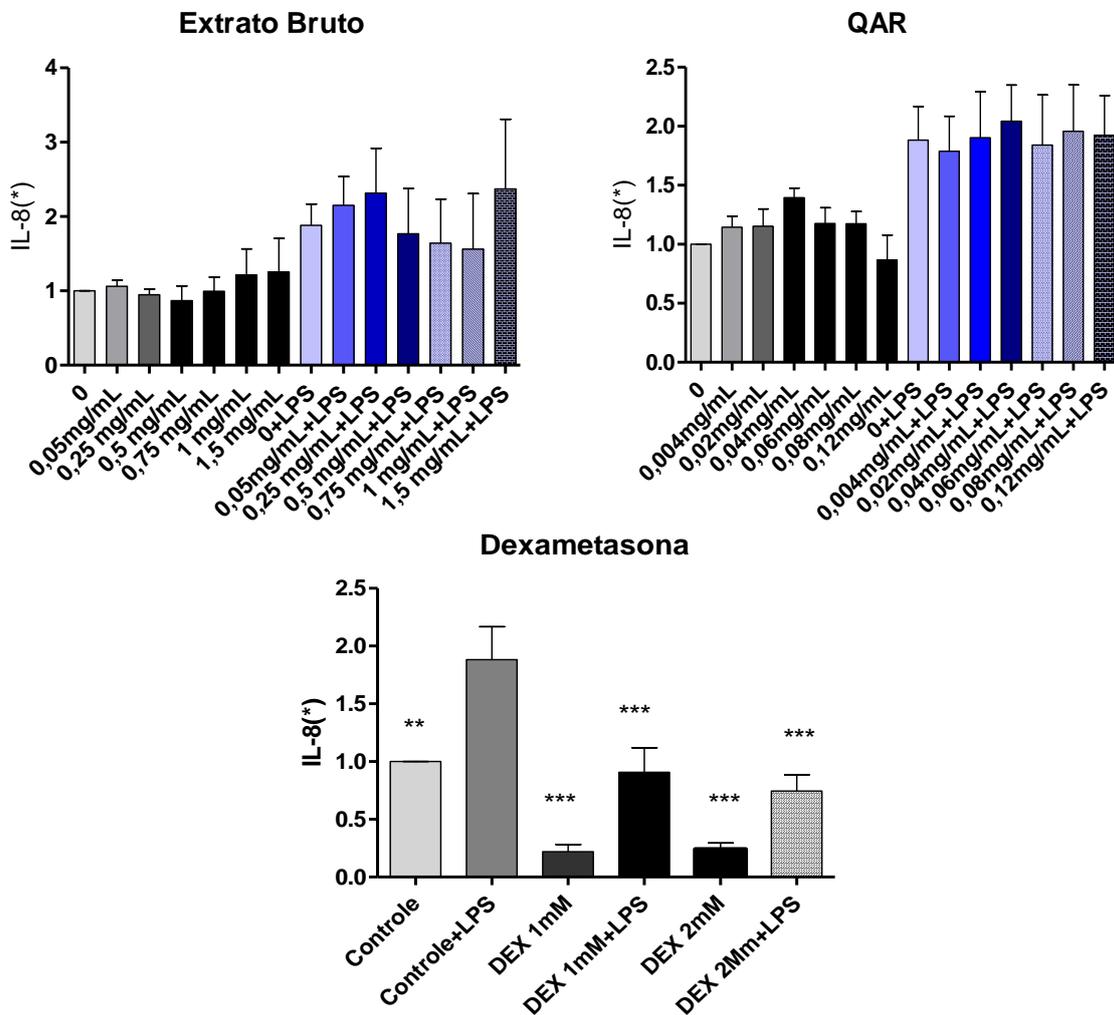


Legenda: (*) Os dados foram normalizados dividindo pelo valor do controle. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de três diferentes experimentos realizados em duplicatas. ANOVA seguido do teste de Dunnett, com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os valores foram comparados com o grupo controle estimulado com LPS. DEX=dexametasona.

5.13.3.3 IL-8

Os resultados para verificação do nível de IL-8 em células tratadas com o extrato bruto e QAR de *K. pinnata* não demonstraram diferença estatística no nível de IL-8, após tratamento com o extrato bruto e QAR de *K. pinnata* em neutrófilos humanos, comparados com o grupo controle estimulado com LPS em doses não citotóxicas (Figura 32).

Figura 32- Efeito de diferentes concentrações do extrato bruto das folhas de *K. pinnata* e do isolado quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo na produção de IL-8 em neutrófilos humanos estimulados ou não com LPS. Dexametasona foi utilizado como controle positivo.



Legenda: (*): Os dados foram normalizados dividindo pelo valor do controle. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de três diferentes experimentos realizados em duplicatas. ANOVA seguido do teste de Dunnett, com ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os valores foram comparados com o grupo controle, estimulado com LPS. DEX=dexametasona.

Discussão

6 Discussão

Desde milhares de anos, plantas medicinais são utilizadas pelo homem com a finalidade de tratar várias doenças (DUTRA et al., 2016). Segundo o trabalho realizado por Robinson e Zhang (2011), cerca de 3/4 da população que vive em países em desenvolvimento especialmente na Ásia, África, América Latina e Oriente Médio utiliza a medicina tradicional, sendo a maioria preparações à base de plantas medicinais. Isso porque a sua utilização na manutenção da saúde e também para algum aspecto de cuidados básicos é motivada por razões históricas e culturais, mesmo que a medicina moderna esteja disponível nestes países (OMS, 1999). Em alguns países industrializados, por exemplo, Canadá, França, Alemanha e Itália o uso de tal prática é igualmente significativa, pois entre 70% a 90% da população a utiliza com o título de “complementar”, “alternativo” ou “não-convencional” (ROBINSON; ZHANG, 2011).

Devido ao crescimento do uso de plantas medicinais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou monografias de espécies vegetais com fins médicos, as quais fornecem informações sobre garantia de qualidade, aplicações clínicas, aspectos farmacológicos, posologia e contraindicações (PALHARES et al., 2015). No Brasil, o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos é regulamentado pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CARVALHO et al., 2012). O interesse no uso de fitoterápicos também tem aumentado mundialmente. É estimado que o mercado global destes medicamentos alcance 20 milhões de dólares por ano (DUTRA et al., 2016).

A segurança e eficácia, de uma amostra vegetal para uso farmacêutico, são indispensáveis para assegurar a saúde do paciente (OMS, 1999). Dessa maneira, técnicas analíticas aplicadas ao controle de qualidade de preparações de espécies vegetais são de suma importância, pois garantem a qualidade destes produtos.

Com o desígnio de substituir, diminuir e refinar o uso de animais foram empregados métodos alternativos ao teste clássico de toxicidade aguda. Estes testes, dentre eles o de citotoxicidade e fototoxicidade, são validados e aceitos pela *European Committee for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) (HAMM et al., 2017). Assim, foi realizada a avaliação da citotoxicidade *in vitro* do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*, com a finalidade de estimar a DL₅₀, ou seja, dose capaz de causar morte em 50% dos animais em teste.

A viabilidade celular foi investigada utilizando células BALB/c 3T3 e neutral red (NRU), como corante vital. Este procedimento é baseado na habilidade de células viáveis incorporarem e se ligar ao corante. Os resultados gerados para este teste de citotoxicidade *in vitro* são utilizados para prever doses iniciais que poderão ser aplicadas em ensaios *in vivo* de toxicidade oral aguda em roedores (ICCVAM, 2006). De acordo com o documento da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) (2010), o emprego de ensaios de citotoxicidade *in vitro*, para estimar a LD₅₀, pode reduzir potencialmente o uso de animais em 25-40% (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010). O valor de IC₅₀ (0,926 mg/mL) referente ao extrato bruto de *K. pinnata* correspondeu ao valor de LD₅₀ 1341,46 mg/kg. Dessa maneira, é interessante a realização de ensaios toxicológicos *in vivo*, uma vez que a LD₅₀ teórica (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2010) é aproximadamente três vezes a maior que dose terapêutica.

No ensaio de úlcera gástrica subaguda, cujos comentários seguem adiante, o extrato bruto de *K. pinnata* foi administrado durante 7 dias aos animais. No entanto, não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos dos animais e diferença no desenvolvimento do peso corpóreo durante o tratamento.

Greer et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade, utilizando o corante vital Neutral Red, do extrato metanólico e do extrato acetônico das raízes de *K. pinnata*, na linhagem celular Vero C1008, após a constatação da atividade antiviral contra o vírus HSV1 e HSV2. No referido trabalho, concluiu-se que ambos os extratos apresentaram uma significativa atividade antiviral em concentrações de baixa citotoxicidade para tal linhagem celular. Outro estudo encontrado na literatura, no ano de 2005, reporta a avaliação da toxicidade aguda do extrato bruto aquoso de *K. pinnata* em camundongos. Neste estudo não houve morte para as doses testadas (0,1 a 8 g/kg), impossibilitando determinar a LD₅₀. Foram relatadas pelos autores alterações comportamentais observadas nos animais nas doses acima de 1g/kg. As altas doses administradas, em uma concentração final de 10g em 0,1 mL, são particularmente intrigantes, já que possivelmente ocorreu dificuldade na solubilização deste extrato (SOUSA et al., 2005).

A fração acetato de etila de *K. pinnata* apresentou alta porcentagem de viabilidade celular e conseqüentemente o valor de IC₅₀ não foi obtido nas concentrações avaliadas. Não foram testadas concentrações maiores da fração acetato de etila, pois a amostra apresentou problemas de solubilidade no solvente utilizado (DMSO 0,5%).

O ensaio de fototoxicidade também foi realizado para o extrato bruto e fração de acetato de etila *K. pinnata*. A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica após a

exposição da pele a uma substância, quando administrada por via tópica ou via sistêmica, tornando-se evidente após a exposição solar (PETERS; HOLZHÜTTER, 2002).

A partir dos resultados obtidos, para o extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* sugere-se que ambas as amostras não possuem fototoxicidade, de acordo com a classificação do guia da Organisation for Economic Co-operation and Development (2004). Não há relatos na literatura, em relação à aplicação deste teste utilizando extrato e frações de *K. pinnata*. Bark et al., (2010) avaliaram a fototoxicidade de diversas espécies de plantas medicinais orientais, concluindo que mais de ¼ das espécies pode ser considerada fototóxica.

O ensaio de contagem microbiana foi realizado na droga vegetal e no extrato bruto de *K. pinnata*, não sendo identificadas bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras. O material vegetal foi obtido da coleção do CPQBA e submetido à secagem por estufa de circulação de ar. A contagem microbiana para bactérias aeróbias/mesófilas foi de $6,9 \times 10^4$ UFC/g na droga vegetal e está dentro dos limites estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde-OMS (WHO, 2007) que é de 10^5 UFC/g, para materiais vegetais com a finalidade de uso interno. A contagem de bolores e leveduras foi de $2,4 \times 10^3$ UFC/g e também foi observada a mesma ocorrência, ou seja, um valor dentro do limite estabelecido pela OMS (WHO, 2007) que é de 10^3 UFC/g. Já no extrato bruto não houve contagem para bactérias aeróbias/mesófilas, bolores e leveduras. Tal resultado se deve ao processo extrativo utilizando etanol 70%, o qual apresenta atividade antimicrobiana. Dessa maneira, o etanol 70% além de extrair metabólitos secundários presentes na estrutura celular das folhas, foi responsável por exterminar a carga microbiana existente na droga vegetal.

Diversos trabalhos foram publicados com o objetivo de investigar a contaminação microbiana em amostras vegetais. Na maioria dos trabalhos foi verificada uma contagem de micro-organismos acima dos valores recomendados pela Farmacopeia Brasileira e Organização Mundial da Saúde, que pode acarretar na deterioração do material vegetal, oferecendo risco à saúde (BUGNO et al., 2005; MARCONDES; ESMERINO, 2010; FERNANDES et al., 2009). Os micro-organismos, assim como as endotoxinas, podem desencadear uma resposta inflamatória. As endotoxinas são lipopolissacarídeos associados à membrana externa de bactérias gram-negativas. São liberadas no trato gastrointestinal pela desintegração ou morte da bactéria (SONAGE et al., 2011). Desta maneira, foi realizada análise de endotoxinas. Esta análise mostrou valores elevados, tanto para o extrato bruto como para a fração acetato de etila de *K. pinnata*, quando comparada ao limite estabelecido pela FDA para soluções endovenosas (5UE por kg). Sonage e colaboradores (2011)

verificaram que endotoxinas administradas oralmente em coelhos não foram absorvidas, não penetrando para a circulação sistêmica. Isso ocorreu provavelmente, devido à repulsão entre o LPS aniônico, na forma de micela, e o muco carregado negativamente, presente no epitélio intestinal. Estas observações são importantes, considerando que o extrato bruto foi administrado por via oral aos animais.

Assim, é importante salientar que as boas práticas de cultivo, para assegurar o controle de qualidade microbiológico de plantas medicinais se torna um ponto importante para ser realizado, já que a resposta biológica pode ser influenciada pela presença dos contaminantes (SANTOS et al., 2013).

Durante o mestrado foram realizados ensaios iniciais para a verificação da atividade antiúlcera de *K. pinnata* (SOBREIRA, 2013). Como os resultados foram favoráveis, o andamento do trabalho com o foco no mecanismo de ação da atividade gastroprotetora e cicatrizante de úlceras gástricas foi continuado. Ademais, as análises fitoquímicas foram prosseguidas com a finalidade de identificação de substâncias para possível sugestão do envolvimento destes com a atividade biológica.

O extrato bruto e a fração acetato de etila de *K. pinnata* foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Referente à análise do extrato bruto observou-se um pico majoritário, possivelmente flavonoide, já que o espectro ultravioleta (UV) foi característico. O espectro UV de um flavonoide consiste tipicamente em dois picos de absorção máxima entre 240-285 nm (banda II, devida à absorção do anel A) e 300-550 nm (banda I, devida ao anel B) (CUNHA, 2005). Análise de espectro de massas foi realizada para confirmar tal sugestão. Dessa maneira, foi constatado que este pico pertence a esta classe de substância. Isto é, o pico foi identificado como é quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (**3**).

Em relação à fração acetato de etila, alguns ensaios, já foram realizados pelo nosso grupo durante o mestrado. Foram isolados e identificados dois flavonoides glicosilados desta fração, quercitrina (**5**) e quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (**3**), previamente isolados em folhas, por Ichikawa (1986), Muzitano et al., 2006a; Muzitano et al., 2006b) e Sobreira et al., (2017).

A quantificação da substância quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo por CLAE no extrato bruto de *K. pinnata* é um parâmetro importante para padronização deste extrato. Este flavonoide foi encontrado em concentrações consideráveis no extrato bruto ($9,64 \pm 2,3$ g/100g de extrato bruto, o que corresponde a 0,11% na planta fresca) e também foi reportado nas espécies *Alphitonia philippinensis* (Rhamnaceae) e

Rollinia emarginata (Annonaceae) (JOU et al., 2004; ROTH et al., 2011). Assim, este flavonoide é a substância majoritária presente no extrato bruto, em concordância com trabalhos anteriormente publicados, podendo ser um marcador analítico para o controle de qualidade desta espécie (MUZITANO et al., 2006b; FÜRER et al., 2013).

Muzitano et al., (2011) também realizaram a quantificação de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo, além de outros flavonoides, presentes em extratos aquosos de *K. pinnata* submetidos a diferentes condições de cultivo. Na melhor condição de cultivo das folhas de *K. pinnata*, observou-se que a concentração do flavonoide majoritário foi de 2,092%. No entanto, o padrão externo utilizado foi a rutina. Provavelmente, esta foi a razão pelo qual o nosso grupo encontrou uma concentração superior, já que o padrão externo empregado foi a própria substância majoritária.

Outras substâncias também foram identificadas no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*, tais como: miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (**1**), miricetina-3-O-rhamnopiranosídeo (**1.1**), mearnsetina-3-O-pentosilramnopiranosídeo (**2**), quercetina 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (**4**), 4',5,7-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**5.1**) kaempferol-3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (**6**). As substâncias identificadas no extrato bruto foram **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**. Já as substâncias identificadas na fração acetato de etila correspondem ao **1**, **1.1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **5.1** e **6**.

Miricetina-3-O-ramnopiranosídeo (**1.1**) e 4',5,7-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**5.1**) foram identificadas somente na fração acetato de etila de *K. pinnata*. Mearnsetina-3-O-pentosilramnopiranosídeo (**2**) e quercetina 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (**4**) foram identificadas pela primeira vez na espécie, sendo que este último é isômero do composto majoritário, quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo, presente no extrato bruto de *K. pinnata*. As demais foram reportadas em trabalhos anteriores (MUZITANO et al., 2006a; 2006b; FÜRER et al., 2013; FÜRER et al., 2016)

No intuito de avaliar a atividade antiúlcera de *K. pinnata* utilizou-se o modelo de indução de úlceras gástricas por etanol acidificado. As lesões gástricas são geradas pela administração intragástrica de uma solução de etanol e ácido (0,5-2,0mL) e o dano da mucosa gástrica se inicia após 1-3 minutos da administração (GLAVIN; SZABO, 1992).

