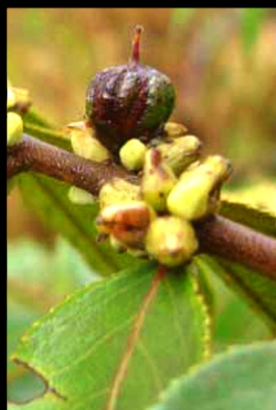


ALINE ZANCHETTI AMENI



**Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*:
constituintes químicos, potencial terapêutico
e interações medicamentosas.**



São Paulo
2015



ALINE ZANCHETI AMENI

**Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*:
constituintes químicos, potencial terapêutico e interações
medicamentosas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Silvana Lima Górnjak

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3178
FMVZ

Ameni, Aline Zancheti

Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas / Aline Zancheti Ameni. -- 2015.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvana Lima Górnaiak.

1. *Casearia sylvestris*. 2. Atividade anti-úlceras. 3. Estudo fitoquímico. 4. Estresse oxidativo. 5. Citocromo P450. 6. Atividade anti-tumoral. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas.", protocolado sob o CEUA nº 5071070514, sob a responsabilidade de **Aline Zancheti Ameni e equipe; Aline Zancheti Ameni; Karin Simon; Alberto Vetore Neto; Sérgio Faloni De Andrade** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 13/05/2015.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 103 Heterogenics rats (103 males), protocol number CEUA 5071070514, under the responsibility of **Aline Zancheti Ameni and team; Aline Zancheti Ameni; Karin Simon; Alberto Vetore Neto; Sérgio Faloni De Andrade** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 05/13/2015.

Vigência da Proposta: de 1/2012 a 1/2015

Área: [Patologia Experimental E Comparada](#)

Procedência: [biotério FMZV](#)

Espécie: [Rato heterogênico](#)

Gênero: [Machos](#)

idade: [60 dias](#)

N: [103](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [120-200g](#)

Nota: O estudo objetiva avaliar o potencial terapêutico do extrato fluido de *C. sylvestris* para prevenção de úlcera aguda e crônica e quais mecanismo de ação estão envolvidos, bem como avaliar a atividade das principais enzimas de biotransformação hepáticas - CYP total e isoformas e estudar os constituintes químicos presentes no extrato.

São Paulo, 25 de maio de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AMENI, Aline Zancheti

Título: Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

PRÓLOGO

O presente trabalho de pesquisa é a continuação do estudo com a planta *Casearia sylvestris*, o qual foi iniciado com nossa Dissertação de Mestrado, intitulada “Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar*”.

No estudo anterior foi possível obter importantes dados relativos aos efeitos da administração aguda (2000mg/kg, dose única) e prolongada, por via oral, do extrato fluido, da planta, em 3 doses: 60, 120 e 240mg/kg durante um período de 30 e 90 dias. Além disso, foi também objetivo realizar estudos preliminares de imunotoxicidade. Os resultados desta pesquisa mostraram que o extrato fluido da *C. sylvestris* não produziu nenhum sinal de toxicidade sistêmica ou efeitos adversos nas doses testadas, bem como, não foram detectadas qualquer alteração no sistema imune, sugerindo que o uso da *C. sylvestris* é seguro mesmo quando administrada em doses elevadas e de maneira prolongada. Vale ressaltar que este tipo de estudo não havia sido relatado na literatura.

Visa-se agora verticalizar esta pesquisa, investigando os efeitos da *C. sylvestris* no estresse oxidativo, na atividade enzima do complexo citocromo P450, bem como aprofundar o estudo fitoquímico, procurando-se determinar qual(is) seria(m) o(s) composto(s) ativo(s) relacionado(s) à atividade terapêutica antiúlcera. Adicionalmente, foi realizado um estudo inicial (*screening*) do potencial antitumoral da “guaçatonga”.

Cabe ressaltar que esta pesquisa, foi realizada de forma multidisciplinar, com a colaboração de quatro grupos externos de pesquisa:

- Prof. Dra. Karin Argenti Simon - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Laboratório Multidisciplinar em Saúde e Meio Ambiente – UNIFESP, Campus Diadema. Colaboração na pesquisa sobre efeitos no estresse oxidativo e complexo enzimático citocromo P450.
- Prof. Dr. Guillermo Schmeda Hirschmann - *Instituto de Química de Recursos Naturales, Laboratorio de Química de Productos Naturales, Universidad de Talca*, Chile. Colaboração no estudo fitoquímico do extrato fluido de *C. sylvestris*.
- Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Laboratório de Fitoquímica (Ciências Farmacêuticas). Colaboração no estudo

fitoquímico do extrato metanólico e frações de *C. sylvestris* e investigação atividade antiúlcera.

- Prof. Dr. José M. Padrón - *BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” - Universidad de La Laguna*, Tenerife, Espanha. Colaborador do doutorado sanduíche com o projeto de avaliação dos efeitos citotóxicos de extratos de *C. sylvestris* – *Screening* do potencial antitumoral; e Prof. Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz (Departamento de Química Orgánica, *Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” - Universidad de La Laguna*).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Silvana Lima Gorniák, por me receber neste programa de pós, por toda atenção dispensada a mim durante todo o doutorado, pela confiança, pelo auxílio em todos os momentos em que precisei.

À Dr^a Karin Simon, professora da UNIFESP, que me recebeu em seu laboratório e pela colaboração nos experimentos de estresse oxidativo e também aos seus alunos pela ajuda durante o trabalho.

Ao Prof Dr. Guillermo Schmeda Hirschmann - Instituto de Química de Recursos Naturales, Laboratorio de Química de Productos Naturales, Universidad de Talca, Chile, pela Colaboração no estudo fitoquímico do extrato fluido de *C. sylvestris*. Aos amigos: Cristina, Mariano, Felipe, Ivanna, Fabiana, as aulas de espanhol, a amizade e a colaboração amorosa durante toda minha estada no Chile.

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Laboratório de Fitoquímica (Ciências Farmacêuticas) pela colaboração no estudo fitoquímico do extrato metanólico e frações de *C. sylvestris* e investigação atividade antiúlcera. Obrigado pelo apoio e por todo conhecimento que me foi passado.

Ao Prof. Dr. José M. Padrón - BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" - Universidad de La Laguna, Tenerife, Espanha. Colaborador do doutorado sanduíche com o projeto de avaliação dos efeitos citotóxicos de extratos de *C. sylvestris* - Screening do potencial antitumoral; e ao Prof. Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz (Departamento de Química Orgánica, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" - Universidad de La Laguna). Obrigado pelo acolhimento e pela oportunidade!

Aos meus pais Acir e Angela e a Tia Maria pelo apoio e amor

Aos meus eternos amigos cientistas malucos: Andréia, Thaisa, Sayuri, Thiago, Natália, Samantha, Adriana, Fernando, Luciana, Beatriz, pela amizade, pelos ótimos conselhos, pelo auxílio imprescindível para realização deste trabalho. Eu amo vcs!!!

A minha "sorella" italiana Elisa Brasili, pela amizade, amor e por me ensinar a "palar italiano molto bene".

A Marcel Ferrari pela amizade, amor e morada na confecção desta tese, com vista pro mar....VIVA!!!

As terapeutas Júlia e Rosane pelas sessões magníficas de apoio e incentivo.

Aos amigos de todo o mundo que passaram pela minha vida nesta caminhada.....

Aos funcionários do biotério do VPT ,Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia pela paciência, auxílio nos experimentos e amizade.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT pelo auxílio sempre que preciso.

A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

A CAPES pela bolsa de estudo, programa PDSE, doutorado sanduíche.

MUITO OBRIGADA a todos os animais usados nestes experimentos.

E a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADEÇO AO UNIVERSO E AO PAI MAIOR POR TUDO QUE ME FOI CONCEDIDO NESTE PERÍODO! GRATIDÃO!

RESUMO

AMENI, A. Z. **Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris***: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas. [Study of the fluid extract of *Casearia sylvestris*: chemical compounds, therapeutic potential and drug-interactions]. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A planta *Casearia sylvestris* é catalogada como planta medicinal de interesse ao SUS, indicada para o tratamento de gastrite e como cicatrizante, para ser utilizada na forma de infusão ou compressas. Assim, foi objetivo deste estudo avaliar o potencial terapêutico antiulcerogênico do extrato fluido (EF), extrato metanólico (EM) e fração diclorometano (FDM), pelo modelo de indução de úlcera por etanol-acidificado. Realizou-se também a análise fitoquímica objetivando identificar os compostos ativos presentes nos extratos, através de técnicas de cromatografia, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. Os resultados obtidos mostraram que tanto o EF, quanto o EM e FDM foram eficazes na prevenção de úlceras gástricas. Além disso, foram avaliados os possíveis efeitos do EF no estresse oxidativo hepático e na indução ou inibição do complexo enzimático citocromo P450. Os resultados obtidos mostraram alteração apenas do ciclo-redox da glutathiona com a razão GHS/GSSG diminuída nos animais tratados, sugerindo que deve ser ter cautela ao utilizá-lo concomitantemente a medicamentos pelo risco de interações medicamentosas. Adicionalmente, foi realizado um estudo preliminar do potencial antitumoral do EM e frações através de ensaio bioguiado de citotoxicidade (ensaio sulforrodamina B), no qual foi observada pronunciada atividade citotóxica ($IC_{50} \leq 5\mu\text{g/ml}$) em diferentes linhagens tumorais. A análise fitoquímica identificou flavonóides (quercetina, rutina, kaempferol) e terpenos (espatulenol, diterpeno clerodânico). Portanto, pode-se sugerir que os efeitos terapêuticos ocorrem da sinergia destes princípios ativos.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*. Atividade anti-úlceras. Estudo fitoquímico. Estresse oxidativo. Citocromo P450. Atividade anti-tumoral.

ABSTRACT

AMENI, A. Z. **Study of fluid extract of *Casearia sylvestris***: chemical compounds, potential therapeutic and drug-interactions. [Estudo do extrato fluido de *Casearia sylvestris*: constituintes químicos, potencial terapêutico e interações medicamentosas]. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The *Casearia sylvestris* plant is cataloged as a medicinal plant of interest to the Unified Health System in Brazil indicated for the treatment of gastritis and healing, to be used in the form of infusion or compresses. Thus, the aim of this study was to evaluate the antiulcerogenic therapeutic potential of fluid extract (EF), methanol extract (EM) and dichloromethane fraction (FDM) on ethanol/HCl induced gastric model ulcer. The results obtained showed that EF, as EM and FDM, have been effective in preventing gastric ulcers. Also, a phytochemical analysis by chromatographic techniques, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance was carried out to identify the active constituents present in the extracts. Moreover the possible effects of EF on hepatic oxidative stress and on induction or inhibition of cytochrome P450 enzyme complex were evaluated. The results obtained showed only an alteration on the redox-cycle of glutathione with the GHS/GSSG ratio decreased in treated animals, suggesting caution in the use of EF concomitantly with other drugs as there might be a risk of drug interactions. In addition, a preliminary study was carried out to evaluate through bio-guided cytotoxicity assay (sulforhodamine B) the antitumor potential of the EM and fractions, in which pronounced cytotoxic activity was observed ($IC_{50} \leq 5\mu\text{g/ml}$) in different tumor cell lines. Therefore, it can be suggested that the therapeutic effects occur in consequence of the synergy of these active ingredients.