O etanol em conjunto com o ácido é largamente utilizado experimentalmente para induzir úlceras gástricas em animais, pois penetra na mucosa gástrica rapidamente. O etanol causa dano vascular e necrose das células gástricas gerando a formação de úlceras, devido a

uma resposta inflamatória e uma série de eventos que envolvem a liberação de radicais livres, citocinas inflamatórias, aumento da permeabilidade vascular e agregação plaquetária, conduzindo a uma vasoconstrição, edema e hemorragia, comprometendo o fluxo sanguíneo da mucosa (SILVA et al., 2009; ABDELWAHAB et al., 2011; BOLTIN et al., 2014).

Em nosso trabalho, o extrato bruto de *K. pinnata* foi avaliado em três doses diferentes (100, 200 e 400 mg/kg). Observou-se uma tendência à curva dose resposta. A dose de 400 mg/kg demonstrou ter uma capacidade mais eficiente para reduzir úlceras. Este experimento foi realizado novamente, já que o controle positivo anteriormente utilizado (Lansoprazol) é instável em meio ácido e apresenta-se com revestimento entérico (RANG et al., 2012). Entretanto, para a administração aos animais, o comprimido é triturado, sendo este revestimento rompido. Assim, o cloprostenol, um análogo $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi utilizado prevenindo a formação de úlceras gástricas produzidas pelo etanol, confirmando a importância das prostaglandinas para a integridade da mucosa gástrica.

A fração acetato de etila também foi analisada pela segunda vez, pois o resultado do primeiro ensaio não forneceu uma curva dose resposta (dados não mostrados). Dessa maneira, neste ensaio foram administradas aos animais as doses de 50, 100 e 200 mg/kg, evidenciando uma tendência ao efeito dose-resposta, sendo que a dose de 200 mg/kg foi a mais ativa na redução de úlceras gástricas.

Após determinar que o extrato bruto e a fração acetato de etila possuem efeito gastroprotetor, as doses mais efetivas do extrato bruto (400 mg/kg) e da fração acetato de etila (200 mg/kg) foram selecionadas para prosseguir com os experimentos de mecanismo de ação.

Primeiramente foi avaliado se a enzima ciclo-oxigenase (COX) é uma via utilizada pelo extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*, para promover a gastroproteção. Para isso, os animais foram pré-tratados com indometacina, um fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE), que atua na via da ciclo-oxigenase, e posteriormente tratados com etanol. Assim, qualquer substância que necessite desta via perderá a sua ação. Observou-se o aumento da área de lesão nos animais pré-tratados com indometacina seguida da administração de extrato bruto (400mg/kg) e da fração acetato de etila (200mg/kg), sugerindo o envolvimento desta via. Como a indometacina é um inibidor não seletivo das duas isoformas da COX, outro ensaio foi realizado com etoricoxibe, inibidor seletivo de COX-2, para verificar se esta enzima, em conjunto com a COX-1, tem participação na redução da gastroproteção.

Neste ensaio experimental, visualizou-se que os animais pré-tratados com etoricoxibe não se diferenciaram do grupo pré-tratado com salina, sugerindo que não houve o envolvimento da enzima COX-2 na gastroproteção do extrato bruto e fração acetato de etila. Dessa maneira, provavelmente, somente a ação da COX-1 está envolvida neste processo.

A ciclo-oxigenase apresenta duas principais isoformas COX-1 e COX-2, que transformam ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. Ambas atuam na defesa da mucosa gástrica, porém em vias diferentes. A COX-1 é uma enzima constitutiva que desempenha funções de homeostase dos tecidos e está relacionada com a capacidade de reduzir a secreção de ácido gástrico, estimular a produção de muco e secreção de bicarbonato na mucosa gástrica, reduzir a permeabilidade das células do epitélio gástrico, diminuindo o refluxo de ácido e contribuir para o fluxo sanguíneo basal da mucosa gástrica. Isto é, as prostaglandinas derivadas principalmente da COX-1 são importantes para a integridade da mucosa gástrica gastroproteção e cicatrização de úlceras gástricas. Já a COX-2 está relacionada com processos inflamatórios como o aumento do fluxo sanguíneo, redução da aderência e ativação de leucócitos e ativação da atividade de fatores de crescimento contribuindo também para a cicatrização de úlceras gástricas (BRZOZOWSKI et al., 2005; WALLACE, 2008; RANG et al., 2012).

O próximo passo foi verificar se grupamentos sulfidríla (SH) estão envolvidos no mecanismo de proteção gástrica promovido pelo extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*. Estes compostos estão presentes na composição da enzima glutathione (HUBER; ALMEIDA, 2008). Alguns estudos já verificaram a participação desses grupamentos na gastroproteção de substâncias naturais (VERA-ARZAVE et al., 2012; ZAKARIA et al., 2015). Para tanto, foi utilizado um bloqueador de grupamentos sulfidríla, *N-ethylmaleimide* (NEM). Os resultados demonstraram que com a depleção de grupamentos sulfidríla o efeito gastroprotetor do extrato bruto e do cloprostenol diminuíram, indicando que atividade gastroprotetora é dependente dos níveis de SH na mucosa gástrica. Szabo et al., (1981) reportaram que grupamentos sulfidríla facilitam a ação da prostaglandina $F_{2\beta}$ para realizar seu efeito gastroprotetor. Os grupamentos sulfidríla estão presentes no muco gástrico, sequestram radicais livres e estão relacionados ao aumento síntese da prostaglandinas na mucosa gástrica. Além disso, sua redução pode influenciar a estrutura do muco gástrico, como por exemplo, a diminuição de pontes de dissulfeto altera o estado físico do muco, tornando-o hidrossolúvel. Dessa maneira, os grupamentos sulfidríla participam da gastroproteção (SZABO et al., 1981).

Vários estudos comprovaram a importância do óxido nítrico na proteção da mucosa gástrica (BONAMIM et al., 2014; JÚNIOR et al., 2014). A NO tem um papel importante na defesa da mucosa gástrica, pois é um potente vasodilatador e modula a circulação gástrica, regula a secreção de muco e bicarbonato, inibe a secreção do ácido gástrico protegendo o epitélio gástrico contra agentes nocivos e age na eliminação de radicais superóxidos e inibe a adesão leucocitária no endotélio vascular. Além disso, NO age em conjunto com as prostaglandinas nos mecanismos de defesa da mucosa gástrica. (KUBES et al., 1991; LAINE et al., 2008; SZLACHCIC et al., 2013; TAKEUCHI et al., 2011; MAGIEROWSKI et al., 2015). Assim, o papel do óxido nítrico na gastroproteção do extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* foi avaliado.

No ensaio foi administrado *do N-nitro-L-arginine methyl- ester* (L-NAME), um inibidor do óxido nítrico (NO) sintase, enzima responsável pela produção de NO. Constatou-se que a gastroproteção observada anteriormente à administração do L- NAME pela fração acetato de etila foi anulada, sugerindo o envolvimento do NO na proteção da mucosa gástrica.

Propomos que a gastroproteção exercida pelo extrato bruto de *K. pinnata* é atribuída à ação do SH e das prostaglandinas. Já no mecanismo de gastroproteção da fração acetato de etila de *K. pinnata* sugere-se o envolvimento de NO e das prostaglandinas.

Uma possível sugestão para fato de que o extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* exercerem gastroproteção por distintos mecanismos é que ambas as amostras possuem composição química em termos qualitativos e quantitativos diferentes entre si. Por exemplo, no extrato bruto a substância majoritária é a quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α - L-ramnopiranosídeo. Já na fração acetato de etila é a quercitrina (SOBREIRA, 2013). Klein-Júnior et al. (2013) também verificaram diferentes mecanismos de gastroproteção para o extrato e fração de *Polygala cyparissias*. Neste trabalho, os autores demonstraram que o extrato acetônico de *P. cyparissias* é dependente de NO para a gastroproteção, enquanto o mecanismo para tal ação exercido pela fração metanólica é dependente dos grupos sulfidríla. Assim, os autores justificaram que esta observação pode ser devida a diferente constituição química entre o extrato acetônico e a fração metanólica, pois não foi observada a presença de xantonas, por técnicas de TLC e HPLC, na fração metanólica de *P. cyparissias*.

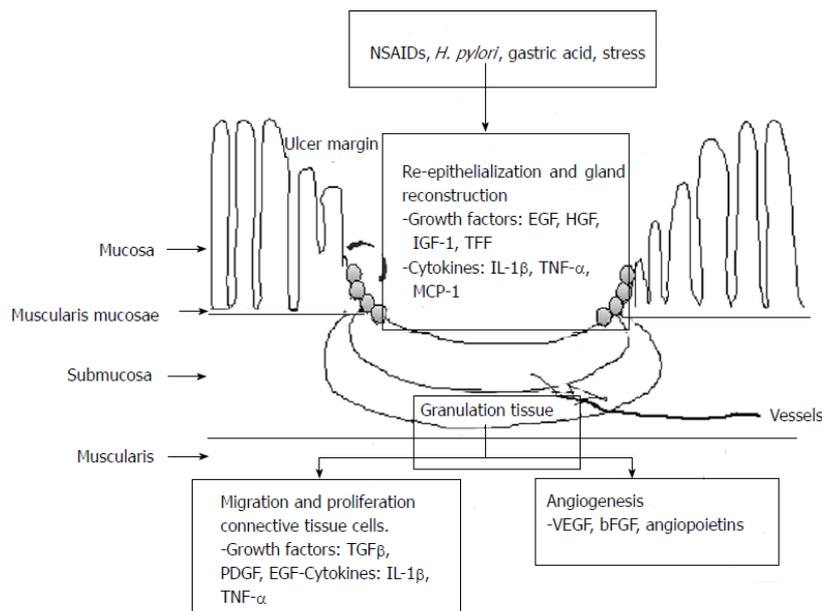
A próxima etapa do trabalho foi avaliar a cicatrização de *K. pinnata*. Sendo assim, foi escolhido o modelo de indução por ácido acético, o qual é bem estabelecido e foi descrito por

Okabe (2005). O ácido acético causa erosão da mucosa gástrica e modifica a permeabilidade celular (NIU et al., 2016).

Este modelo experimental é frequentemente utilizado, pois o procedimento de indução das úlceras nos animais é relativamente simples com tamanho e severidade consistentes e incidência de 100%; as úlceras se assemelham às úlceras humanas tanto em mecanismos patológicos quanto de cicatrização e respondem bem ao tratamento com fármacos anti-úlceras, como os inibidores da bomba de prótons, sucralfato, entre outros (OKABE, 2005).

A cicatrização de úlceras gástricas é um processo que envolve várias etapas como proliferação celular, migração, diferenciação, regeneração, angiogênese ativa e deposição da matriz extracelular, conduzindo a formação de uma cicatriz. Esses processos são orquestrados por diversos fatores de crescimento, citocinas, hormônios e fatores de transcrição (KANGWAN et al., 2014; TARNAWSKI; AHLUWALIA, 2012). A re-epitelização, que consiste na migração de células epiteliais da margem da úlcera para restabelecer a continuidade epitelial, se inicia dentro de três dias após a formação da úlcera. Este processo é essencial para a cicatrização de úlceras gástricas. Isso porque, uma barreira epitelial contínua protege o tecido de granulação de uma injúria mecânica, química ou de uma infecção (Figura 33) (TARNAWSKI, 2005).

Figura 33. Vias intracelulares envolvidas no mecanismo de cicatrização de úlceras gástricas.



Fonte: Kangwan et al., (2014).

O ensaio foi realizado com extrato bruto de *K. pinnata*. A fração acetato de etila de *K. pinnata* não foi utilizada neste modelo experimental, pois o seu rendimento é muito baixo, tornando inviável a administração desta fração aos animais, durante vários dias. Neste trabalho, três doses (100, 200 e 400 mg/kg) diferentes de extrato de *K. pinnata* foram testadas com a finalidade de verificar sua atividade cicatrizante. De acordo com os resultados macroscópicos a dose de 200mg/kg e 400 mg/kg reduziram a área de lesão, com uma taxa de 33% e 39%, respectivamente após 7 dias de tratamento ($p < 0,05$). Lansoprazol, fármaco de referência utilizado, também mostrou melhora significativa na cicatrização da lesão gástrica ($p < 0,05$).

Análise histológica das lâminas de mucosa gástrica de ratos corados com HE submetidos ao modelo de indução por ácido acético do grupo controle mostrou a presença de lesões extensas, ausência de regeneração na maioria das lâminas analisadas (71%) e infiltrado inflamatório moderado com predomínio de células polimorfonucleares. No entanto, os achados histopatológicos dos grupos tratados com o extrato bruto de *K. pinnata* (200 e 400 mg/kg) e lansoprazol (30 mg/kg) demonstraram um resultado mais promissor justificado pela re-epitelização da mucosa gástrica (na maioria das lâminas analisadas) e tecido de granulação exuberante, proliferação fibroblástica evidente, fundamental para o processo de cicatrização em relação ao grupo controle, em consonância com os resultados observados na análise macroscópica. Lâminas representativas de cada grupo também foram submetidas à coloração por Mallory para verificação da deposição de fibras colágenas. Não foi realizada a quantificação das fibras colágenas onde houve a cicatrização. No entanto, subjetivamente notou-se uma quantidade maior da densidade dos feixes de fibras colágenas que se distribuem ao longo de toda área que se encontra em reparação por cicatrização nos grupos tratados com 200 mg/kg e 400 mg/kg em comparação com o grupo controle.

O VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) é um dos fatores de crescimento envolvido na cicatrização de úlceras gástricas. Dessa maneira, sua expressão foi avaliada em tecido gástrico proveniente do mesmo modelo de ação. Este fator de crescimento age como uma célula endotelial mitógena, agente quimiotático e indutor da permeabilidade vascular, além de estar relacionado com a angiogênese e deposição de colágeno. O tempo de expressão de VEGF está relacionado com a progressão da cicatrização da úlcera. Durante a fase proliferativa do processo de reparo, que ocorre aproximadamente em 3 a 7 dias, VEGF é super-regulado para promover as fases iniciais da angiogênese (por exemplo, dilatação vascular, permeabilidade, migração e proliferação) (BAO et al., 2009). A angiogênese é

essencial para o reestabelecimento da microcirculação na mucosa gástrica e crucial para o suprimento de oxigênio e nutrientes (KANGWAN et al., 2014).

Conforme outros estudos já existentes na literatura (TANIGAWA et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2010), foi observada a expressão de VEGF em células epiteliais na margem da úlcera induzida por ácido acético. Verificou-se que com tratamento de 200 e 400 mg/kg de extrato bruto de *K. pinnata* houve um pequeno aumento da expressão de VEGF. No entanto, não foi encontrada diferença significativa de sua expressão quando comparada com os animais tratados com água. Sendo assim, sugere-se que este fator de crescimento, aparentemente, não influencia no processo de regeneração das úlceras gástricas promovida pelo extrato bruto de *K. pinnata*, após 7 dias de tratamento. Dessa maneira, outros fatores de crescimento incluindo o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento de insulina símile 1 (IGF-1), fator trefoil, prostaglandina resultante da ativação de COX-2 e angiopoetinas poderão estar relacionados com a melhora da cicatrização de úlceras gástricas promovida pelo extrato bruto de *K. pinnata* (KANGWAN et al., 2014; TARNAWSKI, 2013), o que deverá ser estudado em futuros trabalhos.

Espécies reativas de oxigênio estão relacionadas com inúmeras doenças, incluindo a úlcera péptica. A exposição aos radicais livres conduziu o organismo a desenvolver mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, que podem ser preventivos ou reparadores. Dessa maneira, para neutralizar o dano oxidativo as células têm um sistema de defesa enzimático, exercido pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPx) e glutationala redutase (GRx) e não enzimático (antioxidantes endógenos e aqueles obtidos de maneira exógena pela dieta) (ATALAY et al., 2016; VALKO et al., 2007; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008).

A aplicação de ácido acético na mucosa gástrica induz o aparecimento da lesão gástrica resultante do estresse oxidativo, indicado pela diminuição da atividade da SOD e do nível de GSH além do aumento da peroxidação lipídica evidenciada pelo aumento de MDA (MEI et al., 2013). Assim, compostos antioxidantes são úteis na proteção da mucosa gástrica contra o estresse oxidativo (KARAKOYUN et al., 2009).

Dessa maneira, foi avaliada a participação das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutationala peroxidase) no mecanismo de cicatrização de *K. pinnata* em modelo de indução de úlceras por ácido acético.

A enzima SOD, a primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica, tem um papel crucial na neutralização de ROS. Esta enzima catalisa a dismutação de O_2^- em H_2O_2 , menos

nocivo, o qual é degradado pela CAT ou GPx. A CAT é a enzima que acelera a degradação de H_2O_2 em H_2O e O_2 . A segunda via do metabolismo do H_2O_2 depende da atividade da GPx com a cooperação da glutathiona redutase. A redução de H_2O_2 em H_2O é acompanhada pela conversão da GSH (forma reduzida) para a forma oxidada (GSSG) (KWIECIEN et al., 2014; MAGIEROWSKI et al., 2015).

Os resultados de nosso estudo indicaram aumento significativo da atividade de SOD ($p < 0,05$), após o tratamento com o extrato bruto de *K. pinnata* (400 mg/kg), quando comparado com o grupo que recebeu água. No entanto, não houve aumento das atividades das enzimas CAT e GPx, após tratamento com o extrato bruto.

O sobrenadante do homogenato dos estômagos dos animais submetidos ao modelo de indução de lesão gástrica por ácido acético também foi utilizado para o teste de atividade antioxidante utilizando a metodologia ORAC. Neste ensaio o potencial antioxidante é determinado por fluorescência. Este método se baseia na atividade do sequestro de radical peroxil, derivado do AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride], que é medido pelo decaimento da fluorescência devido à oxidação da fluoresceína. Na presença de uma substância antioxidante, a fluoresceína tem sua fluorescência mantida (HUANG et al., 2005; NILE et al., 2012). Observou-se que não houve alteração da atividade antioxidante entre os grupos tratados e controle neste ensaio. No entanto, o lansoprazol apresentou esta ação. Segundo Takagi et al. (2009), o lansoprazol além de ser um potente inibidor da bomba de prótons reduzindo a secreção de ácido gástrico nas células parietais, também está envolvido na indução de enzima antioxidante HO-1 (heme oxigenase-1) nas células da mucosa gástrica promovendo a proteção da mucosa.

Ensaio *in vitro* utilizando a mesma metodologia descrita acima (ORAC), demonstrou uma maior capacidade de sequestro de radicais peroxil da fração acetato de etila quando comparado com o extrato bruto de *K. pinnata*.

Dessa maneira, os resultados demonstraram que a redução do dano oxidativo está parcialmente correlacionada com a atividade antioxidante do extrato bruto de *K. pinnata*, ou seja, com o aumento da atividade da enzima SOD e possivelmente também com o sequestro do radical peroxil, resultado verificado *in vitro*. Estes efeitos contribuem para a melhora da cicatrização de úlceras gástricas apresentada nesta pesquisa pelo extrato bruto de *K. pinnata*. O aumento da atividade deste biomarcador do estresse oxidativo (SOD) também foi reportado em animais hipertensos, em fígado, artéria aorta, coração e rins, após o tratamento com o extrato aquoso de *K. pinnata* (BOPDA et al., 2014).

O restabelecimento do status antioxidante na úlcera gástrica, promovido pelo extrato bruto de *K. pinnata* pode estar relacionado com a presença de flavonoides nas amostras, inclusive as substâncias identificadas no presente trabalho, que já haviam sido isoladas nesta espécie (ICHIKAWA; OGURA; IJIMA, 1986; GAIND e GUPTA, 1971; MUZITANO et al. 2006a; MUZITANO et al., 2006b; EL ABDELLAOUI et al., 2010; TATSIMO et al., 2012; SOBREIRA, 2017).

Apesar dos flavonoides serem largamente utilizados e vários estudos sugerirem promissoras atividades farmacológicas, os mecanismos de absorção digestiva e de biodisponibilidade não estão completamente explicados (ERLUND et al., 2000; CUNHA, 2005). Tipicamente a absorção dos flavonoides glicosilados, tanto em humanos como em ratos, está associada com a clivagem e liberação da aglicona, resultado da ação da enzima lactose florizina hidrolase (LPH). Em outro mecanismo envolvido, a absorção desta classe de compostos está relacionada com transportadores de glicose (SLGT1). Além disso, as agliconas antes de serem transportadas para a corrente sanguínea sofrem metabolismo de fase II resultando em metabólitos sulfato, glucoronídeo e metilado através da ação das respectivas enzimas, sulfotransferases (SULTs), uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferase (UGT) e catecol-O-metiltransferases (COMTs) (DEL RIO et al., 2013; DAI et al., 2015). Enzimas bacterianas podem também quebrar as moléculas dos flavonoides influenciando sua absorção (GONZÁLEZ et al., 2011; CUNHA, 2005). Por conseguinte, esses mecanismos de metabolização podem reduzir a biodisponibilidade dos flavonoides (GONZÁLEZ et al., 2011). Choi et al. (2012) verificaram que a quercetina apresentou fraca atividade antioxidante *in vitro* em relação aos seus compostos glicosilados (isoquercitrina, hiperina e quercitrina), porém, quando testada sua capacidade antioxidante em células HepG2 verificaram que seu desempenho foi melhor em comparação à isoquercitrina e quercitrina, sugerindo que esta atividade depende da permeabilidade celular de cada composto. Em função desse comportamento dos flavonoides, não é possível relacionar diretamente atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

Visto que a participação de *H. pylori* no desenvolvimento de úlceras gástricas é relevante, a busca por um novo fármaco que promova a cicatrização de úlceras pépticas e a erradicação de *H. pylori* seria interessante. Várias espécies vegetais já foram testadas contra esta bactéria e mostraram ter um potencial em inibir o seu crescimento (TAKEUCHI et al., 2014). Assim, foi avaliada a atividade anti-*H. pylori* do extrato bruto de *K. pinnata*. Entretanto, este extrato não apresentou ação anti-*H. pylori*, apresentando um CIM >1000 µg/mL.

Além da investigação da atividade antiúlcera do extrato bruto de *K. pinnata*, o potencial anti-inflamatório do extrato e da sua substância majoritária, (quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (QAR), foi avaliado em neutrófilos isolados de voluntários humanos.

Foi observado que o tratamento com o extrato bruto de *K. pinnata* e QAR em neutrófilos ocasionou perda da integridade de membrana (evento característico de morte celular) a partir das doses de 0,5 mg/mL e 0,04 mg/mL, respectivamente. Em relação à fragmentação de DNA, foi observado que este evento característico de apoptose ocorreu a partir da dose de 0,75 mg/mL para o extrato bruto e 0,04 mg/mL para o QAR de *K. pinnata*.

Em relação à produção de citocinas, gerada após o tratamento do extrato bruto de *K. pinnata* em células de neutrófilos, foi verificado uma diminuição no nível de TNF- α e L-selectina em todas as doses testadas, em relação ao grupo controle, quando o estímulo positivo LPS foi introduzido. Entretanto, não foi observada a mesma ação sobre estas citocinas, quando submetidas ao tratamento com QAR. Já a produção de IL-8 não foi diminuída, tanto após o tratamento com o extrato bruto quanto após o tratamento com QAR, nas doses testadas. Vale a pena relatar que a diminuição das citocinas pró-inflamatórias, citadas acima, nas doses superiores a 0,5 mg/mL para o extrato bruto e 0,04 mg/mL para o QAR pode ser devida à morte celular.

Alguns estudos encontrados na literatura demonstraram a atividade anti-inflamatória das folhas de *K. pinnata* (OJEWOLE et al., 2005; SOUSA et al., 2005). Afzal et al. (2012) revelaram que a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* é principalmente devido à presença da substância esteroideal (urs Stigmast-4, 20 (21), 23-trien-3-ona). Ojewole e colaboradores (2005) sugerem que a atividade anti-inflamatória de *K. pinnata*, evidenciada em seu estudo, pode ser atribuída à presença de flavonoides, polifenóis, triterpenos e fitoesteróis presentes na espécie. Recentemente também foi reportado o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das flores de *K. pinnata*, das frações flavonoídicas enriquecidas, além da substância majoritária quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo (QAR), isolado das flores desta espécie. A atividade anti-inflamatória foi demonstrada pela diminuição da migração de leucócitos totais para cavidade pleural de camundongos. Além disso, os autores observaram uma redução da concentração de TNF- α no exsudato pleural, em animais pré-tratados com o extrato aquoso e com QAR, sugerindo que a atividade anti-inflamatória seja reflexo, pelo menos parcialmente, da inibição desta citocina (FERREIRA et al., 2014). Em nosso estudo

não foi observada diminuição de citocinas pró-inflamatórias quando células de neutrófilos humanos foram submetidas ao tratamento com QAR.

De acordo com os resultados apresentados acima, pode-se inferir um potencial anti-inflamatório para o extrato bruto de *K. pinnata*. Esta indicação de atividade anti-inflamatória pode estar relacionada ao provável efeito sinérgico das diversas substâncias bioativas presentes no extrato bruto de *K. pinnata*, pois quando o QAR foi testado esta ação biológica foi perdida. O efeito sinérgico pode ser resultado de diversos fatores como: ação em diferentes alvos terapêuticos, alteração benéfica da biodisponibilidade de um ou vários compostos presentes no extrato vegetal e, por último, aumento da eficácia de compostos devido à presença de agentes que antagonizam mecanismos de resistência (DAVID et al., 2015). Além disso, visto que o extrato bruto de *K. pinnata* diminui TNF- α é possível sugerir que este extrato possa contribuir para que não ocorra a reincidência da úlcera gástrica. Isto porque esta citocina, bem como a IL-1 β , quando administrada sistemicamente em ratos ocasionou reincidência da lesão em úlceras macroscopicamente cicatrizadas (KANGWAN et al., 2014).

Por fim, a análise dos resultados confirma que *K. pinnata* possui uma ação terapêutica no combate de úlceras gástricas, além do potencial anti-inflamatório, e que os flavonoides presentes na espécie podem estar relacionados com as referidas atividades farmacológicas.

Conclusão

7 Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A partir da análise de citotoxicidade, *in vitro*, do extrato bruto foi possível estimar um valor de DL₅₀ (1341,46 mg/kg), no entanto, é aconselhável a complementação com ensaio *in vivo*;
- A fração acetato de etila de *K. pinnata* apresentou alta porcentagem de viabilidade celular e conseqüentemente o valor de IC₅₀ não foi obtido nas concentrações avaliadas. Não foram testadas concentrações maiores da fração acetato de etila, pois a amostra apresentou problemas de solubilidade no solvente (DMSO 0,5%);
- O extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata* não possuem fototoxicidade;
- A contagem microbiana para bactérias aeróbias/mesófilas, para bolores e leveduras da droga vegetal, folhas de *K.pinnata* está dentro das recomendações estabelecidas pela OMS;
- A análise para endotoxinas mostrou valores acima do preconizado pela FDA (que estabelece valores para soluções endovenosas), tanto para o extrato bruto quanto para a fração acetato de etila de *K. pinnata*;
- Verificou-se na quantificação do extrato bruto bioativo de *K. pinnata* que a substância majoritária quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo está presente em $9,64 \pm 2,3$ g/100g de extrato bruto, o que corresponde a 0,11% na planta fresca. A quantificação de um marcador é uma etapa importante na padronização do extrato;
- A partir da análise fitoquímica foram identificadas 6 substâncias no extrato bruto de *K. pinnata* e 8 substâncias na fração acetato de etila de *K. pinnata*. Duas substâncias, mearnsetina-3-O-pentosilramnopiranosídeo (**2**) e quercetina 3-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (**4**) foram identificadas pela primeira vez na espécie. Todas as substâncias identificadas na espécie são pertencentes à classe dos flavonoides;
- O extrato bruto e fração acetato de etila das folhas de *K. pinnata* exercem uma ação protetora na mucosa gástrica, verificado no processo de indução por etanol acidificado;
- Há o envolvimento da via COX e dos grupamentos sulfidríla na ação gastroprotetora do extrato bruto de *K. pinnata*. Também foi observada a participação efetiva da via

COX e do óxido nítrico (NO) na gastroproteção da fração acetato de etila de *K. pinnata*;

- O processo de cicatrização de úlceras subagudas, induzidas por ácido acético, foi facilitado pela administração do extrato bruto de *K. pinnata*;
- A melhora da cicatrização do extrato bruto de *K.pinnata* está relacionada com a atividade da enzima SOD e possivelmente com o sequestro de radical peroxil. Além disso, não foi observada a participação do VEGF no processo de cicatrização de úlceras gástricas promovida pelo extrato bruto de *K. pinnata*;
- Na atividade antioxidante *in vitro*, observou que a fração acetato de etila de *K. pinnata* possui uma maior capacidade de sequestro de radicais peroxil quando comparado com o extrato bruto ;
- O extrato bruto de *K. pinnata* não possui ação contra *H. pylori* nas concentrações testadas;
- O extrato bruto de *K. pinnata* demonstrou um potencial anti-inflamatório evidenciado pela diminuição dos níveis de TNF- α e L-selectina em neutrófilos estimulados por LPS.

Referências

Referências

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.75-77.
- ABDELWAHAB, S.I.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; SUKARI, M.A.; ABDUL, A.B.; TAHA, M.M.E.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K.H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. And its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property *in vivo*: Possible involvement of indirect antioxidant action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 963-970, 2011.
- ADESANWO, J.K.; RAJI, Y.; OLALEYE, S.B.; ONASANWO, S.A. Antiulcer activity of methanolic extract of *Bryophyllum pinnatum* in rats. **Journal of Biological Sciences**, v.7, n.2, p.409-412, 2007.
- AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M.; AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K.R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v.83, n.5, p.853-858, 2012.
- ALMEIDA, A.P.; SILVA, S.A.G.; SOUZA, M.L.M.; LIMA, L.M.T.R.; ROSSI-BERGMANN, B.; GONÇALVES DE MORAES, V.L.; COSTA, S.S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent lymphocyte suppressive activity. **Planta Medica**, v.66, n.2, p.134-137, 2000.
- ARAÚJO, M.B.; BORINI, P.; GUIMARÃES, R.C. Etiopathogenesis of peptic ulcer: back to the past? **Arquivos de Gastroenterologia**, v.51, n.2, p.155-161, 2014.
- ATALAY, F.; ODABASOGLU, F.; HALICI, M.; CADIRCI, M.; AYDIN, O.; HALICI, Z.; ÇAKIR, A. N-acetyl cysteine has both gastro-protective and anti-inflammatory effects in experimental rat models: its gastro-protective effect is related to its *in vivo* and *in vitro* antioxidant properties. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.117, n.2, p.308-318, 2016.
- AVILA, J.R.; De La LASTRA, C.; MARTÍN, M.J.; MOTILVA, M.V.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**, v. 45, n. 2, p. 83-88, 1996.
- AWAAD, A.S.; EL-MELIGY, R.M.; SOLIMAN, G.A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.17, n.1, p.101-124, 2013.
- BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M.; GOLINKO, M.S.; EHRlich, H.P. BREM, H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Journal of Surgical Research**, v.153, p.347-358, 2009.
- BARK, L.M.; HEO, E.P.; HAN, K.D.; KIM, M.B.; LEE, S.T.; GIL, E.M.; KIM, T.H. Evaluation of the phototoxic potential of plants used in oriental medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.11-18, 2010.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2.ed. New York: London: Grune & Stratton, 1975. p. 89-90.

BHATIA, V.; TANDON, R.K. Stress and the gastrointestinal tract. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, p. 332-339, 2005.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v.94, n.2, p.329-354, 2014.

BI, W.P.; MAN, H.B.; MAN, M.Q. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: a review. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.45, p.1720-1728, 2014.

BISWAS, S.K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; KARMAKAR, U.K.; SHILL, M.C. Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* Linn. (Family: Crassulaceae) leaves and stems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, n.10, p.2605-2609, 2011.

BOLTIN, R.; NIV, Y. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. **Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology**, v.28, n.6, p.981-994, 2014.

BONAMIM, F.; MORAES, T.M.; SANTOS, R.C.; KUSHIMA, H.; FARIA, F.M.; SILVA, A.M.; JUNIOR, I.V.; NOGUEIRA, L.; BAUAB, T.M.; SOUZA BRITO, A.R.M.; ROCHA, R.M.L.; HIRUMA-LIMA, C.A. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-Biological Interactions**, v.212, p.11-19, 2014.

BOPDA, O.S.M.; LONGO, F.; BELLA, T.N.; EDZAH, P.M.O.; TAÏWE, G.S.; BILANDA, D.C.; TOM, E.N.L.; KAMTCHOUING, P.; DIMO, T. Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.153, n.2, p.400-407, 2014.

BORGES L.S; BORTOLON, J.R.; SANTOS, V.C.; DE MOURA, N.R.; DERMARGOS A.; CURY-BOAVENTURA, M.F.; GORJÃO, R.; PITHON-CURI, T.C.; HATANAKA, E. Chronic inflammation and neutrophil activation as possible causes of joint diseases in ballet dancers. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1-7, 2014. doi: 10.1155/2014/846021

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas medicinais de interesse ao SUS**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 22 jun. 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, n.5, p.33-55, 2005.

BUCCIARELLI, A.; MINETTI, A.; MILCZAKOWSKY, C.; SKLIAR, M. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.9, p.1025-1030, 2010.

BUGNO, A.; BUZZO, A.A.; NAKAMURA, C.T.; PEREIRA, T.C.; MATOS, D.; PINTO, T.J.A. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, p.491-497, 2005.

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, n.3, p.303-311, 1993.