Keywords: *Casearia sylvestris*. Antiulcer activity. Phytochemical study. Oxidative stress. P450 cytochrome. Antitumor activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	SOBRE A <i>Casearia sylvestris</i>	18
2.2	NOÇÕES BÁSICAS SOBRE O ESTUDO FITOQUÍMICO DE EXTRATOS VEGETAIS	22
2.2.1	Técnicas cromatográficas para purificação e isolamento de compostos ativos e elucidação estrutural	25
2.2.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	26
2.2.2.2	Cromatografia de adsorção em coluna aberta.....	27
2.2.2.3	Cromatografia por exclusão molecular	28
2.2.2.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	28
2.2.2.5	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS, HPLC/ MS-MS).....	29
2.2.2.6	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS).....	30
2.2.2.7	Ressonância magnética nuclear (RMN)	30
3	OBJETIVO	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MATÉRIA VEGETAL	34
4.2	ANIMAIS.....	34
4.3	REAGENTES E EQUIPAMENTOS	35
4.4	PROCEDIMENTOS.....	35
4.4.1	Coleta do fígado para avaliação do estresse oxidativo	35
4.4.1.1	Superóxido Dismutase (SOD)	36
4.4.1.2	Catalase (CAT).....	37
4.4.1.3	Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG).....	37
4.4.1.4	Peroxidação Lipídica Hepática	38
4.4.2	Avaliação do sistema enzimático citocromo P450 (CYP)	38
4.4.2.1	Obtenção da fração microsomal hepática.....	38
4.4.2.2	Dosagem de proteínas	39
4.4.2.3	Quantificação total de citocromos P450 na fração microsomal hepática.....	39
4.4.3	Avaliação da atividade antiúlcera	40

4.4.4	Reagentes e equipamentos parte II	41
4.4.5	Extrato fluido de <i>C. sylvestris</i> (EF)	41
4.4.5.1	Caracterização do EF por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectro de massas (HPLC/ MS-MS)	42
4.4.5.2	Fracionamento químico do EF.....	42
4.4.5.3	Análise fitoquímica da fração solúvel acetato de etila (FSA).....	43
4.4.5.4	Fracionamento das frações e subfrações do EF	43
4.4.5.5	Perfil cromatográfico das subfrações SF 56-66 e SF 35-50	45
4.4.5.6	Análise por ressonância nuclear magnética (subfrações SF 56-66 e SF 35-50	46
4.4.6	Extrato metanólico de <i>C. sylvestris</i> (EM)	46
4.4.6.1	Fracionamento químico do EM.....	47
4.4.6.2	Fracionamento da fração diclorometano (FDM) e subfrações (SF).....	48
4.4.6.3	Análise da subfração SF f 11-13 por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massas (GC/MS)	50
4.4.6.4	Análise da subfração SF H 17-19 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹ H e Carbono RMN ¹³ C.....	50
4.4.7	Fracionamento bioguiado do extrato metanólico (EM) e frações FDM e extrato acetato de etila (ACT) e avaliação de citotoxicidade	50
4.4.7.1	Monitoramento dos efeitos do EM e frações com o teste de citotoxicidade em linhagens celulares cancerosas.....	52
4.4.7.2	Teste de citotoxicidade (ensaio com sulforrodamida B)	54
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	58
5.1	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	58
5.1.1	Resultados	58
5.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO CITOCROMO P450 (CYP) APÓS ADMINISTRAÇÃO, VIA ORAL, DO EXTRATO FLUIDO DE <i>C. sylvestris</i> (EF)	61
5.1.2	Resultado	62
5.3	EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA DO EXTRATO FLUIDO DE <i>C. sylvestris</i> (EF)	63
5.3.1	Resultados	63

5.4	EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA DO EXTRATO METANÓLICO (EM) E FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDM) DE <i>C. sylvestris</i>	65
5.4.1	Resultados	66
5.4	EXPERIMENTO 5: ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO FLUIDO DE <i>C. sylvestris</i> (EF)	68
5.4.1	Resultados	68
5.5	EXPERIMENTO 6: ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>C. sylvestris</i> (EM)	73
5.5.1	Resultados	73
5.6	EXPERIMENTO 7: FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO METANÓLICO (EM) E FRAÇÕES FDM E ACT E AVALIAÇÃO DE CITOXICIDADE	74
5.6.1	Resultados	76
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXO	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, de plantas e animais foram fundamentais para a saúde. Estima-se que pelo menos 25% dos medicamentos atuais são oriundos diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, e em alguns casos como na terapia do câncer, esta percentagem pode chegar aos 60% (BRASIL, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o uso de plantas medicinais de fundamental importância na atenção farmacêutica, uma vez que 70 a 95% da população, principalmente em países em desenvolvimento, utiliza este recurso terapêutico na atenção primária a saúde, geralmente utilizadas na forma de chás, decocções e compressas ou em formulações farmacêuticas como tinturas e medicamentos fitoterápicos padronizados (WHO, 2011). No Brasil, dados do Ministério da Saúde (MS), mostram que cerca de 82% da população faz uso de produtos à base de plantas medicinais orientados através do conhecimento tradicional (indígena, quilombola, entre outros povos) ou pelo uso popular de transmissão oral entre gerações como também através de sistemas oficiais de saúde sob prescrição médica (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

O MS seguindo diretrizes propostas pela OMS para estimular o desenvolvimento de políticas públicas, com a finalidade de inserir a medicina tradicional no sistema oficial de saúde do Brasil estabeleceu, no ano de 2006, a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” a qual traz como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos bem como promover o uso sustentável da biodiversidade e incentivar o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. (RODRIGUES; SANTOS; AMARAL, 2006). Assim, no ano de 2008, o MS instituiu o “Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” o qual tem como um de seus objetivos inserir o uso de plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia, no Sistema Único de Saúde (SUS). Para tal, no ano de 2009, divulgou uma relação com 71 plantas, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), a qual é constituída de espécies vegetais com potencial de gerar produtos de interesse ao SUS e ao MS (BRASIL,

2006). Ainda, a RENISUS, visa subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva relacionada com a regulamentação, cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos e tem também a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO) (BRASIL, 2012). Dentre as espécies escolhidas com potencial terapêutico, encontramos a *Casearia sylvestris*.

No Brasil, o uso desta planta com fins terapêuticos é descrito desde a publicação da 1ª Farmacopéia Brasileira (1926) e até hoje, diversas propostas de atividade terapêutica vêm sendo estudadas pela comunidade científica. As folhas da *C. sylvestris* são a parte mais utilizada, destacando-se as indicações terapêuticas mais populares: antiofídica, antitérmica, cicatrizante, antiinflamatória e no tratamento de úlceras e gastrites. Outros usos da planta, como antiviral (*Herpes simplex*), antifúngico, antimicrobiano, antioxidantes e antitumoral também são descritos (FERREIRA et al., 2011). Atualmente, o uso interno, desta planta, é indicado para o tratamento de dispepsia, gastrite e halitose e o uso tópico para dores e lesões, além disso, é indicado como antisséptico e cicatrizante, para ser utilizado na forma de infusão ou compressas e apresenta advertência somente para o uso em gestantes (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª edição, 2011).

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção será apresentado o estado da arte da pesquisa sobre a *C. sylvestris* e noções básicas sobre o estudo fitoquímico de extratos vegetais.

2.1 SOBRE A *Casearia sylvestris*

A *Casearia sylvestris* Sw. é uma planta da família das *Salicaceae* (SOLTIS et al., 2000) (Figura 1). Ocorre naturalmente em todo o território brasileiro podendo ser encontrada também em outros países da América do Sul e Central e dependendo da região, recebe nomes populares diferentes como, por exemplo, guaçatonga e herba de bugre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, café-bravo no Ceará e Paraná ou ainda, *cusé* na Bolívia, *sarnilha* em Cuba e *cafecillo cimarrón* e *hierba de burro* no Paraguai (CARVALHO, 2007).

Segundo Torres e Yamamoto (1986, p. 239) botanicamente é caracterizada por:

Subarbusto a árvore com 1,5-10,0(-15,0) m de altura. Ramos com extremidade glabra a pubescente, lenticelas esparsas a numerosas. Folhas geralmente maduras, às vezes jovens na floração; oblongas, elípticas ou ovadooblongas; base atenuada, simétrica a assimétrica; cerca de (4,0-)5,0-12,0(-14,0)x(1,0-)2,0-3,5(-4,0) cm; membranáceas a papiráceas; totalmente glabras, exceto, às vezes, a nervura central em uma ou ambas as faces; pontuações transparentes, pequenas, numerosas, distribuídas por toda a lâmina; margem levemente glandular-serrulada a serrada; venação nunca subtriplinérvea, imersa, inconspícua a conspícua na face superior, inconspícua a proeminente na face inferior; pecíolo glabro a pubescente, cerca de 0,5-0,6 cm de comprimento; estípulas caducas. Fascículo séssil, cerca de 24-40 flores por inflorescência; bractéolas pequenas, escamiformes, na base dos pedicelos; pedicelo com cerca de 2,0-6,0 mm de comprimento, articulado quase na metade de seu comprimento, glabro a pubescente. Botão floral globóide; sépalas 5, levemente unidas na base, internamente glabras, externamente glabras a pubescentes, oblongas, com cerca de 4,0x2,0 mm. Estames (8-9-)10(-11-14); filetes glabros a seríceos, alternadamente cerca de 0,8 e 1,0 mm de comprimento; conectivo com glândula apical glabra. Lobos do disco seríceos a tomentosos, com cerca de 0,5-1,0 mm de comprimento. Ovário ovóide, glabro a seríceo na porção superior, estilete com (raramente 2-) 3 ramos na extremidade, estigmas (raramente 2-) 3, capitados. Cápsula ovóide, com cerca de 5,0 mm de diâmetro, vermelha, cálice persistente; sementes 1-7, glabras, testa foveolada, arilo amarelo, pegajoso.