CARVALHO, A.C.B.; BRANCO, P.F.; FERNANDES, L.A.; MARQUES, R.F.O.; CUNHA, S.C.; PERFEITO, J.P.S. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, n. 1, 2012.

CHATURVEDI, O.S.; JOSHI, A.; DUBEY, B.K. Pharmacognostical, phytochemical evaluation and anti-inflammatory activity of stem of *Kalanchoe pinnata* Pers. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, n.4, p.1133-1140, 2012.

CHOI, S.J.; TAI, B.H.; CUONG, N.M.; KIM, Y.H.; JANG, H.D. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*). **Food Science and Biotechnology**, v.21, n.2, p.587-595, 2012.

CRUZ, E.A.; REUTER, S.; MARTIN, H.; DEHZAD, N.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B.; BUHL, R.; STASSEN, M.; TAUBE, C. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cells activation and prevents allergic airway disease. **Phytomedicine**, v.19, n.2, p.115-121, 2012.

CUNHA, A.P., coord. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p.238-288.

DAI, P.; ZHU, L. LUO, F; LU, L.; LI, Q.; WANG, L.; WANG, Y.; WANG, X.; HU, M.; LIU, Z. Triple recycling process impact systemic and local bioavailability of orally administered flavonoids. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 3, p. 723-736, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.L.; DIAS, D.A. The pharmaceutical industry and natural products: history status and new trend. **Phytochemistry Reviews**, v.14, n.2, p.299-315, 2015.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J.P.E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18, n.14, p.1818-1892, 2013.

DOS REIS LÍVERO, F.A.; DA SILVA, L.M.; FERREIRA, D.M.; GALUPPO, L.F.; BORATO, D.G.; PRANDO T.B.; LOURENÇO, E.L.; STRAPASSON, R.L.; STEFANELLO, M.É.; WERNER, M.F.; ACCO, A. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n.9, p. 985-998, 2016.

DUTRA, R.C.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p.4-29, 2016.

EL ABDELLAOUI, S.; DESTANDAU, E.; TORIBIO, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; CANCELLIERI, P.; LANDEMARRE, L. Bioactive molecules in

Kalanchoe pinnata leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, n.3, p.1329–1338, 2010.

ERLUND, I.; KOSONEN, T.; ALFTHAN, G.; MÄENPÄÄ, J.; PERTTUNEM, K.; KENRAALI, J.; PARANTAINEN, J.; ARO, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.56, n.8, p.545-553, 2000.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.829. (Código farmacêutico brasileiro, 1 e 2).

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. p.236-251.

FARZAEI, M.H.; ABDOLLAHI, M.; RAHIMI, R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.21, p.6499-6517, 2015.

FERNANDES, A.L.; FARIA, G.A.; OLIVEIRA, K.; MORAIS, M.A.; SANTOS, N.C.; LISBOA, N.F.; CARVALHO, T.S.; COUTINHO, J.V. Estudo microbiológico de drogas vegetais produzidas na unidade de saúde de um hospital em Porto Velho, Rondônia. **Saber Científico**, v.2, n.1, p.81-91, 2009.

FERREIRA, R.T.; MALVAR, D.C.; VANDERLINDE, F.A.; COUTINHO, M.A.S.; COSTA, S.S.; COSTA, E.A.; FLORENTINO, I.F. Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity of main flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2014, art.429256, p.1-8, 2014.

FÜRER, K.; RAITH, M.; BRENNEISEN, R.; MENNET, M.; SIMÕES-WÜST, A.P.; VON MANDACH, U.; HAMBURGUER, M.; POTTERAT, O. Two new flavonol glycosides and a metabolite profile of *Bryophyllum pinnatum*, a phytotherapeutic used in obstetrics and gynaecology. **Planta Medica**, v.79, n.16, p.1565-1571, 2013.

FÜRER, K.; SIMÕES-WÜST, A.P.; VON MANDACH, U.; HAMBURGUER, M.; POTTERAT, O. *Bryophyllum pinnatum* and related species used in anthroposophic medicine: constituents, pharmacological activities, and clinical efficacy. **Planta Medica**, v.82, n.11/12, p.930-941, 2016.

GAIND, K.N.; GUPTA, R.L. Flavonoid glycosides from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v.20, n.4, p.368-373, 1971.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB Journal**, v.6, n.3, p.825-831, 1992.

GOLDSTEIN, J.L.; CRYER, B. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. **Drug, Healthcare and Patient Safety**, v. 7, p. 31-41, 2015.

GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M.D.; ZARZUELA, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Effects of flavonoids and

other Polyphenols on inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, n.4, p.331-362, 2011.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. p.869-882.

GREER, M.R.J.; CATES, R. G.; JOHNSON, F.B.; LAMNAOUER, D.; OHAI, L. Activity of acetone and methanol extracts from thirty-one medicinal plant species against herpes. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1031-1037, 2010.

GUPTA, R.; LOHANI, M.; ARORA, S.; REHNI, A.K.; CHAUHAN, R. Anti-inflammatory activity of extracts and isolated alkaloidal fraction from leaves of *Bryophyllum pinnatum*. **PharmacologyOnline**, v.2, p.873-886, 2009.

HAENISCH, B.; VON HOLT, K.; WIESE, B.; PROKEIN, J.; LANGE, C.; ERNST, A.; BRETTSCHEIDER, C.; KÖNIG, H.H.; WERLE, J.; WEYERER, S.; LUPPA, M.; RIEDEL-HELLER, S.G.; FUCHS, A.; PENTZEK, M.; WEEG, D.; BICKEL, H.; BROICH, K.; JESSEN, F.; MAIER, W.; SCHERER, M. Risk of dementia in elderly patients with the use of proton pump inhibitors. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v.265, p.419-428, 2015.

HAMM, J.; SULLIVAN, K.; CLIPPINGER, A.J.; STRICKLAND, J.; BELL, S.; BHHATARI, B.; BLAAUBOER, B.; CASEY, W.; DORMAN, D.; FORSBY, A.; GARCIA-REYERO, G.; GEHEN, S.; GRAEPEL, R.; HOTCHKISS, J.; LOWIT, A.; MATHESON, J.; REAVES, E.; SCARANO, L.; SPRANKLE, C.; TUNKEL, J.; WILSON, D.; XIA, M.; ZHU, H.; ALLEN, D. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 245-259, 2017 [Review].

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1170-1179, 2008.

ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. **ICCVAM test method evaluation report: *in vitro* cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. Washington: Public Health Service, Department of Health and Human Services, 2006. (NIH Publication No: 07-4519). Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/at-tmer-complete.pdf. Acesso em: 15/08/2016.

ICHIKAWA, M.; OGURA, M.; IJIMA, T. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61,118,396. *apud* **Chemical Abstract**, v.105, abstr.178423q, 1986.

IVETIC, A.; RIDLEY, A.J. The telling tail of L-selectin. **Biochemical Society Transactions**, v.32, pt.6, p.1118-1121, 2004.

JOU, S.J.; CHEN, C.H.; GUH, J.H.; LEE, C.N.; LEE, S.S. Flavonol glycosides and cytotoxic triterpenoids from *Alphitonia philippinensis*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.51, n.4, p.827-834, 2004.

JÚNIOR, F.E.B.; OLIVEIRA, D.R.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; KAMDEM, J.P.; MACEDO, G.E.; SILVA, G.F.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; KERNTOPF, M.R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.153, n.2, p.469-477, 2014.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz: phytochemical and pharmacological profile: a review. **Pharmacognosy Reviews**, v.3, n.6, p.364-374, 2009.

KANGWAN, N.; PARK, J.M.; KIM, E.H.; HAHM, B. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v.5, n.1, p.40-47, 2014.

KARAKOYUN, B.; YÜKSEL, M.; ERCAN, F.; ERZİK, C.; YEGEN, B.Ç. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. **Inflammation**, v.32, n.1, p.37-46, 2009.

KESZTHELYI, D.; JANSEN, S.V.; SCHOUTEN, G.A.; KORT, S.; SCHOLTES, B.; ENGELS, L.G.J.B.; MASCLEE, A.A.M. Proton pump inhibitor use is associated with an increased risk for microscopic colitis: a case-control study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.32, n.9, p.1124-1128, 2010.

KLEIN-JÚNIOR, L.C.; SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; SILVEIRA, A.C.O.; ROCHA, J.A.R.; BEBER, A.P.; WAGNER, T.M.; BRESOLIN, T.M.B.; BELLA-CRUZ, A.; CECHINEL-FILHO, V.; ANDRADE, S.F. Role of gastric mucus secretion, oxinitergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.65, p.767-776, 2013.

KOBAYASHI, S.; NAKAJIMA, N.; ITO, Y.; MORIYAMA, M. Effects of lansoprazole on the expression of VEGF and cellular proliferation in a rat model of acetic-induced gastric ulcer. **Journal of Gastroenterology**, v.45, n.8, p.846-858, 2010.

KSIADZYNA, D.; SZELAG, A.; PARADOWSKI, L. Overuse of proton pump inhibitors. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v.125, n.4, p.289-298, 2015.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n.11, p.4651-4655, 1991.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N., eds. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. 816p.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N., eds. **Robbins, patologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.68-84, p.647-651.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J., eds. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas da doença**. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.62.

KWIECIEN, S.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; SLIWOWSKI, R.; PAJDO, R.; BRZOZOWSKI, B.; MACH, T.; WOJCIK, D.; BRZOZOESKI, T. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions

and mechanism of protection against oxidative stress – induced gastric injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 65, n. 5, p. 613-622, 2014.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, v.135, n.1, p.41-60, 2008.

LAM, J.R.; SCHNEIDER, J.L.; ZHAO, W.; CORLEY, D.A. Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B₁₂ deficiency. *JAMA, The Journal of the American Medical Association*, v.310, n.22, p.2435-2442, 2013.

LI, L.F.; CHAN, R.L.Y.; LU, L.; SHEN, J.; ZHANG, L.; WU, W.K.K.; WANG, L.; HU, T.; LI, M.X.; CHO, C.H. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: The causal relationship and underlying molecular mechanisms (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, v. 34, p. 372-380, 2014.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, v. 674, p. 137-147, 2009.

LIN, K.J.; GARCÍA RODRÍGUES, L.A.; HERNÁNDEZ-DIAZ, S. Systematic review of peptic ulcer disease incidence rates: do studies without validation provide reliable estimates? *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, v.20, n.7, p.718–728, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. p.223-224.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOSOWSKI, T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. *Molecules*, v.20, n.5, p.9099-9123, 2015. [Review].

MAHMOUD, I.I.; MARZOUK, M.S.A.; MOHARRAM, F.A.; EL-GINDI, M.R.; HASSAN, A.M.K. Acylated flavonols glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry* v. 58, n.8, p.1239-1244, 2001.

MAJAZ, Q.; KHURSHID, M.; NAZIM, S.; RAHIL, K.; SIRAJ, S.; Evaluation of antioxidant activity of *Kalanchoe pinnata*. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, v.2, n.6, p.1772-1775, 2011.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F.K.L.; McCOLL, K.E.L. Peptic ulcer disease. *Lancet*, v.374, n.9699, p.1449-1461, 2009.

MALNICK, S.D.H.; MELZER, E.; ATTALI, M.; DUEK, G.; YAHAV, J. Helicobacter pylori: friend or foe? *World Journal of Gastroenterology*, v.20, n.27, p.8979-8985, 2014.

MARCONDES, N.S.P.; ESMERINO, L.A. Qualidade microbiológica de plantas medicinais cultivadas em hortas domésticas. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.16, n.2, p.133-138, 2010.

MARRIAGE, P.B.; WILSON, D.G. Analysis of the organic acids of *Bryophyllum calycinum*. *Canadian Journal of Biochemistry*, v.49, n.3, p.282-296, 1971.

MARSOLLA, P. **Estresse e lesões gástricas**. 2009. Disponível em: <http://www.webartigos.com/artigos/estresse-e-lesoes-gastricas/29949/>. Acesso em: 15/07/2015.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotections of escins Ia, Ib, IIa and IIb on ethanol- induced gastric mucosal lesions in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.373, n.1, p.63-70, 1999.

MC CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, n.22, p.6049-6055, 1969.

MEI, X.T.; XU, D.H.; XU, S.K.; ZHENG, Y.P.; XU, S.B. Zinc (II)-curcumin accelerates the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by decreasing oxidative stress and downregulation of matrix metalloproteinase-9. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.448-454, 2013

MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A.N. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v.4, n.1, p.86-104, 2014.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, n.5, p.939-945, 1983.

MÖSSER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v.35, n.8, p.469-475, 2005.

MOTA, K.S.L.; DIAS, G.E.N.; PINTO, M.E.F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v.14, p.979-1012, 2009.

MUZITANO, M.F.; CRUZ, E.A.; ALMEIDA, A.P.; SILVA, S.A.G.; KAISER, C.R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v.72, n.1, p.81-83, 2006a.

MUZITANO, M.F.; TINOCO, L.W.; GUETTE, C.; KAISER, C.R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v.67, n.18, p.2071-2077, 2006b.

MUZITANO, M.F.; FALCÃO, C.A.B.; CRUZ, E.A.; BERGOZI, M.C.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. **Planta Medica**, v.75, n.4, p.307-311, 2009.

MUZITANO, M.F.; BERGONZI, M.C.; DE MELO, G.O.; LAGE, C.L.S.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 132-137, 2011.

NAYAK, B.S.; MARSHALL, J.R.; ISITOR, G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf: a preliminary study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, n.6, p.572-576, 2010.

NEUGHEBAUER, B.I.; NECHIFOR, M.; DOBRESCU, G.; NEGRU, A.; ADOMNICAI, M. Influence of cloprostamol in the experimentally induced ulcer in rats. **Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Lasi**, v.96, suppl., p.10-12, 1992.

NILE, S.H.; KHOBRADE, C.N.; PARK, S.W. Optimized and comparative antioxidant assay and its applications in herbal and synthetic drug analysis as antioxidants. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.12, n.10, p.1007-1014, 2012.

NIU, H.; WANG, Z.; HOU, H.; ZHANG, Z.; LI, B. Protective effect of cod (*Gadus microcephalus*) skin collagen peptides on acetic acid-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Food Science**, v.81, n.7, p.H1807-H1815, 2016.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for testing of chemicals: in vitro e 3T3 NRU phototoxicity test**. 2004. (OECD/OCDE, 432). <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd432-508.pdf>. Acesso em: 10/08/2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. Paris: OECD, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, 129). Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2010\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en). Acesso em: 10/08/2016

OJEWOLE, J.A.O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.13-19, 2005.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic ulcer models: the history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, p.1321-1341, 2005.

OKWU, D.E.; JOSIAH, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.4, p.357-361, 2006.

PAL, S.; NAG CHAUDHURI, A.K. Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, n.1/2, p.97-102, 1991.

PALHARES, R.M.; DRUMMOND, M.G.; BRASIL, B.S.A.F.; COSENZA, G.P.; BRANDÃO, M.G.L.; OLIVEIRA, G. Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **Plos One**, v.10, n.5, p.1-29, 2015.

PAN, J.S.; HE, S.Z.; XU, H.Z.; ZHAN, X.J.; YANG, X.N.; XIAO, H.M.; SHI, H.X.; REN, J.L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 38, p. 5857-5867, 2008.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.250-251.

PEREZ, A.C.; CORREA, M.F.; BORGES, S.R. Anti-ulcer activity from the leaves of *Bryophyllum sp.* **Archives of Veterinary Science**, v.4, n.1, p.111-112, 1999.

PLANT LIST. Quick Name Search: *Kalanchoe pinnata*. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 22 jun. 2017.

PÉREZ-COBAS, A.E.; GOSALBES, M.J.; FRIEDRICHS, A.; KNECHT, H.; ARTACHO, A.; EISMANN, K.; OTTO, W.; ROJO, D.; BARGIELA, R.; VON BERGEN, M.; NEULINGER, S.C.; DÄUMER, C.; HEINSEN, F.A.; LATORRE, A.; BARBAS, C.; SEIFERT, J.; SANTOS, V.M.; OTT, S.J.; FERRER, M.; MOYA, A. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. **Gut**, v.62, n.11, p.1591-1601, 2013.

PETERS, B.; HOLZHÜTTER, H.G. *In vitro* phototoxicity testing: development and validation of a new concentration response analysis software and biostatistical analyses related to the use of various prediction models. **Atla**, v. 30, p. 415-432, 2002.

PHAM-HUY, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v.4, n.2, p.89-96, 2008.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PRIYA, G.; PARMINDER, N.; JASPREET, S. Oxidative stress induced ulcer protected by natural antioxidants: a review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n.5, p. 76-81, 2012.

PUCHER, G.W. The organic acids of the leaves of *Bryophyllum calycinum*. **Journal of Biological Chemistry**, v.145, p.511-523, 1942.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang and Dale farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Churchill Livingstone, 2012. 778p.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. **The world medicines situations 2011**: tradicional medicines: global situations, issues and challenges. 3.ed. Geneva: World Health Organization, 2011. 12p.