Figura 1 - Exemplar de *Casearia sylvestris* mostrando detalhe das folhas e flores



Fonte: (AMENI, 2015)

Em relação aos estudos fitoquímicos da *C. sylvestris*, os metabólitos secundários isolados e identificados, até o momento incluem monoterpenos e sesquiterpenos (SOUSA et al., 2007), *nor*-isoprenóides (WANG et al., 2009) triterpenos, lapachol, ácidos cafeico, clorogênico e vanílico, flavonóides (RASLAN et al., 2002) neoligninas (WANG et al., 2010), ácido elágico e derivados de ácido gálico (DA SILVA et al., 2008a), óleos essenciais como *b*-cariofileno, biciclogermacreno, α -humulene, germacrene B (ROZZA; PELLIZZON, 2013) entre outros. Ainda são descritos mais de 30 diterpenos clerodânicos isolados de *C. sylvestris*, dentre eles: as casearinas A-X, a caseargrewiina F, as casearvestrinas A-C entre outros (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; DE CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; WANG et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

A ação antiulcerogênica, dos extratos etanólico e hidroalcoólico das folhas de *C. sylvestris*, foi previamente avaliada em ratos *Wistar*, por meio de lesão gástrica aguda produzida por estresse e de lesão gástrica crônica, provocada por ácido acético. Os resultados demonstraram que o extrato protegeu a mucosa do estômago, sem alterar o pH estomacal e a secreção de ácido clorídrico, apresentando a vantagem em relação aos medicamentos cimetidina e misoprostol, comumente empregados na clínica para o tratamento da úlcera gástrica (BASILE et al., 1990; SERTIÉ; CARVALHO; PANIZZA, 2000). O óleo essencial desta planta

também mostrou efeito citoprotetor em modelo úlcera por estresse (125mg/kg) (ROZZA; PELLIZZON, 2013).

Os estudos sobre a atividade antitumoral da *C. sylvestris* tiveram início na década de 80 quando pesquisadores japoneses isolaram e identificaram os diterpenos clerodânicos (ITOKAWA et al., 1988; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991). Esses compostos apresentaram potencial de atividade antitumoral em diversas linhagens tumorais, destacando possível seletividade citotóxica, o qual, provavelmente estaria relacionado a variações no esqueleto básico do diterpeno (FERREIRA et al., 2010). Desde então, diversos estudos dos compostos químicos do gênero *Casearia* vem sendo conduzidos, com o intuito de buscar agentes quimioterápicos efetivos (BEUTLER et al., 2000).

Sobre atividade anti-inflamatória, são descritos efeitos analgésico e anti-inflamatório dos extratos aquosos de folhas e cascas, os quais foram avaliados pelo número de contorções abdominais e modelos de difusão do azul de Evans na cavidade abdominal e edema de pata em camundongos (RUPPELT; GONCALVES; PEREIRA, 1990). O extrato hidroalcoólico de suas folhas também mostrou atividade anti-inflamatória em modelo utilizando o método de difusão de azul de Evans em ratos (SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004). Camargo et al. (1996) observaram a propriedade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico em lesão subcutânea em camundongos, observando redução da fase aguda do processo inflamatório seguida de intensificação e prolongamento da fase regenerativa da lesão. Outro estudo conduzido por Albano et al. (2013) demonstrou que o extrato hidroalcoólico possui atividade antioxidante e anti-inflamatória em modelos de edema de pata e pleuresia induzida por carreagenina, sugerindo mecanismo de ação compatíveis com anti-inflamatórios não esteroidais, mostrando diminuição de células migratórias e atividade de enzimas relacionadas ao processo de inflamação aguda.

Quanto ao uso da guaçatonga para o tratamento da herpes labial, Cury (2005) avaliou em humanos a eficácia de cremes à base de tintura desta planta a 10% em lesões herpéticas, comparando com creme do antiretroviral, penciclovir a 1%, num estudo duplo-cego, e verificou que o creme oriundo da planta induziu à cicatrização num período de tempo significativamente menor do que o creme de penciclovir.

A atividade antiofídica do extrato aquoso das folhas de *C. sylvestris* foi avaliada em ensaios farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo*, e mostrou que este extrato inibiu as atividades hemolítica, anticoagulante, miotóxica, a indução de

edema de pata, além de diminuir a letalidade, produzidas pelo veneno de cobras dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesia* (BORGES et al., 2000; RASLAN et al., 2002; OSHIMA-FRANCO et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2007).

Ainda, é descrito na literatura a ação contra fungos: *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* (DE CARVALHO et al., 1998; OBERLIES et al., 2002; DA SILVA et al., 2008b) e bactérias: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* (MOSADDIK et al., 2004). Outros estudos demonstram ainda que espécies do gênero *Casearia* possuem ação antiprotozoária contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* e larvas de *Aedes aegypti* (DE MESQUITA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006).

Schoenfelder et al. (2008) mostraram que o extrato metanólico de folhas apresentam atividade antilipídêmica, diminuindo o nível de triglicerídeos e lipases. Resultados semelhantes foram encontrados na pesquisa conduzida por Werle et al. (2009) e Ameni (2011) os quais mostraram que a administração do extrato hidroalcoólico de *C. sylvestris*, em ratos, promoveu diminuição dos níveis de triglicerídeos sanguíneos, quando comparados aos animais controles.

Diante dos dados citados anteriormente verifica-se que diferentes extratos desta planta foram estudados e apresentam diversas propriedades terapêuticas. Além disso, verifica-se que embora alguns compostos químicos já tenham sido isolados da planta, até o momento não existem dados sobre quais os componentes químicos seriam os responsáveis por tais atividades (FERREIRA et al., 2011). Dessa forma, justifica-se plenamente que futuras pesquisas sobre compostos biológicos ativos sejam realizadas, permitindo, assim, melhor compreensão dos seus efeitos biológicos.

Em relação a informações sobre a toxicidade desta planta, os dados de literatura ainda são insuficientes para validar o uso racional e nortear o desenvolvimento de medicamentos à base desse fitoterápico (ARAÚJO et al., 2014).

Em estudo prévio, realizado neste laboratório, verificou-se que o extrato fluido de *C. sylvestris* não causou efeitos tóxicos quando administrado em dose única 2000mg/kg no estudo de toxicidade aguda. Além disso não mostrou efeitos sistêmicos de toxicidade ou efeitos imunotóxicos nos estudos em doses repetidas por 28 e 90 dias (60,120 e 240mg/kg) (AMENI, 2011). Estes dados obtidos

corroboram os estudos anteriores, nos quais mostraram também baixa toxicidade aguda da planta (DL50 = 1790mg/kg via intraperitoneal em camundongos e DL50 = 1840mg/kg via oral em ratos) (SILVA et al., 1988; BASILE et al., 1990).

O potencial genotóxico do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* foi avaliado por Maistro et al. (2004) empregando-se o “teste do cometa”, que avalia a lesão e o reparo do DNA, verificando-se que este extrato não apresentou efeitos genotóxicos. Da mesma forma, De Oliveira et al. (2009) demonstraram, utilizando-se o teste do micronúcleo (MN) e do cometa, que o extrato etanólico da planta, também preveniu lesão no DNA induzida pela ciclofosfamida, quando empregado em baixas concentrações, contudo, vale ressaltar que em altas concentrações este extrato promoveu dano no DNA.

2.2 NOÇÕES BÁSICAS SOBRE O ESTUDO FITOQUÍMICO DE EXTRATOS VEGETAIS

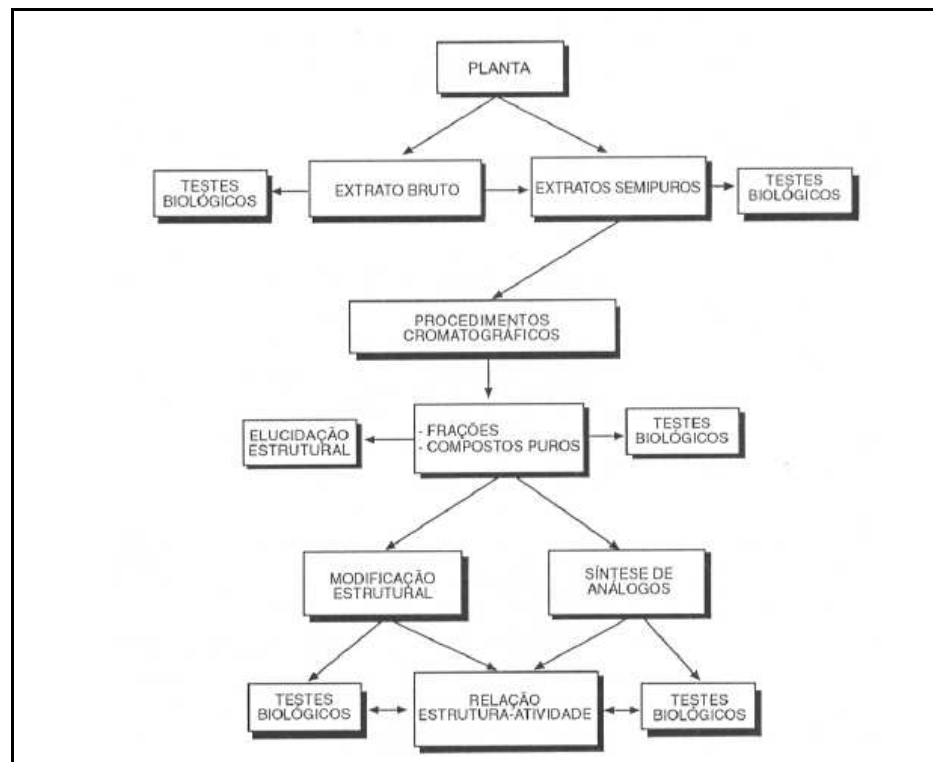
A determinação dos princípios ativos responsáveis pela atividade farmacológica ou o estabelecimento de marcadores químicos é de fundamental importância para o desenvolvimento, a padronização e o controle de qualidade de fitoterápicos. O conhecimento dos princípios ativos também contribui para o estabelecimento do mecanismo de ação (farmacológico e toxicológico), da relação estrutura-atividade e servem de modelos para a síntese ou semi-síntese de fármacos (CALIXTO, 2000).

Klein et al. (2010) destacam que o uso de fitoterápicos é uma tendência atualmente observada na assistência à saúde da população, sendo indispensável a padronização da manufatura de fitoterápicos para doses uniformes, atendendo aos critérios de qualidade inerentes aos medicamentos, representando um importante pré-requisito para assegurar a constância dos efeitos terapêuticos e segurança do usuário.

Para a obtenção de princípios ativos de plantas, são realizados diversos procedimentos nas etapas de separação e purificação: fracionamento, técnicas cromatográficas e técnicas para elucidação estrutural, conforme ilustrado na figura 2, havendo assim a necessidade de um trabalho em colaboração amplo entre químicos

e farmacologistas, devido à complexidade de metabólitos secundários que podem estar presentes (alcalóides, cumarinas, esteróides, flavonóides, glicosídeos cardioativos, lignanas, óleos essenciais, saponinas, triterpenos), entre outros. Por meio destes procedimentos, objetiva-se a obtenção de frações, subfrações e, finalmente, os compostos puros o que permitiria então predizer, após testes biológicos, qual(is) principal(is) componente(s) químico(s) responsável(is) pela atividade terapêutica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Figura 2 - Procedimentos gerais para separação e purificação de extratos visando a obtenção de compostos biologicamente ativos

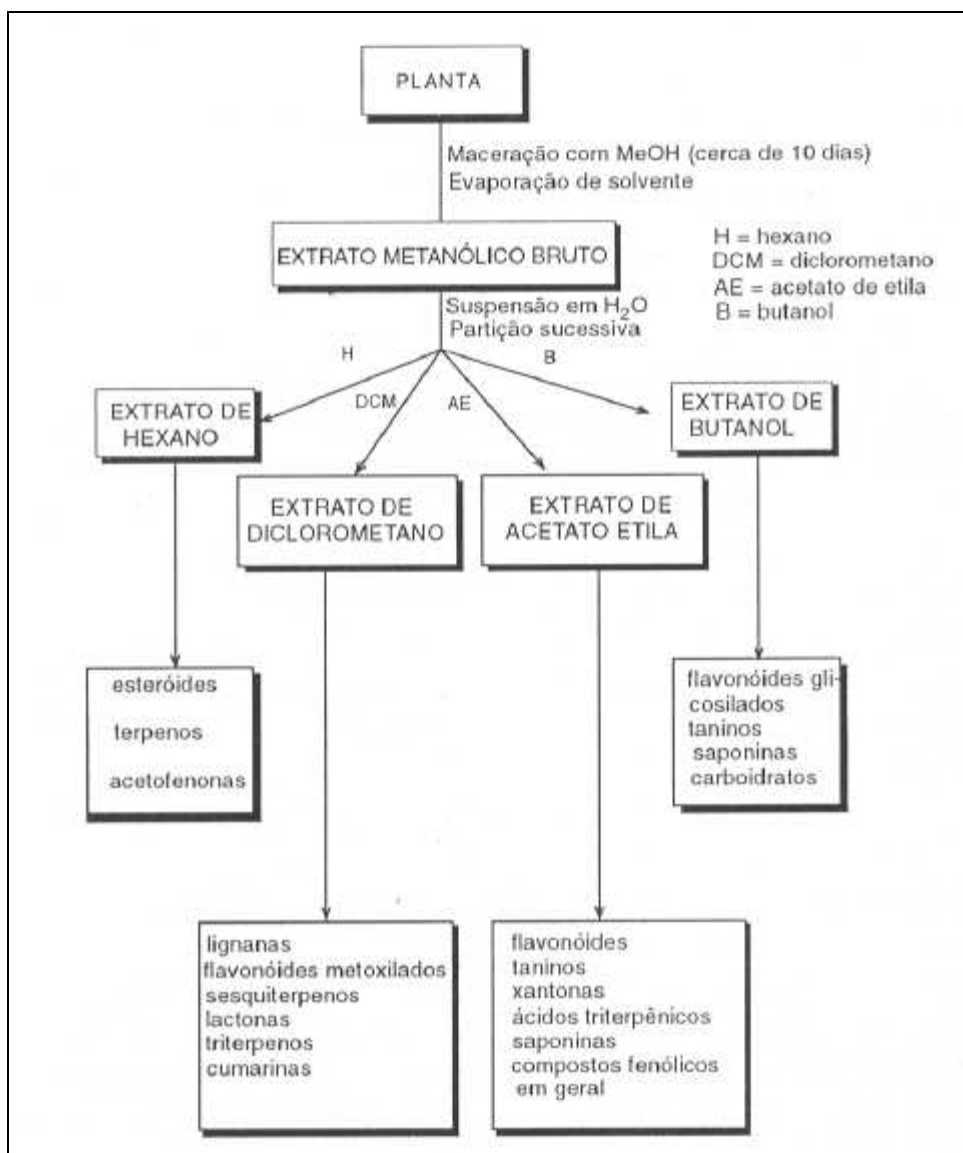


Fonte: (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998)

Existem várias metodologias descritas para análise fitoquímica de extratos vegetais visando o isolamento e identificação de compostos isolados. Aqui será citada a metodologia proposta por Cechinel-Filho e Yunes (1998) na qual inicia-se o estudo fitoquímico com o extrato hidroalcólico (análogo a tinturas de uso popular) e, este, apresentando o efeito biológico, procede-se de forma sistemática para fracionamento do extrato. A segunda etapa consiste na preparação de um extrato da

planta com metanol, o qual permite a extração de grande número de compostos químicos, sendo, a seguir, submetido à partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, o que possibilita separar os compostos de diferentes classes químicas, conforme ilustrado na figura 3. Posteriormente, são realizados os testes biológicos e as frações ativas são submetidas a técnicas cromatográficas para o isolamento e purificação de compostos, visando-se depois a elucidação estrutural das moléculas.

Figura 3 - Esquema geral de fracionamento e separação dos principais metabólitos presentes em plantas



Fonte: (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998)

2.2.1 Técnicas cromatográficas para purificação e isolamento de compostos ativos e elucidação estrutural

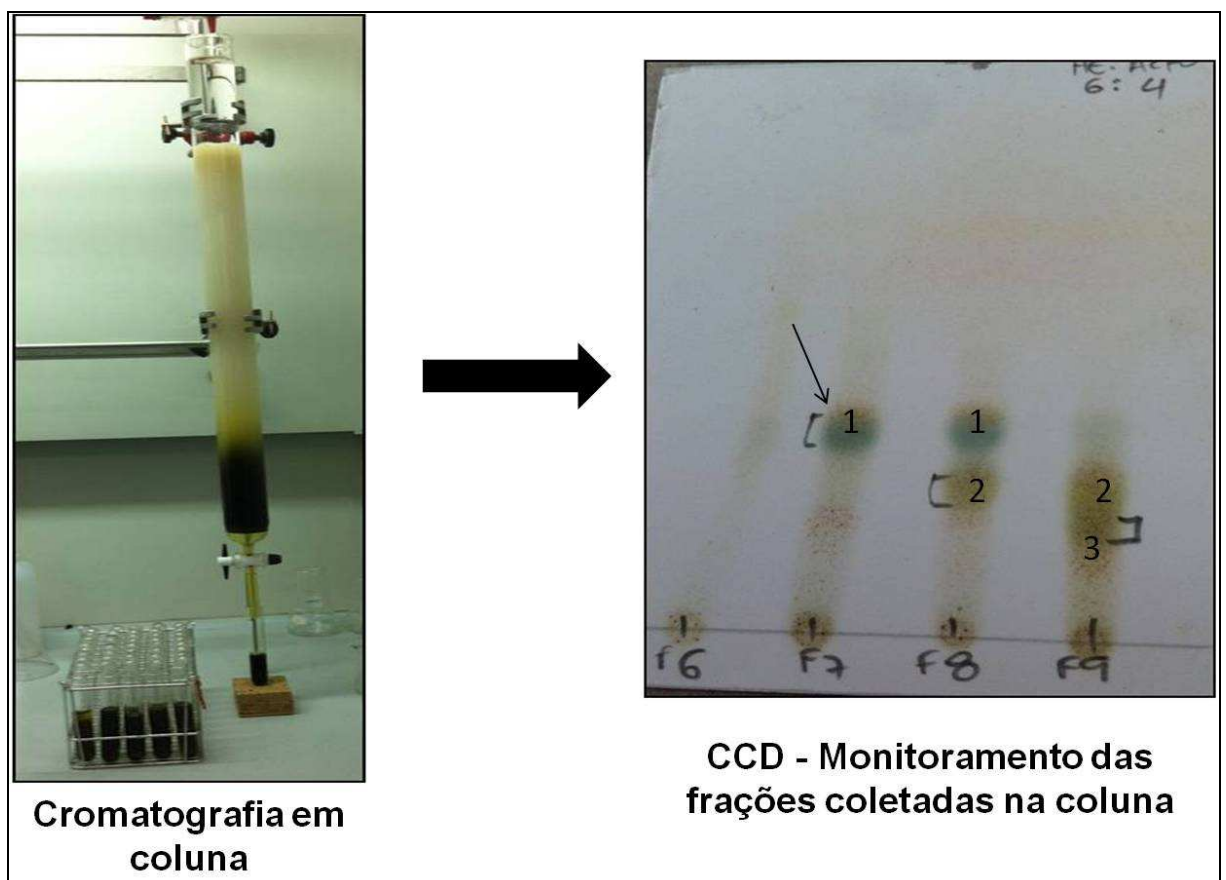
As técnicas cromatográficas e analíticas permitem a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal e são rotineiramente utilizadas para o conhecimento da composição química, do princípio ativo e/ou do composto tóxico de uma planta, podendo também ser útil para a determinação de marcadores biológicos de uma espécie, para controle qualitativo e quantitativo, propiciando a padronização do material vegetal e produtos relacionados (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Os métodos comumente usados para a extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos dos extratos e óleos essenciais são os métodos cromatográficos clássicos, como a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia de adsorção em coluna (CC), a cromatografia de partição e a cromatografia de exclusão molecular. Podem ainda ser citados métodos mais modernos, como a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida (CL) e cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (WOLFENDER; RODRIGUEZ; HOSTETTMANN, 1998). O uso de técnicas hífenadas (interligação de técnicas cromatográficas) como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS e HPLC/MS-MS - cromatografia líquida com detector seletivo de massas *tandem*) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD - espectrofotômetro de luz ultravioleta visível - UV-Vis) proporcionaram um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com melhores níveis de sensibilidade e seletividade (FIAMEGOS et al., 2004). No que se refere à elucidação estrutural das substâncias, os métodos atualmente utilizados são: espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono, espectrometria de massas (EM) e espectrometria no ultra violeta (visível e infravermelho).

2.2.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido – sólido. A separação das substâncias se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. É um método simples, rápido, visual, econômico, e sensível para uma caracterização prévia dos constituintes de uma droga vegetal (qualitativa e semi-quantitativa), sendo a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento e identificação dos compostos das frações coletadas em cromatografia de adsorção em coluna (FAMEI et al., 2006), conforme exemplificado na figura 4.