ROTH, M.; ARAYA, J.J.; TIMMERMANN, B.N.; HAGENBUCH, B. Isolation of modulators of the liver-specific organic anion-transporting polypeptides (OATPs) 1B1 and 1B3 from *Rollinia emarginata* Schlecht (Annonaceae). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.339, n.2, p.624-632, 2011.

RUBIÓ, L.; MOTILVA, M.J.; ROMERO, M.P. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 943-953, 2013.

SANTOS, R.L.; NOBRE, M.S.C.; GUIMARÃES, G.P.; DANTAS, T.B.; VIEIRA, V.M.; FELISMINO, D.C.; DANTAS, I.C. Contaminação fúngica de plantas medicinais utilizadas

em chá. **Revista Brasileira de Farmacognosia Básica e Aplicada**, v.34, n.2, p.289-293, 2013.

SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, B.S.; SULTANA, N. Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Bryophyllum pinnatum*. **Phytochemistry**, v.28, n.9, p.2433-2438, 1989.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, n.2, p.287-290, 1979.

SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.60, n.3, p.201-210, 1995.

SILVA, L.P.; ANGELIS, C.D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MININEL, F.J.; SANTOS, L.C.; DELELLA, F.K.; FELISBINO, S.L.; VIELGAS, W.; ROCHA, L.R.M.; RAMOS, M.A.S.; BAUAB, T.M.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Terminalia catappa* L.: a medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.159, p.285-295, 2015.

SILVA, M.I.G.; MOURA, B.A., AQUINO NETO, M.R.; TOMÉ, A.R.; ROCHA, N.F.M.; CARVALHO, A.M.R.; MACÊDO, D.S.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, D.P.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.380, n.3, p.233-245, 2009.

SIMÕES-WÜST, A.P.; GRÃOS, M.; DUARTE, C.B.; BRENNEISEN, R.; HAMBURGER, M.; MENNET, M.; RAMOS, M.H.; SCHNELLE, M.; WACHTER, R.; WOREL, A.M.; VON MANDACH, U. Juice of *Bryophyllum pinnatum* (LAM.) inhibits oxytocin-induced increase of the intracellular calcium concentration in human myometrial cells. **Phytomedicine**, v.17, n.12, p.980-986, 2010.

SLOWING, K.; SÖLLHUBER, M.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Flavonoids glycosides from *Eugenia jambos*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 1 p. 255-258, 1994

SOBREIRA, F.C. **Avaliação da atividade antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Crassulaceae)**. São Paulo, 2013. 106p. Dissertação para obtenção ao grau de mestre - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SOBREIRA, F.; HERNANDES, L.S.; VETORE-NETO, A.; DIAZ, I.E.C.; SANTANA, F.C.; MANCINI-FILHO, J.; BACCHI, E.M. Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and ethyl acetate fraction from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.53, n.1, e16027, p.1-11, 2017.

SONAGE, K.; LIN, K.J.; TSENG, M.T.; WEY, S.P.; SU, F.Y.; CHUANG, E.Y.; HSU, C.W.; CHEN, C.T.; SUNG, H.W. Effects of chitosan-nanoparticle-mediated tight junction opening on the oral absorption of endotoxins. **Biomaterials**, v.32, p.8712-8721, 2011.

SOUSA, P.J.C.; ROCHA, J.C.S.; PESSOA, A.M.; ALVES, L.A.D.; CARVALHO, J.C.T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophyllum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.60-64, 2005.

SOUSA, T.P.; LIONZO, M.I.; PETROVICK, P.R. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.94-98, 2006.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* x *tubiflora*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.65, n.4, p.947-949, 2001.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; MOGAMI, S.; HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 50, n.1, p. 35-39, 2012.

SZABO, S.; TRIER, J.S.; FRANKEL, P.W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v.214, n.4517, p.200-202, 1981.

SZABO, S. "Gastric cytoprotection" is still relevant. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, n. 4, p. 124-132, 2014.

SZLACHCIC, A.; KRZYSIEK-MACZKA, G.; PADJO, R.; TARGOSZ, A.; MAGIEROWSKI, M.; JASNOS, K.; DROZDOWICZ, D.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. The Impact of asymmetric dimethylarginine (ADAMA), the endogenous Nitric Oxide (NO) synthase inhibitor, to the pathogenesis of gastric mucosal damage. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, n.1, p.90-97, 2013.

TAKAGI, T.; NAITO, Y.; OKADA, H.; ISHII, T.; MIZUSHIMA, K.; AKAGIRI, S.; ADACHI, S.; HANDA, O.; KOKURA, S.; ICHIKAWA, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; MATSUI, H.; YOSHIKAWA, T. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, mediates anti-inflammatory effect in gastric mucosal cells through the induction of heme oxygenase-1 via activation of NF-E2-related factor 2 and oxidation of kelch-like ECH-associating protein 1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.331, n.1, p.255-264 2009.

TAKEUCHI, K.; KITA, K.; HAYASHI, S.; AIHARA, E. Regulatory mechanism of duodenal bicarbonate secretion: roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide. **Pharmacology & Therapeutics**, v.130, n.1, p.59-70, 2011.

TAKEUCHI, H.; TRANG, V.T.; MORIMOTO, N.; NISHIDA, Y.; MATSUMURA, Y.; SUGIURA, T. Natural products and food components with anti-*Helicobacter pylori* activities. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.27, p.8971-8978 2014.

TANIGAWA, T.; WATANABE, T.; OTANI, K.; NADATANI, Y.; MACHIDA, H.; OKAZAKI, H.; YAMAGAMI, H.; WATANABE, K.; TOMINAGA, K.; FUJIWARA, Y.; OSHITANI, N.; HIGUCHI, K.; ARAKAWA, T. Leptin promotes gastric ulcer healing via upregulation of vascular endothelial growth factor. **Digestion**, v.81, n.2, p.86-95, 2010.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, suppl.1, p.S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A.S.; Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing: state of the art 2010. **Gastroenterologia Polska**, v.17, n.3, p.171-179, 2010.

TARNAWSKI, A.S.; AHLUWALIA, A.; Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularisation during healing of gastric and esophageal ulcers. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.16-27, 2012.

TARNAWSKI, A.S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: Cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, p.126-132, 2013.

TARNAWSKI, A.S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Angiogenesis in gastric mucosa: An important component of gastric erosion and ulcer healing and its impairment in aging. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.29, n.4, p.112-123, 2014.

TATSIMO, S.J.N.; TAMOKOU, J.D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J.R.; TANE, P. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BMC Research Notes**, v.5 p.158, 2012.

TLEYJEH, I.M.; ABDULHAK, A.B.; RIAZ, M.; GARBATI, M.A.; AL-TANNIR, M.; ALASMARI, F.A.; ALGHAMDI, M.; KHAN, A.R.; ERWIN, P.J.; SUTTON, A.J.; BADDOUR, L.M. The association between histamine 2 receptor antagonist use and *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. **Plos One**, v.8, n.3, art.e56498, p.1-13, 2013.

TROPICOS. Quick Name Search: *Kalanchoe pinnata*. Disponível em: <http://www.tropicos.org/>. Acesso em: 22 jun. 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.1, p.44-48, 2007.

VERA-ARZAVE, C.; ANTONIO, L.C.; ARRIETA, J.; CRUZ-HERNÁNDEZ, G.; VELÁZQUEZ-MÉNDEZ A.M.; REYES-RAMÍREZ, A.; SÁNCHEZ-MENDOZA, M.E. Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol- induced gastric lesions in Wistar rats: role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. **Molecules**, v.17, n.8, p.8917-8927, 2012.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, v.88, n.4, p.1547-1565, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. v.1. Geneva: WHO, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. Geneva: WHO, 2007.

YADAV, N.P.; DIXIT, V.K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, n.2/3, p.197-202, 2003.

YAMAGISHI, T.; HARUNA, M.; YAN, X.Z.; CHANG, J.J.; LEE, K.H. Antitumor agents, 110: bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. **Journal of Natural Products**, v.52, n.5, 1071-1079, 1989.

YU, L.Y.; SUN, L.N.; ZHANG, X.H.; LI, Y.Q.; YU, L.; YUAN, Z.Q.Y; MENG, L.; ZHANG, H.W.; WANG, Y.Q. A review of the novel application and potential adverse effects of proton pump inhibitors. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 5, p. 1070-1086, p.1070-1086, 2017.

ZAKARIA, Z.A.; BALAN, T.; MAMAT, S.S.; MOHTARRUDIN, N.; TEH, L.K.; SALLEH, M.Z. Mechanisms of gastroprotection of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.135, p.1-15, 2015.

Apêndice

Apêndice

Figura 1- Cromatograma de íons totais em modo positivo (HPLC-(+)-ESI-MS²) do extrato bruto (A) e fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

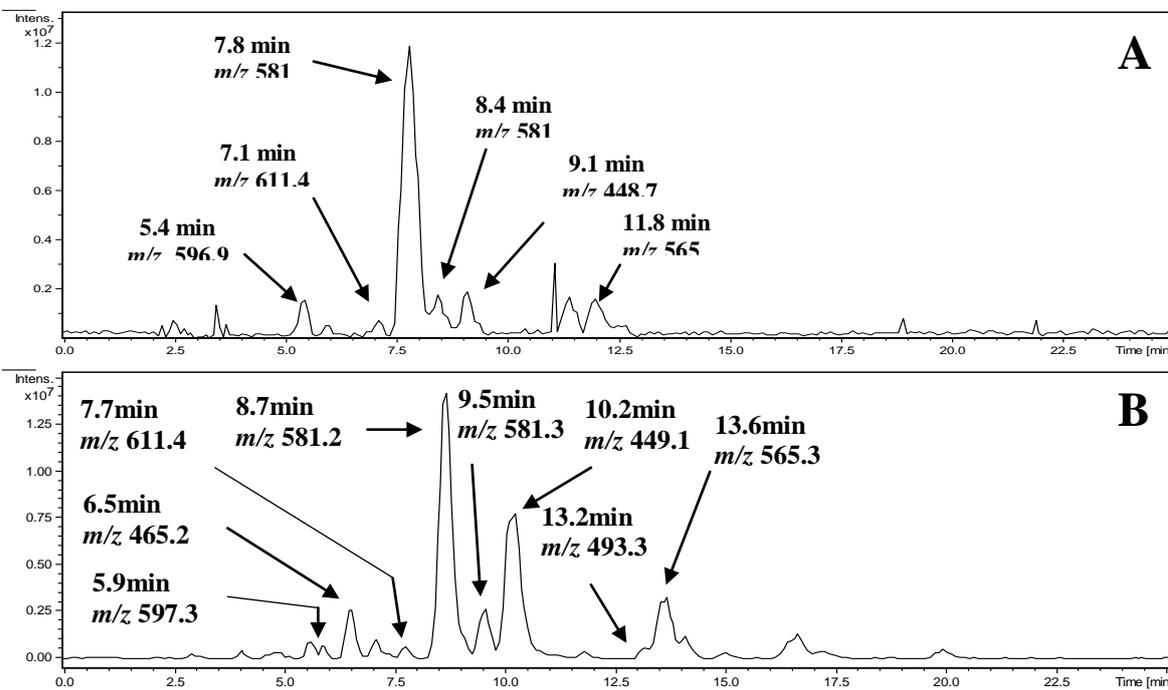


Figura 2- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 5,4 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e referente ao tempo de retenção 5,8-6,1 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

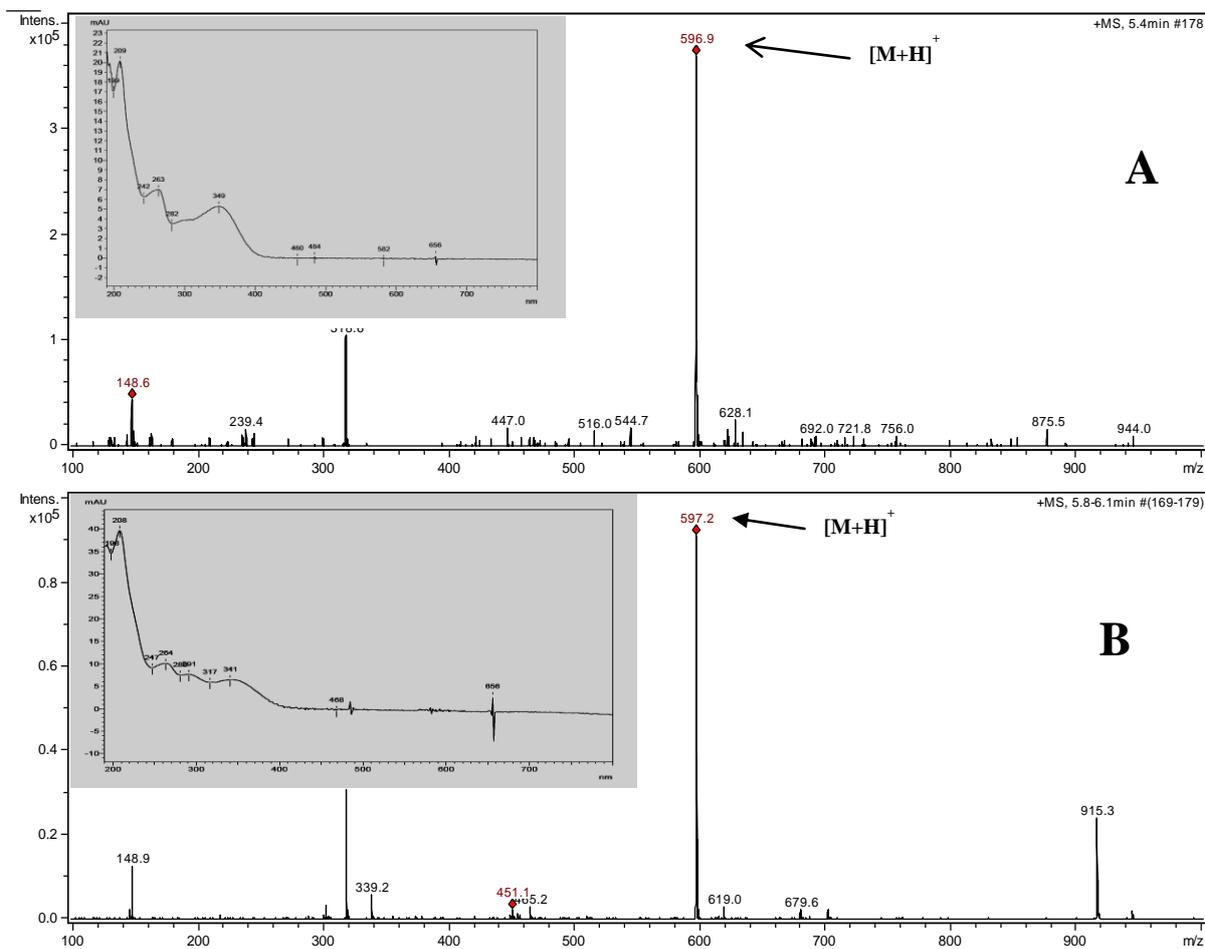


Figura 3- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (*m/z* 597.2), referente ao tempo de retenção 5,4 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e (*m/z* 597.3) referente ao tempo de retenção 5,9 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à substância miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (1) e seus fragmentos, identificada no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.

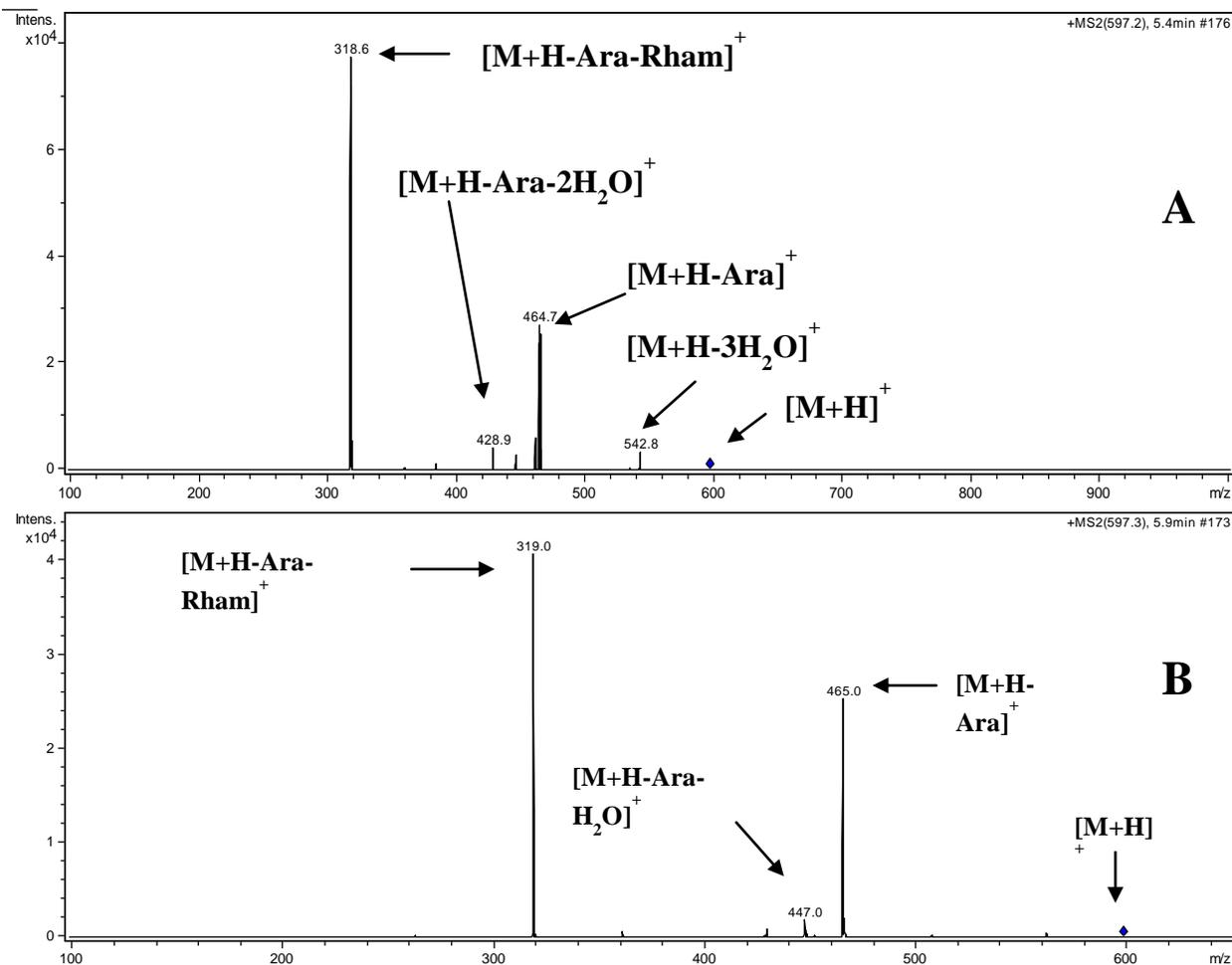


Figura 4- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 6,4-6,7 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (**B**) das folhas de *K. pinnata*.