Figura 4 - Exemplo de cromatografia em camada delgada, utilizada para o monitoramento de frações obtidas da cromatografia de adsorção em coluna, as manchas identificadas ([1,2,3]) mostram os compostos presentes nas frações F7, F8, F9



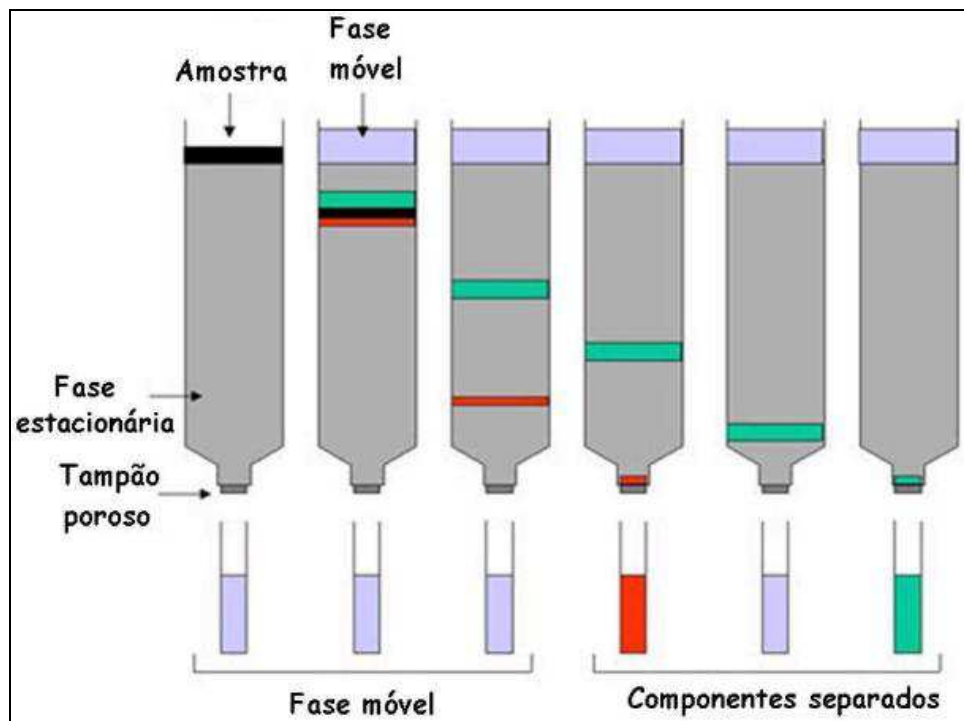
Fonte: AMENI, 2015

Legenda: CCD = cromatografia em camada delgada

2.2.1.2 Cromatografia de adsorção em coluna aberta

A cromatografia em coluna é uma técnica de partição entre duas fases, sólida e líquida, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade. O sólido deve ser um material insolúvel na fase líquida associada, sendo que os mais utilizados são a sílica gel (SiO_2) e alumina (Al_2O_3), geralmente na forma de pó. A mistura a ser separada é colocada na coluna com um eluente menos polar e vai-se aumentando gradativamente a polaridade e consequentemente o seu poder de arraste de substâncias mais polares. Os diferentes componentes da mistura se movem com velocidade distinta, dependendo de sua afinidade pelo adsorvente e também pelo eluente separando assim os compostos. É uma das técnicas mais utilizadas para a separação ou isolamento de constituintes de extratos vegetais; além de ser muito versátil, podendo ser utilizada uma gama de combinações de diversas fases móveis e estacionárias (FUNARI et al., 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Foto ilustrativa de cromatografia em coluna aberta



Fonte: (<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFgRMAE/aula9cromatografia-pps?part=3>).

2.2.1.3 Cromatografia por exclusão molecular

A cromatografia por exclusão promove uma distribuição seletiva e dinâmica de moléculas a serem separadas entre dois líquidos, a fase móvel presente dentro dos poros da fase estacionária e a fase móvel externa aos poros. A fase estacionária, insolúvel na fase móvel, é comumente um polímero ou um gel e apresenta poros de tamanhos bem controlados, que regulam a entrada e a saída das moléculas que podem permear parcialmente ou completamente dentro da fase estacionária, sem ter qualquer interação com ela, princípio esse diferente dos mecanismos que governam as outras modalidades de cromatografia (COLLINS, 2011). O gel geralmente utilizado é o *Sephadex- LH20*[®] (gel dextrana) o qual foi especialmente desenvolvido para filtração de produtos naturais como esteróides, terpenóides, lipídios e peptídios de baixo peso molecular em solventes orgânicos.

2.2.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Esta técnica é utilizada rotineiramente para análise e isolamento de produtos naturais a partir de matrizes complexas (extratos vegetais), e permitem obter o perfil cromatográfico, usado como “impressão digital (*fingerprint*)”. A análise do cromatograma obtido é uma importante ferramenta para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, uma vez que, pode demonstrar tanto similaridades quanto diferenças entre amostras de extratos quanto aos seus constituintes químicos, podendo ser usado tanto para padronização quanto para detectar adulteração (CHITLANGE et al., 2008). De fato, esta técnica de cromatografia, está cada vez mais sendo utilizada pela comunidade científica, especialmente por demonstrar a característica sistêmica dos componentes da amostra focando na identificação e estabilidade dos constituintes químicos observados. Sendo assim, esta técnica foi introduzida e aceita pela OMS, como estratégia para avaliação de plantas medicinais, sendo exigida para padronização de ervas medicinais chinesas e suas matérias-primas, pelo *Drug Administration Bureau of China* (DABC), assim como é recomendada por outras entidades regulatórias como *Food and Drug*

Administration (FDA) dos Estados Unidos e a *European Agency for Evaluation of Medicinal Products* (EMA) e também pela ANVISA no Brasil (ALAERTS et al., 2007).

O HPLC-DAD é também é uma técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais desde que o analito apresente grupos cromóforos que propiciem a absorção de luz na região de UV-visível. Este detector mostra o espectro de UV de cada composto eluído que, juntamente com o tempo de retenção, constituem dois parâmetros importantes para o processo de identificação dos compostos (WOLFENDER; RODRIGUEZ; HOSTETTMANN, 1998). Os flavonóides, por exemplo, apresentam duas bandas de absorção no UV, a banda II, entre 240 e 285 nm, e a banda I, entre 300 e 550 nm, e com base nas características espectrais obtidas, é possível a identificação e quantificação com boa seletividade (MOISEEV; BUZUK; SHELYUTO, 2011).

2.2.1.5 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC/MS, HPLC/MS-MS)

O princípio de funcionamento de qualquer espectrômetro de massas baseia-se na detecção de íons selecionados de acordo com a sua razão massa/carga, sendo m a massa em u [massa atômica unificada, chamada também de Dalton (Da)] e z a carga formal e os aparelhos tem os seguintes componentes: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e registrador. Resumidamente, a amostra é introduzida no espectrômetro de massas através de um *inlet* (dispositivo para a introdução da amostra no espectrômetro) e direcionada para a fonte de ionização onde são ionizados adquirindo carga positiva ou negativa, e posteriormente são levados analisador de massas que separar tais íons de acordo com a sua relação m/z gerando os sinais que serão obtidos pelo computador e serão mostrados através dos espectros de massas, dos quais, são obtidos tanto dados qualitativos (estrutura molecular) como quantitativos (massa molecular ou concentração (HO et al., 2003).

Na análise de compostos polares presentes em produtos vegetais, as hifenações com a cromatografia líquida de alta eficiência são as mais utilizadas,

principalmente a HPLC-MS-MS pelo grande número de informações geradas, sendo útil na determinação dos compostos presentes na amostra, com a vantagem de ser simples o preparo das amostras e ter rápida obtenção de resultados com alta seletividade tendo merecido destaque ao estudo de plantas medicinais (FIAMEGOS et al., 2004).

2.2.1.6 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS)

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS) por impacto de elétrons (IE) é uma das técnicas mais aplicadas na caracterização de compostos químicos voláteis, devido à simplicidade, precisão e rapidez sendo assim uma ferramenta muito útil na identificação de compostos de origem vegetal graças à disponibilidade de bibliotecas espectrais onde os dados gerados podem ser comparados diretamente com os valores de tempo de retenção (índice de retenção) obtidos em colunas de polaridades diferentes e com os espectros de massas dos constituintes voláteis publicados (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

2.2.1.7 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectrometria de espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma forma de espectrometria de absorção. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radio frequência em função das características da molécula e atualmente é uma ferramenta para os químicos de produtos naturais, pois os espectros obtidos de compostos orgânicos são muito informativos na elucidação estrutural de substâncias (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

OBJETIVOS

3 OBJETIVO

Avaliar os possíveis efeitos da administração do extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) no estresse oxidativo e nas enzimas do complexo citocromo P450, o potencial terapêutico antiulcerogênico do EF e do extrato metanólico (EM), o potencial antitumoral (*screening in vitro*) e realizar o estudo fitoquímico para identificar os compostos ativos presentes nos extratos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação do estresse oxidativo hepático após administração oral do EF de *C. sylvestris* (danos hepáticos).
- Avaliar os efeitos do EF de *C. sylvestris* na indução ou inibição do complexo enzimático do citocromo P450 (possibilidade de interação medicamentosa).
- Avaliar a atividade antiulcerogênica do EF e EM de *C. sylvestris*.
- Avaliar o potencial citotóxico (atividade antitumoral) do EM, frações e subfrações mais purificadas da planta, frente a linhagens celulares cancerosas (mama, colón, cérvix e pulmão).
- Realizar estudo fitoquímico na busca de qual/is seriam os principais constituintes químicos presentes nestes extratos (EF e EM), no intuito de relacioná-los com a atividade terapêutica.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais utilizados e a metodologia empregada para a avaliação dos diferentes parâmetros propostos na seção objetivos. Para facilidade de compreensão de todos os procedimentos realizados, estes foram divididos em duas partes, na primeira, trata-se dos estudos biológicos e na segunda parte, estão apresentados os procedimentos do estudo químico.

4.1 MATÉRIA VEGETAL

Casearia sylvestris SW, folhas, obtidas do Laboratório Panizza® (lote 1096131), certificadas com controle de análise boletim número 10213, referência MAPA/A073 (laudo Anexo A).

PARTE I: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 94 ratos machos *Wistar*, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-SP. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20cm. Todas as gaiolas foram mantidas em salas com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12h. Durante o experimento os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ-USP estão protocolados sob número 5071070514.