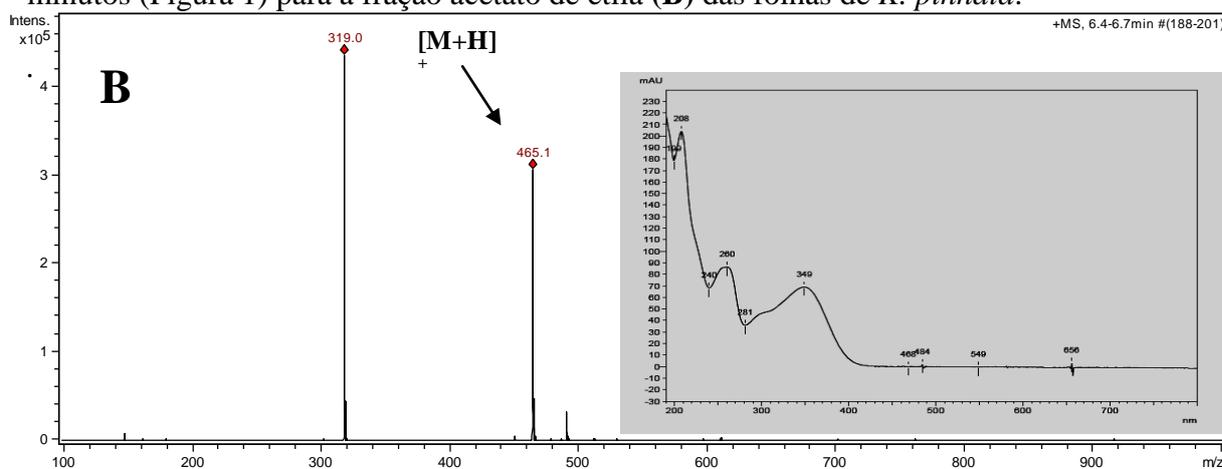


Figura 5- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (m/z 465.2), referente ao tempo de retenção 6,5 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (**B**) correspondente à miricetina-3-O-rhamnopiranosídeo (**1.1**) e seus fragmentos, identificada na fração acetato de etila de *K. pinnata*.

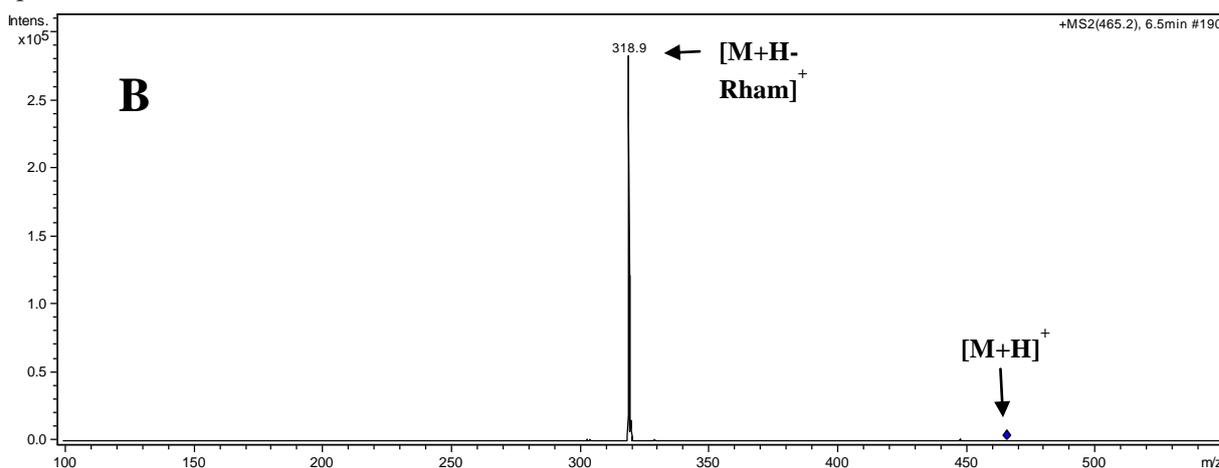


Figura 6- Espectro de RMN ¹H da substância mearnsetina-3-O-pentossilramnopiranosídeo (**2**) (ppm, 500MHz, (CD₃)₂SO).

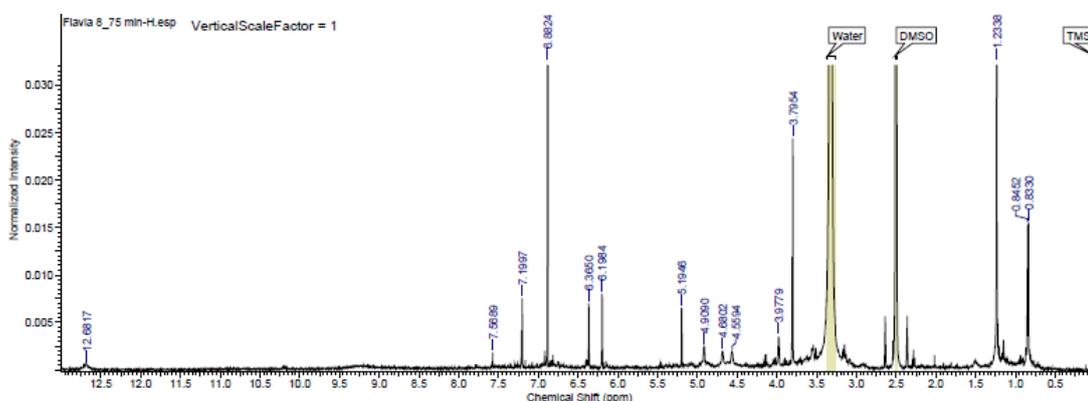


Figura 7- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 7,1 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e referente ao tempo de retenção 7,7 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

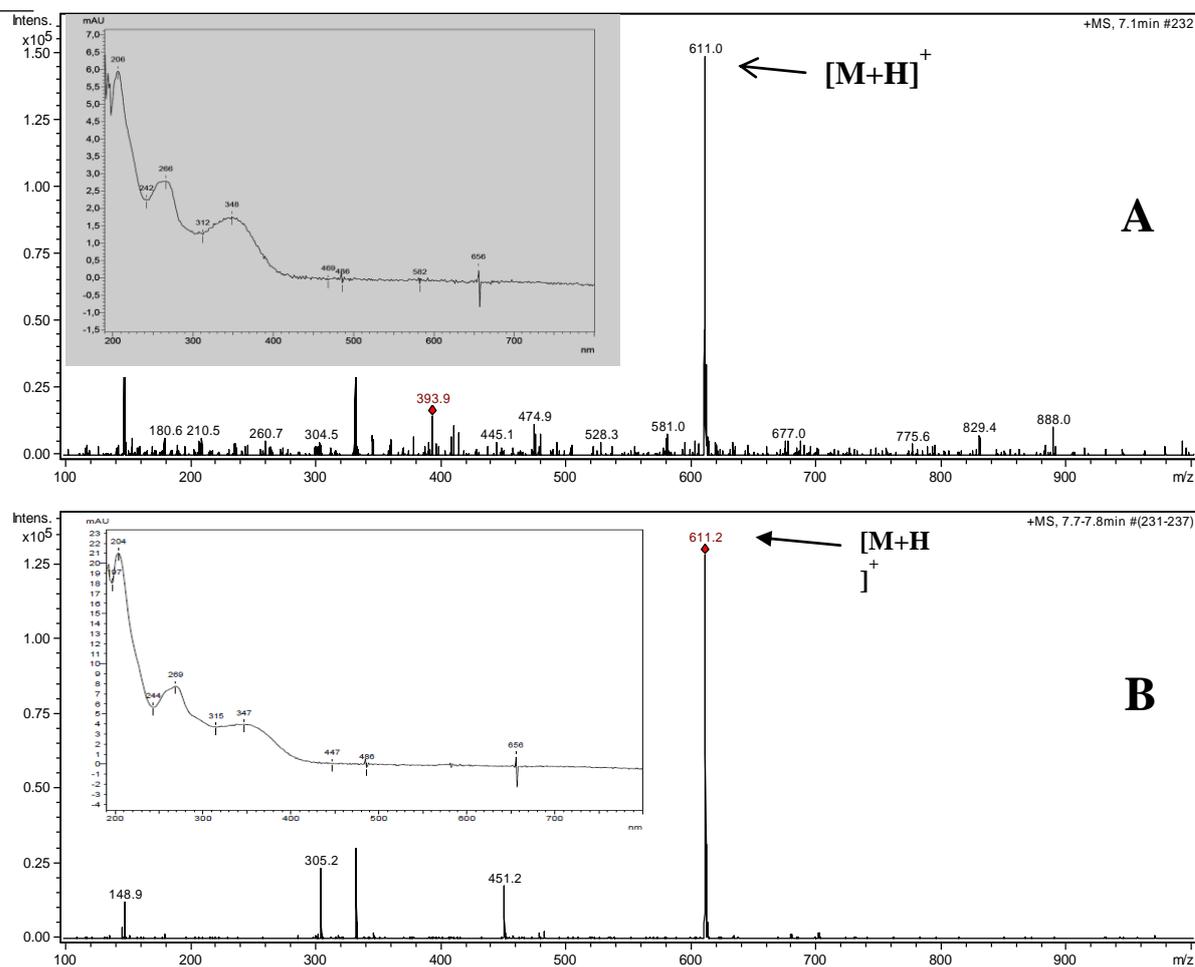


Figura 8- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (m/z 611.4), referente ao tempo de retenção 7,1 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e (m/z 611.4) referente ao tempo de retenção 7,7 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à substância mearnsetina-3-O-pentasilramnopiranosideo (2) e seus fragmentos, identificada no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.

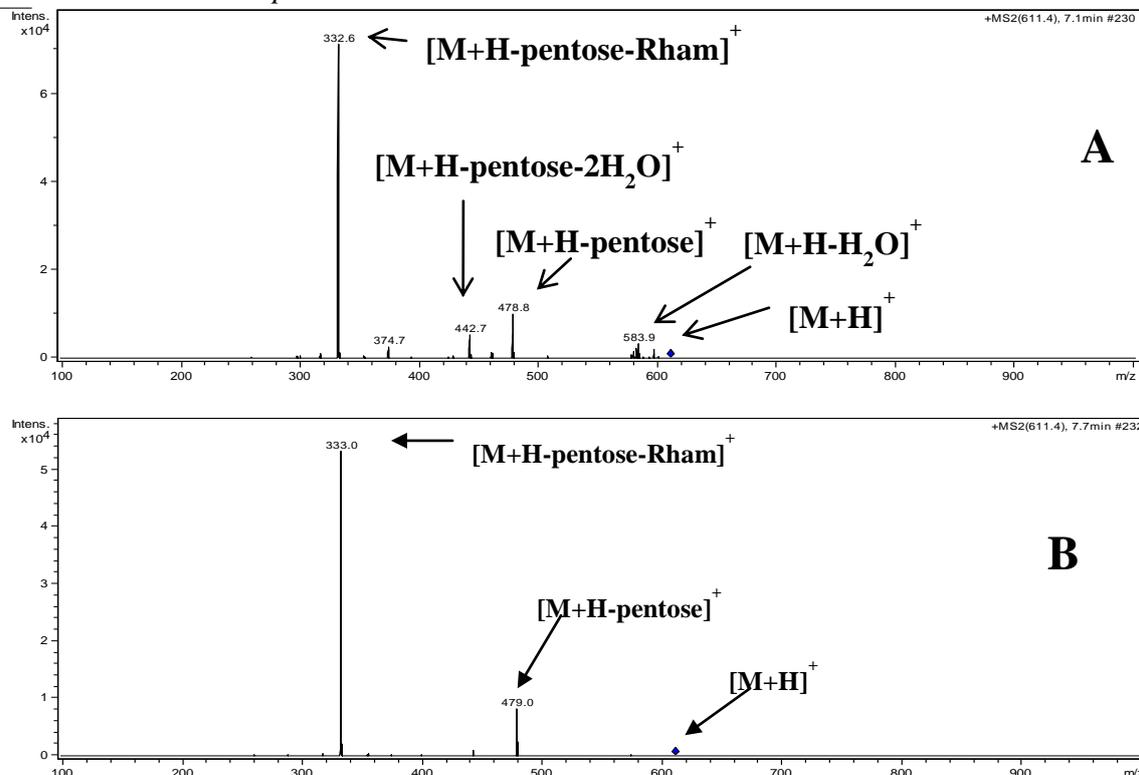


Figura 9- Espectro de RMN ¹H da substância quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosideo (3) (ppm, 300MHz, CD₃OD)- Dados proveniente da dissertação de mestrado.

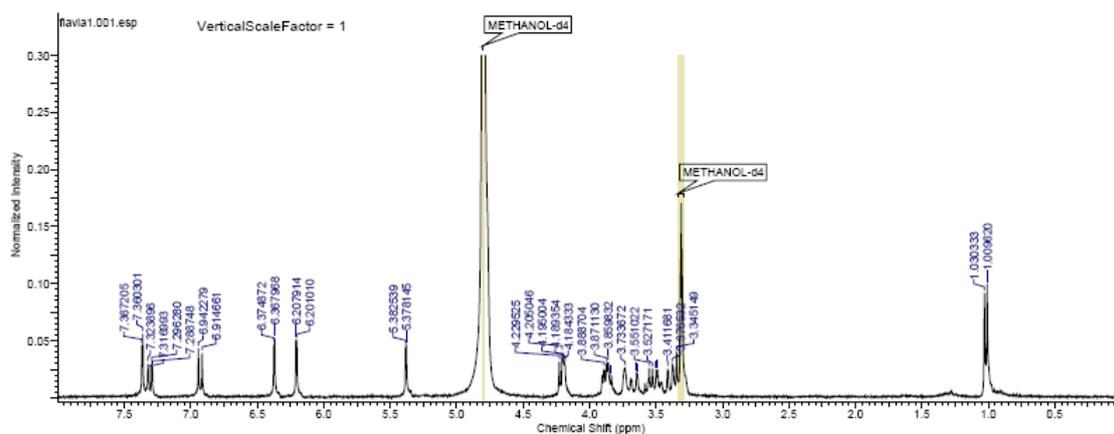


Figura 10- Espectro de RMN ^{13}C da substância quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ranopiranosideo (**3**) (ppm, 75 MHz, CD_3OD)- Dados proveniente da dissertação de mestrado.