4.3 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

- 2-vinilpiridina (Merck[®]) – utilizada para derivatização da glutathiona reduzida na determinação dos parâmetros oxidantes, Cetamina (Vetbrands[®]) – anestésico utilizado em associação com a xilazina para anestésiar os ratos, Espectrofotômetro (Biotek), Freezer -20°C, Glutathiona redutase (Fragon) - converte toda glutathiona em glutathiona reduzida, Reagente de Ellman's (DTNB) (Merck[®]) – utilizado para quantificação de proteínas, Xilazina (Vetbrands[®]) – sedativo de uso veterinário utilizado em associação com cetamina para anestésiar os ratos.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Coleta do fígado para avaliação do estresse oxidativo

Os ratos foram anestesiados (cetamina 50mg + xilazina 5mg /kg) e, em seguida, os tecidos foram perfundidos *in situ* com KCL 1,15% até que o fígado se tornasse de cor caqui e os animais mortos por decaptação. Após foi retirado uma amostra do fígado de aproximadamente 4g (divido em 2 partes: 1 citosol e 1 microsoma). A seguir, 0,1g de tecido foram separados para determinação do conteúdo de glutathiona oxidada e reduzida. O restante do fígado coletado foi processado para dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A fração correspondente ao TBARS foi pesada, colocada em recipientes contendo solução KCl 140mM e fosfato de potássio 10mM pH 7,0, picada e lavada duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram

homogeneizados com solução KCl 140mM e fosfato de potássio 10mM pH 7,0 (1:4 p/v). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservada para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O restante do homogeneizado foi destinado para a dosagem das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Para tal, foram realizadas duas centrifugações adicionais, 10.400g por 20 minutos e, por fim, ultracentrifugação a 60.000g por uma hora, da qual foi retirado o sobrenadante (citosol) e armazenado a -80°C até o processamento.

4.4.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A transformação de xantina em ácido úrico, catalisada pela xantina oxidase, ativa o oxigênio molecular a $O_2^{\bullet-}$. A reação é acoplada à redução do citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$ que pode ser acompanhada pela redução da absorbância em 550nm, a 25°C. A adição da SOD contida na amostra promove inibição da velocidade de redução do citocromo c, uma vez que há competição entre SOD e citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o a peróxido de hidrogênio. A atividade total da SOD é medida na presença de cianeto, em concentração adequada à inibição da atividade da citocromo c oxidase (MCCORD; FRIDOVICH, 1969).

O meio de reação foi composto por citocromo c 100 μ M, xantina 500 μ M, EDTA 1mM, KCN 200 μ M, tampão fosfato de potássio 5mM e pH 7,8. A xantina oxidase foi diluída no mesmo tampão do ensaio, para garantir uma variação de absorbância de 0,030/min no meio de reação sem amostra. O citosol das amostras de fígado foi diluído na concentração 1:200 e acrescentado ao meio de reação, na quantidade suficiente para inibir de 20 a 40% a velocidade de redução do citocromo c, promovida pelo sistema xantina/xantina oxidase do meio de reação, garantindo a linearidade da resposta observada. Os resultados estão expressos em U/mg proteína, onde 1U é definida como a quantidade de enzima na amostra requerida para inibir 50% da redução do citocromo c, por minuto, a 25°C, em pH 7,8.

4.4.1.2 Catalase (CAT)

A técnica empregada para avaliar a catalase quantificou a velocidade da decomposição de H_2O_2 pela enzima, pelo decréscimo de absorbância a 230 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 30°C , uma vez que a catalase promove a hidrólise de peróxido de hidrogênio a água e hidrogênio molecular (WEISSMAN, 1976). Foi utilizado o meio de reação contendo: H_2O_2 (10mM), solução tampão Tris (1M), EDTA (5mM) em pH 8,0. O resultado foi expresso U/mg de proteína onde 1U de catalase corresponde à atividade da enzima que hidrolisa 1 mmol de H_2O_2 por minuto a 30°C , em pH 8,0.

4.4.1.3 Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG)

O conteúdo de glutathiona reduzida e oxidada foi quantificado por método colorimétrico (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006). Uma fração do fígado foi homogeneizada em uma mistura gelada de ácido metafosfórico 5% e ácido sulfosalicílico 0,6%. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e mantido no gelo até a determinação (no máximo 1 hora). Para a determinação da forma oxidada, foi feita, primeiramente, a derivatização da forma reduzida com 2-vinilpiridina. O extrato ácido obtido acima (90 μL) foi adicionado juntamente com 10 μL de tampão KPE para neutralização do pH (entre 6 e 7). Em seguida, foi adicionado 10 μL de 2-vinilpiridina em 90 μL das amostras diluídas para quantificar a glutathiona oxidada, seguida de incubação por 1 hora em temperatura ambiente. Um padrão de glutathiona oxidada (GSSH) foi preparado da mesma forma para a construção da curva. Amostras neutralizadas, com ou sem 2-vinilpiridina, foram centrifugadas a 16.000 g por 5 minutos, sendo uma alíquota de 20 μL adicionada em uma placa de 96 poços, juntamente com 120 μL da mistura NADPH 240 μM e glutathiona redutase 0,12U/mL (1:1) e 60 μL de DTNB 76 μM (1:1). O ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) reage com a glutathiona reduzida formando o cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A variação de absorbância foi medida a 412nm, a 25°C , por 4 minutos. Os resultados foram expressos em moles de glutathiona/g de tecido.

4.4.1.4 Peroxidação Lipídica Hepática

O potencial peroxidativo, dado pela medida colorimétrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidas ao fim de um determinado período de incubação (neste caso, 2 horas) foi utilizado para avaliar a potenciação do estresse oxidativo hepático. Uma alíquota de 3mL de homogeneizado hepático foi incubada em 7mL de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 a 37°C, sob agitação constante. Amostras do tempo zero e após duas horas foram retiradas e precipitadas com TCA 5%. Após centrifugação a 10.000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi submetido a reação com ácido tiobarbitúrico 0,67% em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em gelo por 20 minutos, foi registrada a absorbância em 535nm (BERNHEIM; BERNHEIM; WILBUR, 1948). A concentração de SRAT foi calculada considerando o coeficiente de extinção micromolar ($\epsilon = 0,156 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Os valores do potencial peroxidativo hepático foram expressos em nmoles de TBARS produzidos por mg de proteína em 120 minutos.

4.4.2 Avaliação do sistema enzimático citocromo P450 (CYP)

4.4.2.1 Obtenção da fração microsomal hepática

As amostras de fígado dos ratos foram lavadas e homogeneizadas com solução tampão Tris/HCl (50mM Tris, 50mM KCl, 0,5mM EDTA, pH 7,4). Este foi centrifugado a 10.000 g por 30 min a 4°C para remoção de restos celulares, núcleos e mitocôndrias. O sobrenadante foi transferido para novos tubos novamente centrifugados a 105.000g durante 60 min, 4°C. O sedimento foi lavado uma vez com tampão Tris e, em seguida, ressuspenso. Este foi novamente centrifugado a 105.000g durante 60 min a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspenso em solução de meio II (citrato de sódio 0,1M, cloreto de potássio 0,1M, glicerol 30%, ditiotreititol 1mM, água deionizada q.s.p., pH 7,6) e armazenados em criotubos a -80°C.

4.4.2.2 Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteína no homogeneizado e fração microssomal hepática foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina como padrão. O método se baseia numa mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador Cu^{+2} e produz um composto em absorção máxima de 750nm.

4.4.2.3 Quantificação total de citocromos P450 na fração microssomal hepática

A quantificação de citocromos P450 totais na fração microssomal foi realizada segundo o método descrito por Omura e Sato (1964). O princípio do método baseia-se na capacidade de ligação da hemeproteína reduzida ao monóxido de carbono, apresentando um espectro de absorção característico com a absorção máxima em 450nm. À preparação microssomal diluída (de modo alcançar 1mg/mL) foi adicionada, com o auxílio de uma espátula, uma pequena quantidade de ditonito de sódio sólido ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), suficiente para reduzir o citocromo P450 das amostras. Foram adicionados 2mL das amostras reduzidas às cubetas de referência e da amostra e, em seguida, a diferença das absorbâncias medidas nas duas cubetas (de referência e da amostra) foram corrigidas através do ajuste da linha de base. Esta correção foi feita para cada leitura. A cubeta contendo a amostra foi então levemente borbulhada com monóxido de carbono por 1 minuto. Em seguida foi registrada a diferença de espectro de absorção entre 400 e 500nm na cubeta da amostra (cubeta com solução de microssomos, ditonito de sódio e monóxido de carbono) e na cubeta de referência (cubeta com solução de microssomos e ditonito de sódio, apenas). A determinação das concentrações de citocromos P450 totais na amostra foi calculada considerando o coeficiente de extinção micromolar deste citocromo ($\epsilon = 0,091 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e expresso em nmoles P450/mg de proteínas. As medidas foram feitas em espectrofotômetro em faixa de absorção 400 a 490nm, onde mediu-se o pico ("Soret") em 450nm e o vale em 490nm resultando em Δ absorbância P450.

4.4.3 Avaliação da atividade antiúlcera

A avaliação de atividade antiúlcera foi realizada seguindo o protocolo proposto por Mizui e Doteuchi (1986) - modelo de ulceração aguda (indução por etanol acidificado). Os ratos foram mantidos em jejum por 12 horas com livre acesso a água e, em seguida, foram pesados para o ajuste das doses. Todos os ratos foram tratados uma vez, por gavagem, com o mesmo volume (1mL/100g p.v.). Como controles positivos foram utilizados os medicamentos de referência lansoprazol ou carboneoxona. Passado 30 minutos do tratamento, foi administrada a solução indutora de úlcera, HCl 0,3M em etanol 60%, no mesmo volume (1mL/100g p.v.). Uma hora após a administração do indutor, os ratos foram mortos em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados imediatamente, abertos pela curvatura maior, prensados entre placas de vidro e copiados por scanner para o computador.

A área das ulcerações foi medida através do programa Image-Pro Plus[®]:

Valores de área relativa de lesão:

$$\text{ARL} = \text{ALT} \times 100/\text{AT}$$

Área de proteção:

$$\% \text{ de proteção} = 100 - (\text{ARL grupo tratado} \times 100) / \text{ARL controle}$$

ARL= área relativa lesão;

ATL = área total de lesão, em mm²;

AT = área total do estômago, em mm².

PARTE II: ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOGUIADA DE CITOXICIDADE

4.4.4 Reagentes e equipamentos parte II

Ácido tricloroacético (TCA) (Merck), di-metil sulfóxido (DMSO)(Sigma-Aldrich®), Moxi ZOS 4.0 (contador automático de células), Penicilina G e estreptomicina(Sigma®) – antibióticos para meio de cultura celular, Placas de 96 poços com fundo chato e fundo em U (Costar), RPMI-1640 (Sigma®) – Meio de cultura celular, Soro fetal bovino (Gibco), Sulforodamina B (Sigma®).

Placas de cromatografia sílica gel F245 (20x20cm), placas cromatografia POLIGRAM® SIL G /UV₂₅₄, sílica gel 60 – coluna cromatográfica (0,015 - 0,04mm) (Macherey-Nagel). Gel dextrana Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Solventes: acetona, hexano, diclorometano, metanol, acetato de etila (Grau HPLC – Sigma).

4.4.5 Extrato fluido de *C. sylvestris* (EF)

Folhas de *C. sylvestris* (100g/L) foram umedecidas com uma solução de álcool etílico e água destilada na proporção de 1:2 e macerada por 6 horas. Após este procedimento o pó umedecido foi filtrado com a solução hidroalcolica (1L), em filtro buchner. Posteriormente, o extrato foi rotaevaporado (50°C) e liofilizado para obtenção do extrato fluido seco (EF). A caracterização fitoquímica do EF foi feita em várias etapas descritas a seguir e representadas na figura 6.

4.4.5.1 Caracterização do EF por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectro de massas (HPLC/ MS-MS)

O perfil cromatográfico do EF foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o seguinte método: 5mg do EF foi diluído em metanol/água (1:1) e filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com 0,45 μ m (MillexTM). Após foi injetada no HPLC, em coluna RP18- 5 μ m, 250 - 4,5mm (Eka Chemicals, Brewsler, USA), volume injeção 20 μ L, mantida a temperatura de 25°C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (grau HPLC) (C) e água + ácido fórmico 1% (D) com vazão constante de 1mL/min. O gradiente de eluição iniciou-se com 10% C e 90% D até 30 minutos. De 30 a 55 minutos 25% C e 75%D e de 55 a 75 minutos 60%C e 40%D, totalizando 75 minutos. Os espectros de massa foram registrados utilizando aparelho Agilent 1100 (EUA), utilizando um sistema de cromatografia líquida ligado através de uma separação de um sistema Esquire 4000 Ion Trap HPLC/MS (Bruker Daltoniks, Alemanha) ou Merck-Hitachi 6200 Bomba inteligente e L 4000 detector de UV ligado a um EBE Trisector Autospec VG Micromass espectrometro (Micromass Autospec água, Reino Unido) operando a 70 eV. Espectros de massa varredura completa foram medidos entre m/z 150 e 2000u no modo íon positivo. Para HPLC/MS de íons do sistema, o azoto foi utilizado como gás nebulizador em 27,5 psi, 350°C e a um caudal de 8L/min. As condições de espectrometria de massa para o modo de íon positivo foram: agulha electrospray, 4000 V; compensar placa final, -500 V; skimmer 156,0V; skimmer 26,0V; compensar saída capilar, 84,6 V; saída capilar, 140,6V. Colisão dissociação induzida (CID) os espectros foram obtidos com uma amplitude de fragmentação de 1,00 V (MS / MS), utilizando hélio como gás de colisão.

4.4.5.2 Fracionamento químico do EF

O fracionamento químico do EF para o estudo dos seus constituintes químicos foi realizado em colaboração com o *Laboratório de Química de Produtos Naturales, Universidad de Talca* – Chile sob supervisão do Prof. Doutor Guillermo

Schmeda Hirschmann. Inicialmente foi adicionada água quente ao EF (61g) e este colocado no sonicador e, em seguida, misturado através de agitador de tubos vórtex. Após, este extrato foi centrifugado a 4.000rpm por 30 minutos obtendo-se duas frações: solúvel (FS) e insolúvel (FI) em água. A fração FS foi dissolvida em 500mL de acetato de etila em balão de decantação obtendo-se outras duas frações: fração acetato etila (FAE) e fração aquosa (FA).

4.4.5.3 Análise fitoquímica da fração solúvel acetato de etila (FSA)

A fração FSA foi cromatografada em sílica gel (fina) utilizando uma coluna de 74,5cm comprimento e 2,5mm diâmetro, carregada com 100g sílica gel (32,5cm), utilizando-se sistema solvente éter de petróleo e acetato de etila (EP:EtoAc) da seguinte maneira: 1,47g de FSA foi dissolvido em diclorometano e metanol e após 9:1 (100mL), 7:3 (250mL), 6:4 (400mL), 1:1 (200mL), 7:3 (200mL), finalizando com acetato etila 100% (200mL) e metanol 100% (200mL), obtendo-se 20 frações, as quais foram monitoradas por CCD em sistema éter de petróleo e acetato de etila (1:1, reveladas com anisaldeído) e agrupadas por semelhança.

4.4.5.4 Fracionamento das frações e subfrações do EF

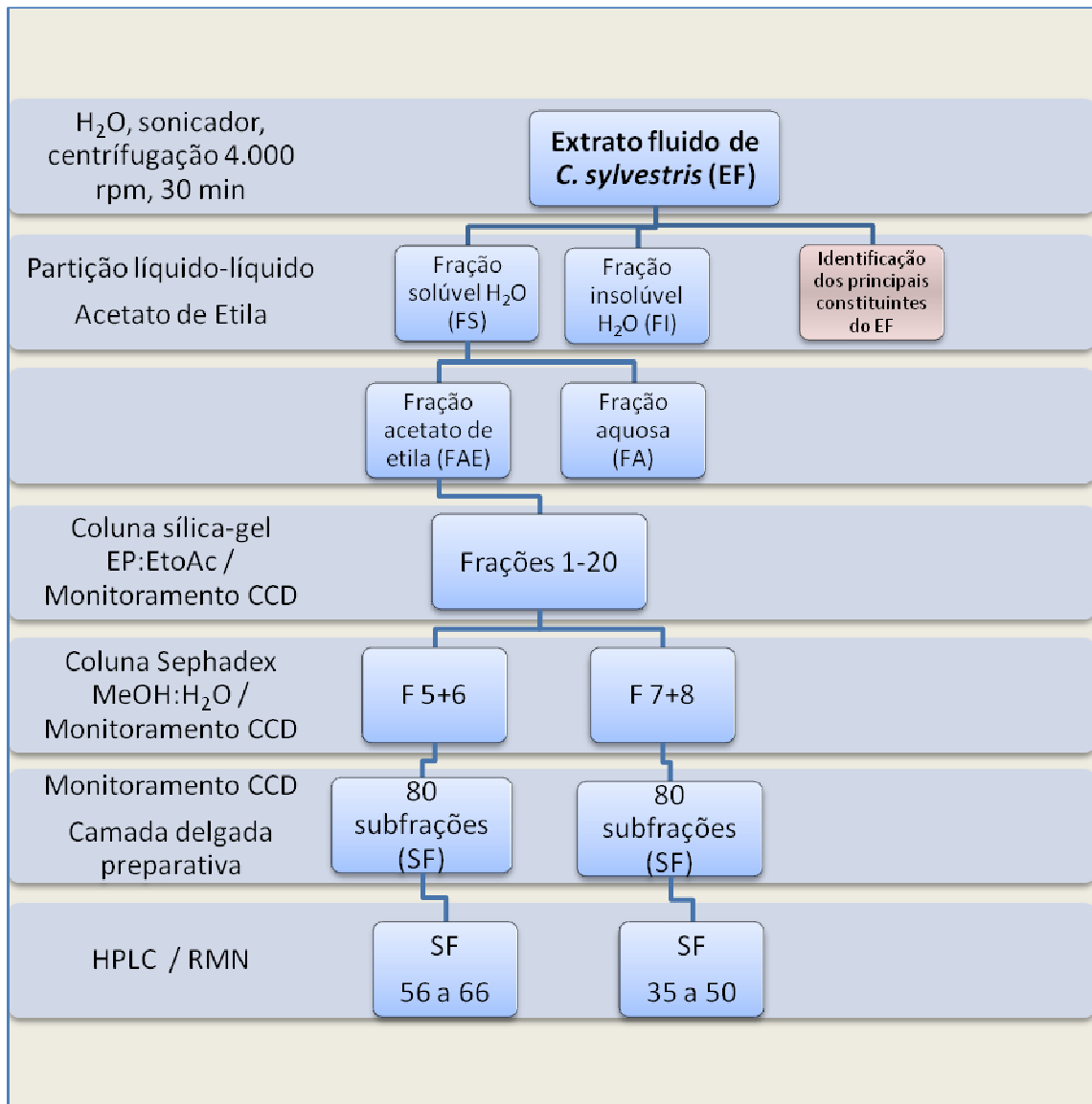
Para o fracionamento foram utilizadas técnicas de cromatografia: Cromatografia de adsorção em coluna aberta de sílica gel e cromatografia em camada delgada preparativa e Sephadex LH-20 (Figura 6). As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (sílica gel TLC PET, Sigma- Aldrich 89070 Fluka) e analisadas por luz ultravioleta (UV) 245nm (onda curta) e 365nm (onda longa).

A fração 5+6 (343mg) foi cromatografada por Sephadex LH-20, em coluna 100cm, 2cm diâmetro, carregada com Sephadex (20cm), sistema solvente MeOH: H₂O (1:1) e frações coletadas a cada 2 minutos, obtendo-se 80 frações, as quais foram monitoradas por CCD em sistema acetato etila: diclorometano: acetona (4,5:

4,5:1) e reveladas com anisaldeído. As subfrações 55-66 (SF 55-66) foram agrupadas e submetidas a camada delgada preparativa (mesmos eluentes CCD), dando origem a amostras mais purificadas, as quais foram feitas a análise RMN.

A fração 7+8 (103mg) foi cromatografada por Sephadex LH-20, em coluna 100cm, 2cm diâmetro, carregada com Sephadex (20cm), sistema solvente MeOH: H₂O (1:1) e frações coletadas a cada 2 minutos, obtendo-se 80 frações, as quais foram monitoradas por CCD em sistema acetato etila: diclorometano: acetona (4,5: 4,5:1) e reveladas com anisaldeído. As subfrações 35 a 50 (SF 35-50) foram agrupadas e submetidas a camada delgada preparativa (mesmos eluentes CCD), dando origem a amostras mais purificadas, as quais foram feitas a análise RMN.

Figura 6 - Fluxograma com as etapas da caracterização fitoquímica do extrato fluido de *C. sylvestris* (EF)



Fonte: (AMENI, 2015).