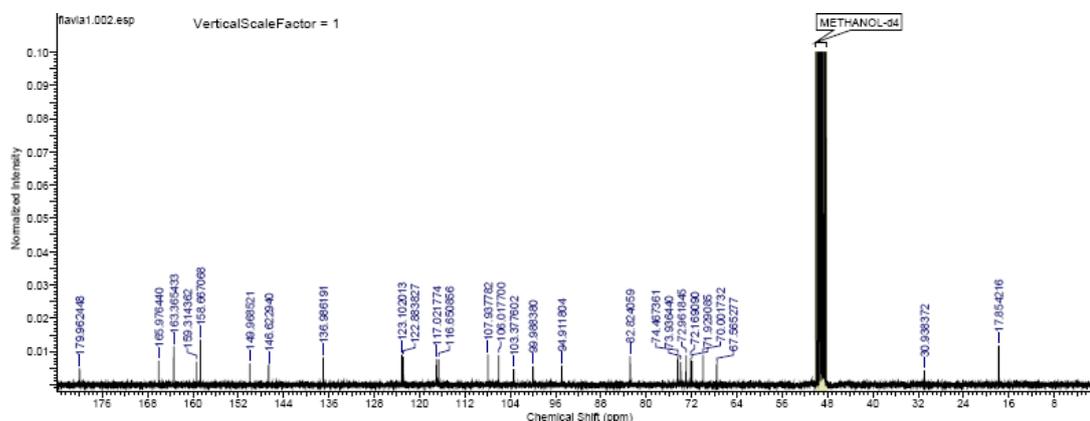


Figura 11- Espectro de massas (ESI^+) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 7,8 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (**A**) e referente ao tempo de retenção 8,2-9,3 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (**B**) das folhas de *K. pinnata*.

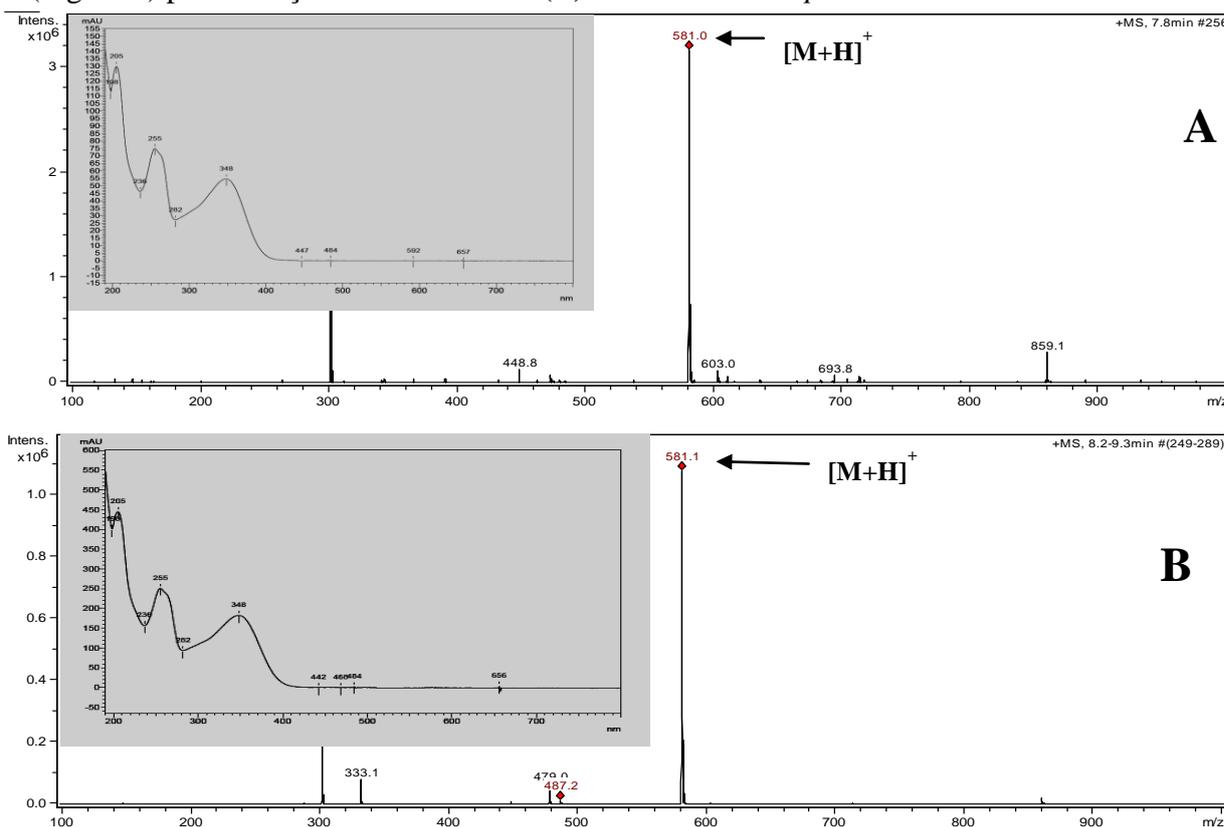


Figura 12- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (*m/z* 581.2), referente ao tempo de retenção 7,8 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e (*m/z* 581.2) referente ao tempo de retenção 8,7 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à substância quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranosídeo (3) e seus fragmentos, identificada no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.

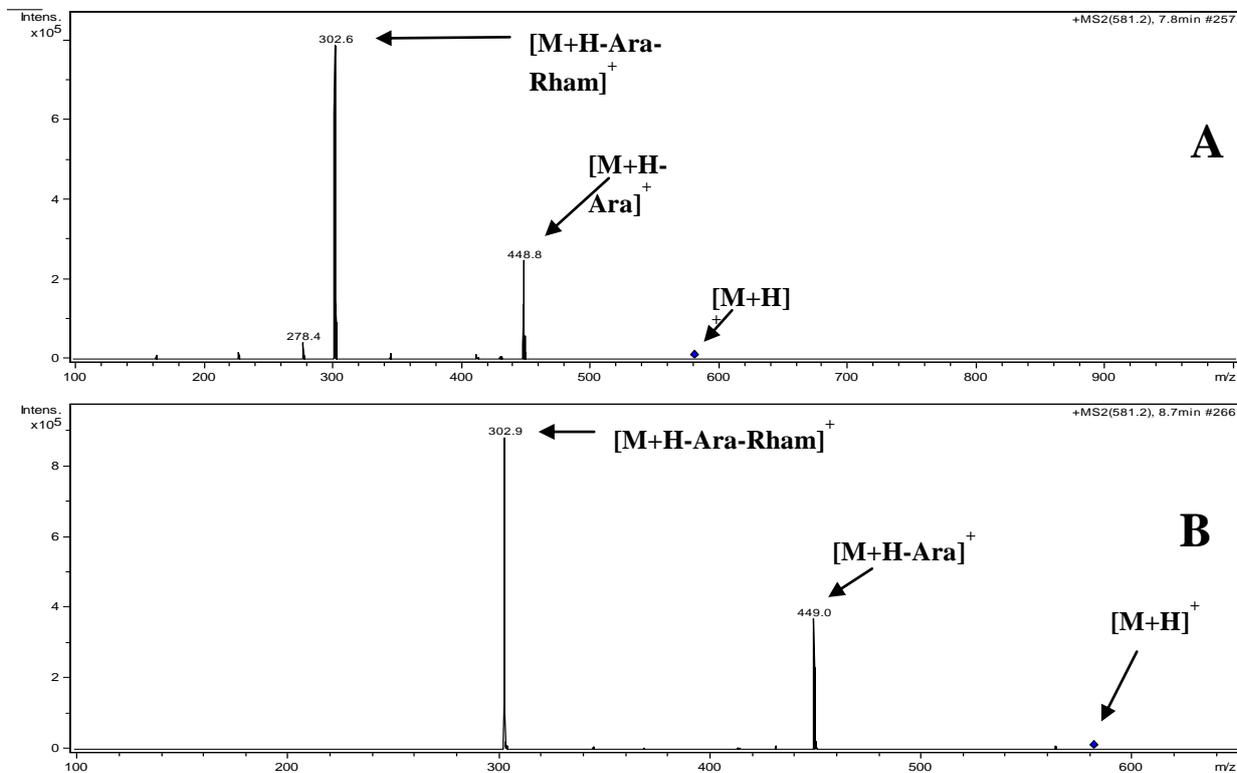


Figura 13- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 8,4 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e referente ao tempo de retenção 9,3-9,8 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

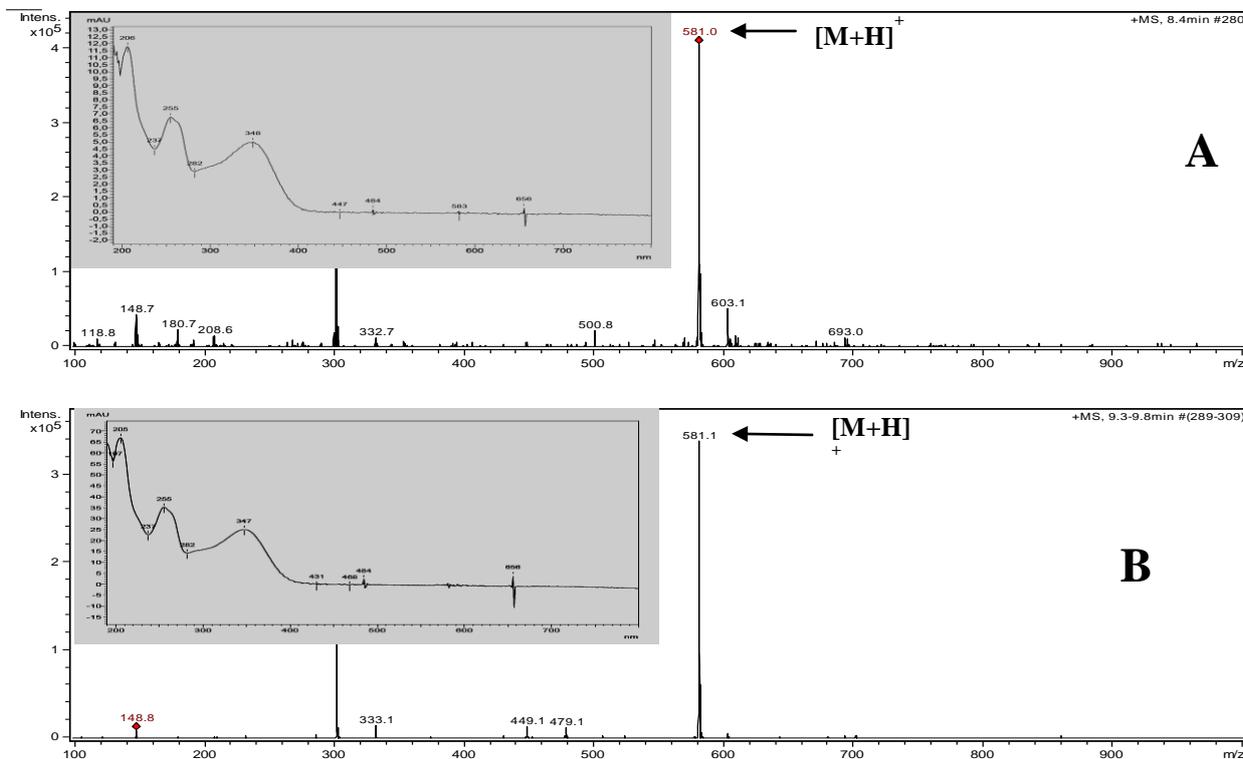


Figura 14- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (m/z 581.2), referente ao tempo de retenção 8,4 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e (m/z 581.2) referente ao tempo de retenção 9,5 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à substância quercetina 3-*O*- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ranopiranosideo (4) e seus fragmentos, identificada no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.

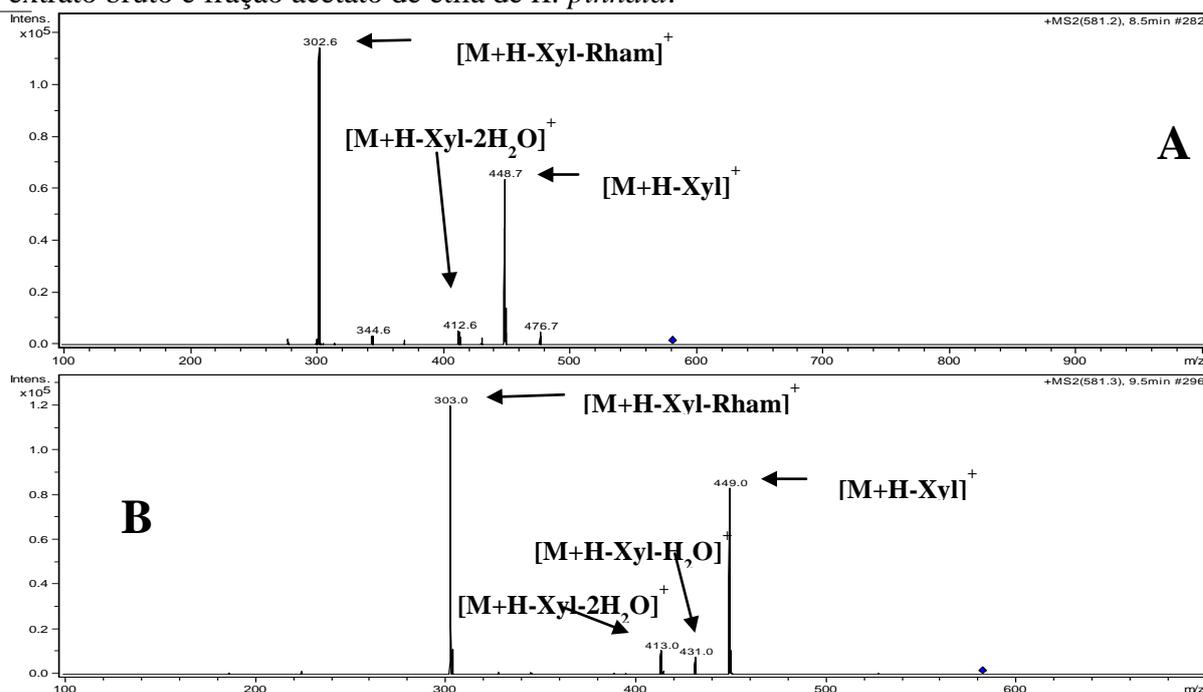


Figura 15- Espectro de RMN ^1H da substância quercitrina (**5**) (ppm, 300MHz, CD_3OD)-Dados proveniente da dissertação de mestrado.

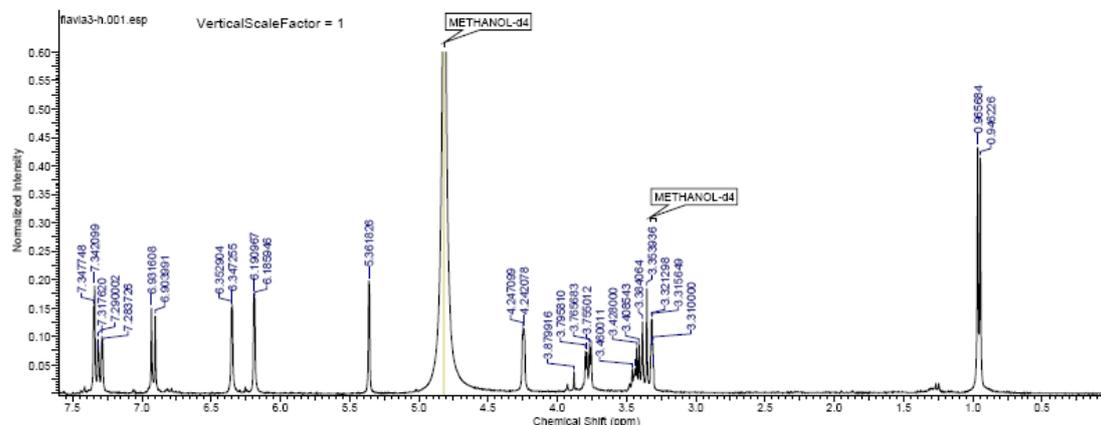


Figura 16- Espectro de RMN ^{13}C da substância quercitrina (**5**) (ppm, 75 MHz, CD_3OD)-Dados proveniente da dissertação de mestrado.

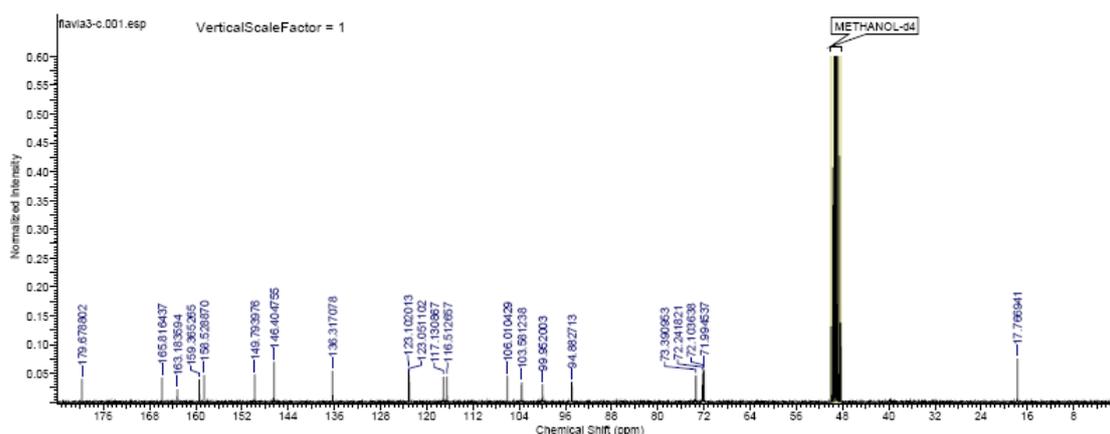


Figura 17- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 9,1 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e referente ao tempo de retenção 10,6 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

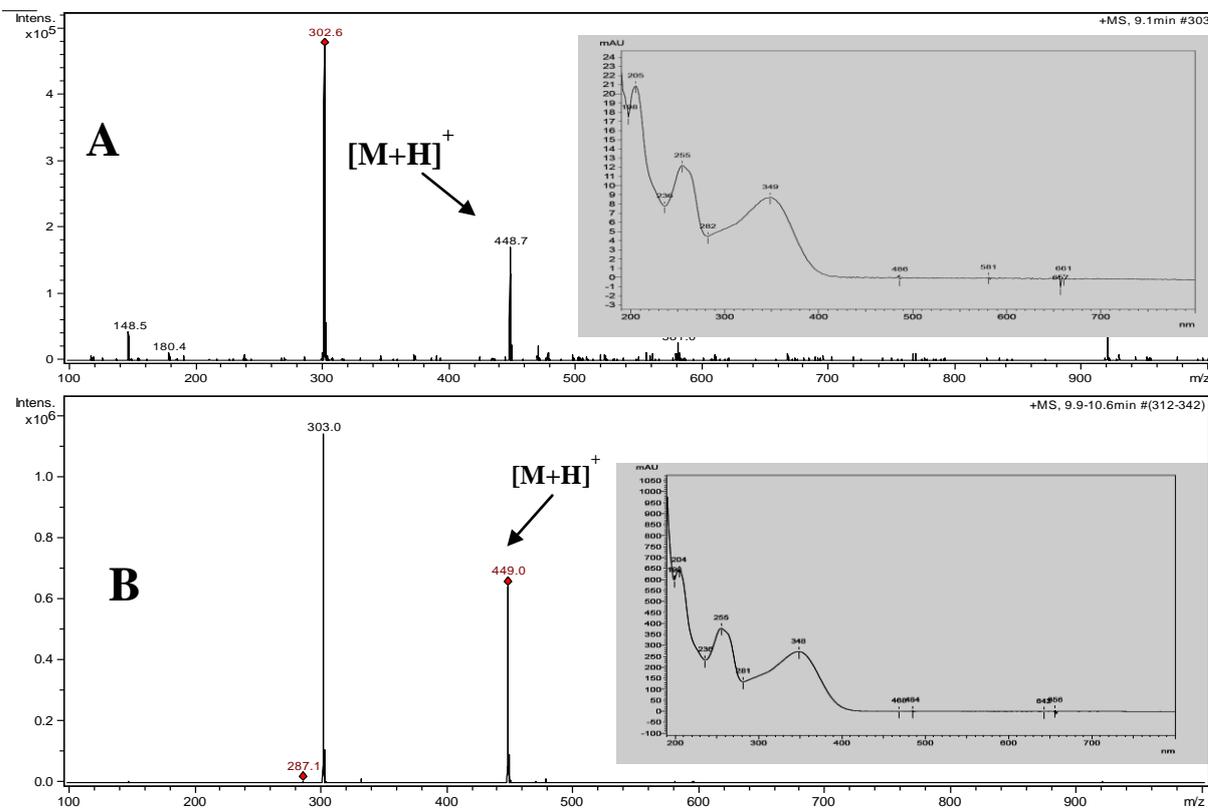


Figura 18- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (*m/z* 448.9), referente ao tempo de retenção 9,1 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e (*m/z* 448.9) referente ao tempo de retenção 10,6 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à quercitrina (5) e seus fragmentos, identificada no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.

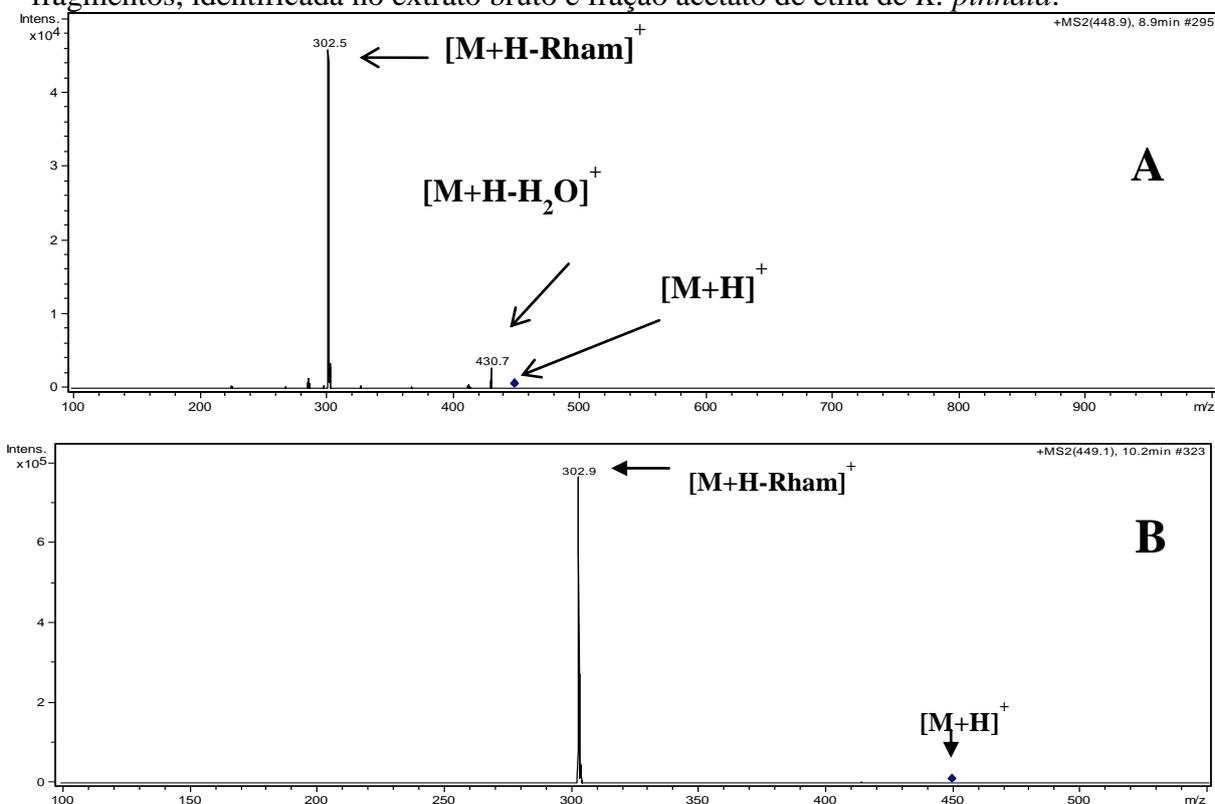


Figura 19- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 13-13,3 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

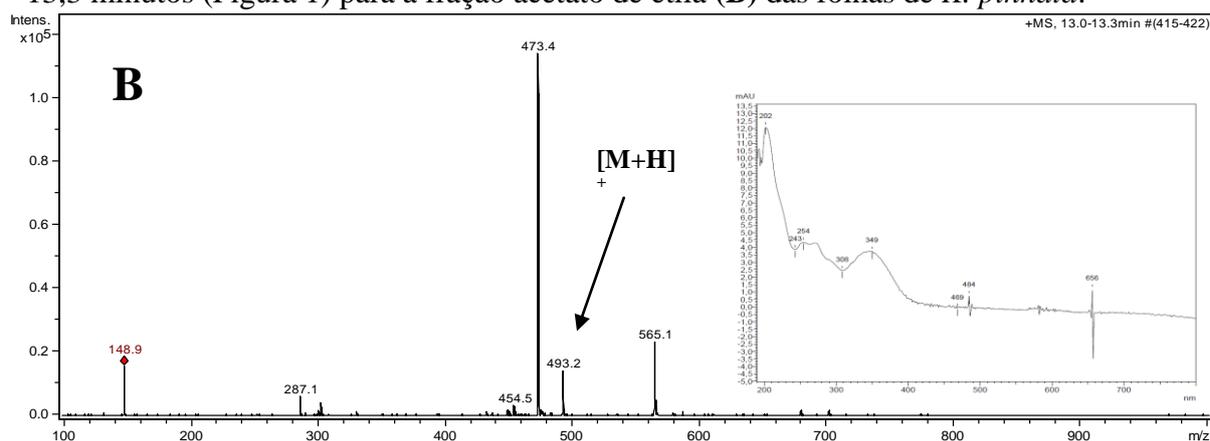


Figura 20- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (m/z 493.3), referente ao tempo de retenção 13-13 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à 4',5,7-tri-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O-β-D-glicopiranosídeo (5.1) e seus fragmentos, identificada na fração acetato de etila de *K. pinnata*.

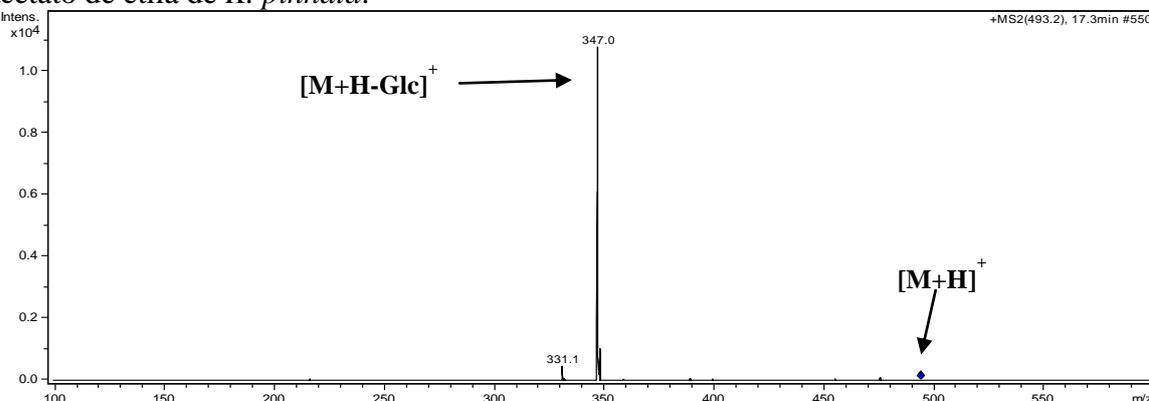


Figura 21- Espectro de massas (ESI⁺) e espectro de UV referente ao tempo de retenção 11,8 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e referente ao tempo de retenção 13,3-13,9 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) das folhas de *K. pinnata*.

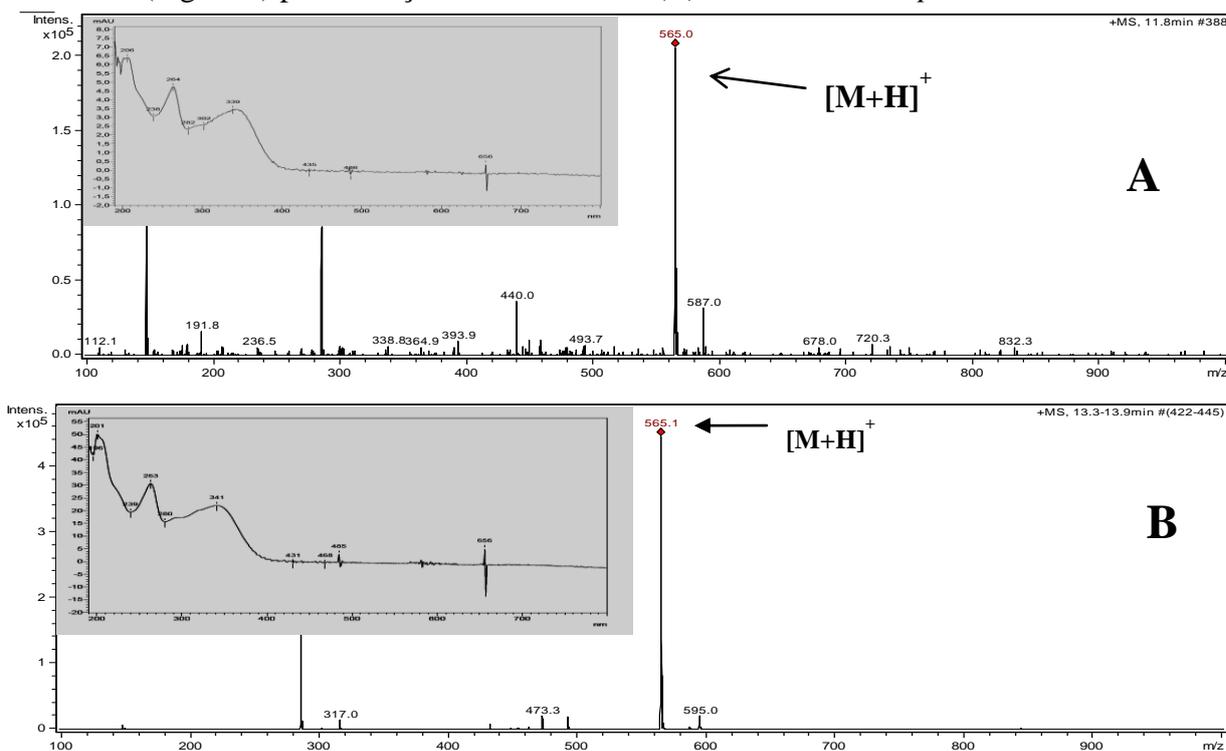
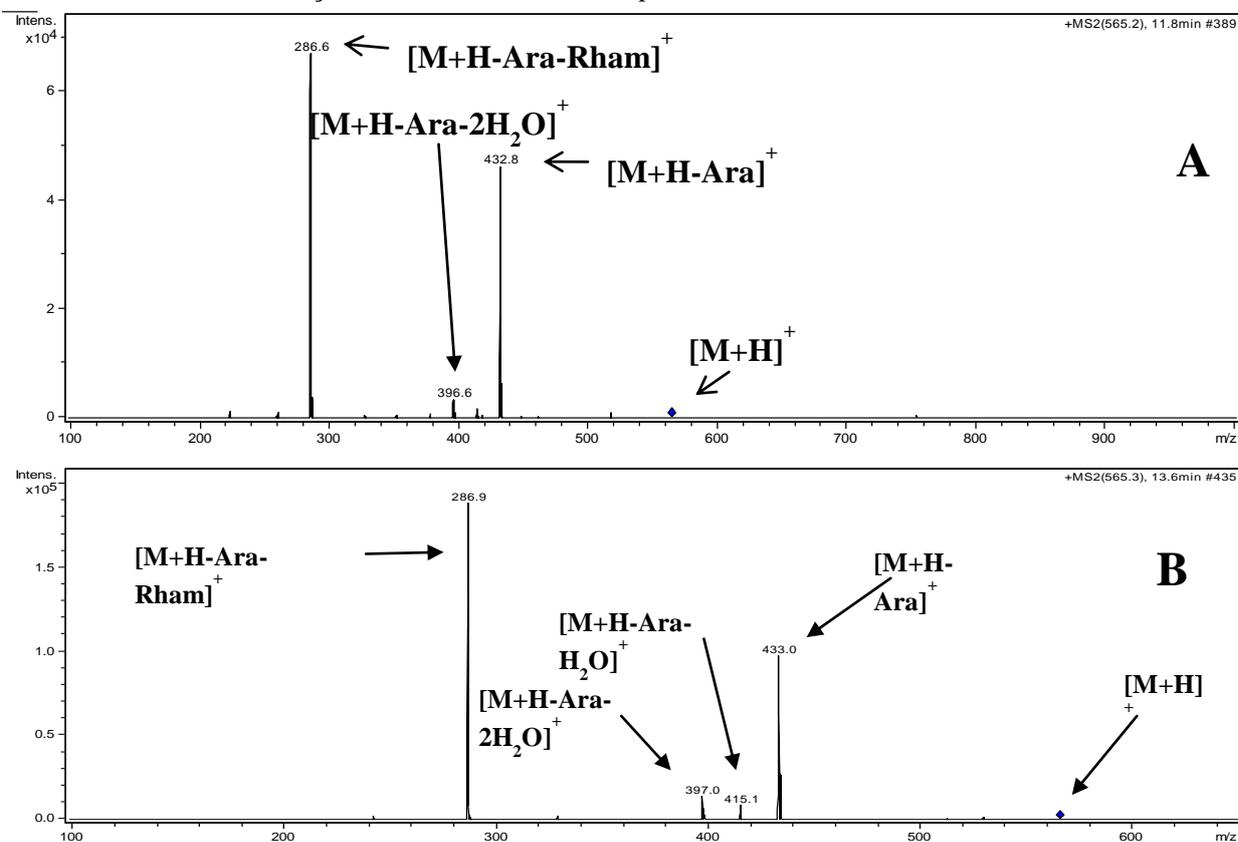


Figura 22- Modo positivo MS² de [M+H]⁺ (m/z 565.2), referente ao tempo de retenção 11,8 minutos (Figura 1) para o extrato bruto (A) e (m/z 565.3) referente ao tempo de retenção 13,3-13,9 minutos (Figura 1) para a fração acetato de etila (B) correspondente à kaempferol-3-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ranopiranosideo (6) e seus fragmentos, identificada no extrato bruto e fração acetato de etila de *K. pinnata*.



Anexo