4.4.5.5 Perfil cromatográfico das subfrações SF 56-66 e SF 35-50

O perfil cromatográfico das subfrações SF 56-66 e SF 35-50 foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o seguinte método: as amostras foram diluídas em metanol/água (1:1) e filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com 0,45µm (Millex™®). Após foram injetadas no HPLC, em coluna RP18 - 5µm, 250 - 4,5mm (Eka Chemicals, Brewsler, USA), volume

injeção 20µL, mantida a temperatura de 25°C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (grau HPLC) (C) e água + ácido fórmico 1% (D) com vazão constante de 1mL/min. O gradiente de eluição iniciou-se com 10% C e 90% D até 30 minutos. De 30 a 55 minutos 25% C e 75%D e de 55 a 75 minutos 60%C e 40%D, totalizando 75 minutos. Os compostos foram monitorados a 254 e 330nm e espectro 200-700nm para caracterização dos picos.

4.4.5.6 Análise por ressonância nuclear magnética (das subfrações SF 56-66 e SF 35-50)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹H foram obtidos a 400 MHz e de Carbono RMN ¹³C a 100 MHz, num equipamento BRUCKER AC 400 (Bruker, Rheinstetten, Germany), usando clorofórmio deuterado (CDCl₃- Sigma-Aldrich) ou metanol deutaredo (MeOH-d₄ Sigma-Aldrich) como solvente para diluir as amostras utilizadas. A análise foi realizada na *Universidad de Talca*.

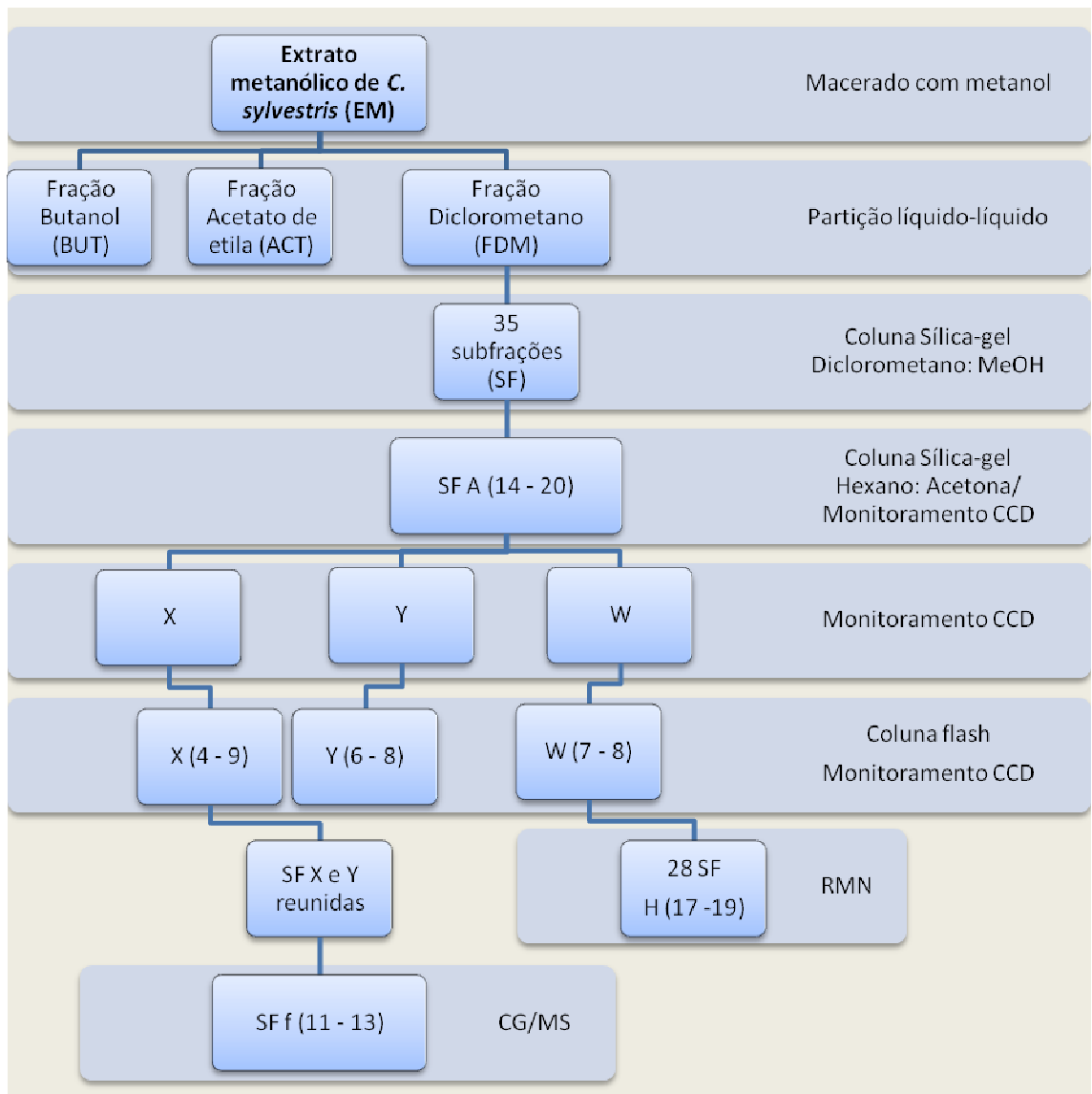
4.4.6 Extrato metanólico de *C. sylvestris* (EM)

Folhas de *C. sylvestris* (850g) foram maceradas em metanol (500mL) e mantidas por 7 dias no escuro. Após, foram coadas em filtro de papel e o extrato rotaevaporado (50°C) para obtenção do extrato metanólico bruto (EM). O rendimento do extrato obtido foi de 15,8% (134g) [(peso do extrato/peso das folhas)x100]. A caracterização fitoquímica do EM foi feita em várias etapas descritas a seguir e representadas na figura 7.

4.4.6.1 Fracionamento químico do EM

O fracionamento químico do EM para o estudo dos seus constituintes foi realizado em colaboração com o laboratório de Fitoquímica, do Curso de Farmácia, da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), sob supervisão do Prof. Valdir Cechinel Filho. O EM foi particionado sucessivamente em funil separação com solventes de polaridade crescente: diclorometano, acetato de etila e butanol, obtendo-se 3 frações: diclorometano (FDM - 125g), acetato de etila (ACT- 4,5g) e butanol (BUT- 4,5g), conforme mostrado na figura 7.

Figura 7 - Fluxograma com as etapas da caracterização fitoquímica do EM



Fonte: (AMENI, 2015).

4.4.6.2 Fracionamento da fração diclorometano (FDM) e subfrações (SF)

Foram utilizadas técnicas de cromatografia de adsorção em coluna aberta de sílica gel (sílica gel 60 de granulometria 70-230 mesh - 0,063 - 0,20mm) e cromatografia em coluna de baixa pressão (Flash – sílica gel 60 de granulometria 220-440 mesh – 35 a 75µm) de acordo com cada amostra a ser purificada. As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD)

utilizando solventes hexano e acetona em diferentes proporções com revelador anisaldeído para busca de compostos terpenos e fitoesteróides e solventes clorofórmio, metanol e a mistura de acetato de etila, acetona, água e metanol (25:8:1:3) com cloreto férrico para compostos fenólicos.

A fração FDM (10g) foi cromatografada em coluna utilizando uma coluna de 40 cm comprimento e 5,0 cm diâmetro carregada com 130g sílica gel (15cm) e eluída com fase móvel diclorometano e metanol com gradiente de eluição variando a cada 200mL na proporção do solvente (100:0; 95:5, 90:10, 80:10, 70:30 e 50:50), obtendo-se 35 subfrações, as quais foram monitoradas por CCD (hexano: acetona, 8:2) e reunidas segundo perfil cromatográfico.

A subfração denominada A (14-20, 1,6g) foi novamente cromatografada em coluna (40cm x 3cm) com sistema de solvente hexano e acetona (9:1) com gradiente isocrático (300mL) obtendo-se 24 subfrações as quais foram novamente cromatografadas por CCD (hexano:acetona 8:2) e reunidas em 3 grupos: X (2-10, 187mg), Y(11-15, 270mg) e W (16-24, 480mg).

As subfrações X, Y, W foram então cromatografadas em coluna Flash, utilizando sistema de solventes hexano: acetona (8:2) e as subfrações similares, identificadas por CCD, foram reunidas: X(2-3, 52mg), X(4-6, 61mg), X(7-9, 16mg), Y(2-3, 13mg), Y(6-8, 188mg) e W (7-8, 89mg).

As subfrações X(4-9) e Y(6-8) foram novamente cromatografadas em coluna Flash (hexano:acetona, 8:2) e as subfrações derivadas de interesse de ambas foram reunidas novamente e esta submetida em coluna flash (hexano:acetona, 9:1). Desta cromatografia resultou a subfração (f 11-13) que por CCD mostrou o composto majoritário e foi analisada por CG/MS. Para a fração FDM também foi realizada a análise por CG/MS. A subfração W (7-8) foi cromatografada em coluna Flash (hexano: acetona, 95:5) obtendo-se 28 subfrações. Destas a subfração denominada H 17-19 foi submetida á análise de RMN.

4.4.6.3 Análise da subfração SF f 11-13 por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massas (GC/MS)

As análises CG/MS foram realizadas pelo Professor MSc. Theodoro Marcel Wagner (UNIVALI). Foram adotadas as seguintes condições: cromatográfico a gás HP 6890 equipado com uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25mm e filme de 0,25µm de espessura), interfaciado com um detector seletivo de massas HP 5973 operando com energia de ionização de 70 eV. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com uma vazão de 1 mL/ min, o volume de injeção foi de 1µL de solução do óleo em diclorometano com uma taxa de divisor de fluxo de 1:100

4.4.6.4 Análise da subfração SF H 17-19 por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹H e Carbono RMN ¹³C

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹H e Carbono RMN¹³C, foram obtidos a 300 e a 75 MHz respectivamente num equipamento BRUCKER AC 300, localizado na UNIVALI, usando tetra metil silano (TMS) como referência (calibração) e clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente para diluir as amostras utilizadas.

4.4.7 Fracionamento bioguiado do extrato metanólico (EM) e frações FDM e extrato acetato de etila (ACT) e avaliação de citotoxicidade

O fracionamento bioguiado foi realizado no laboratório de química de produtos naturais do *Instituto Universitário de Bio-Orgânica Antonio González (IUBO-AG)-Universidad de La Laguna* (Tenerife – Espanha), sob supervisão dos professores Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz e Dra. Isabel López Bazzocchi e a avaliação de

citotoxicidade sob tutoria do Prof. Dr. José Manuel Padrón (IUBO- BIOLAB). As etapas do fracionamento bioguiado são mostradas a seguir na figura 8.

Nos processos cromatográficos foram utilizados os solventes orgânicos hexano, acetona, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano e metanol (todos com grau HPLC) puros ou em misturas binárias obedecendo sempre uma ordem crescente de polaridade.

Para separação dos compostos foram utilizadas as seguintes técnicas:

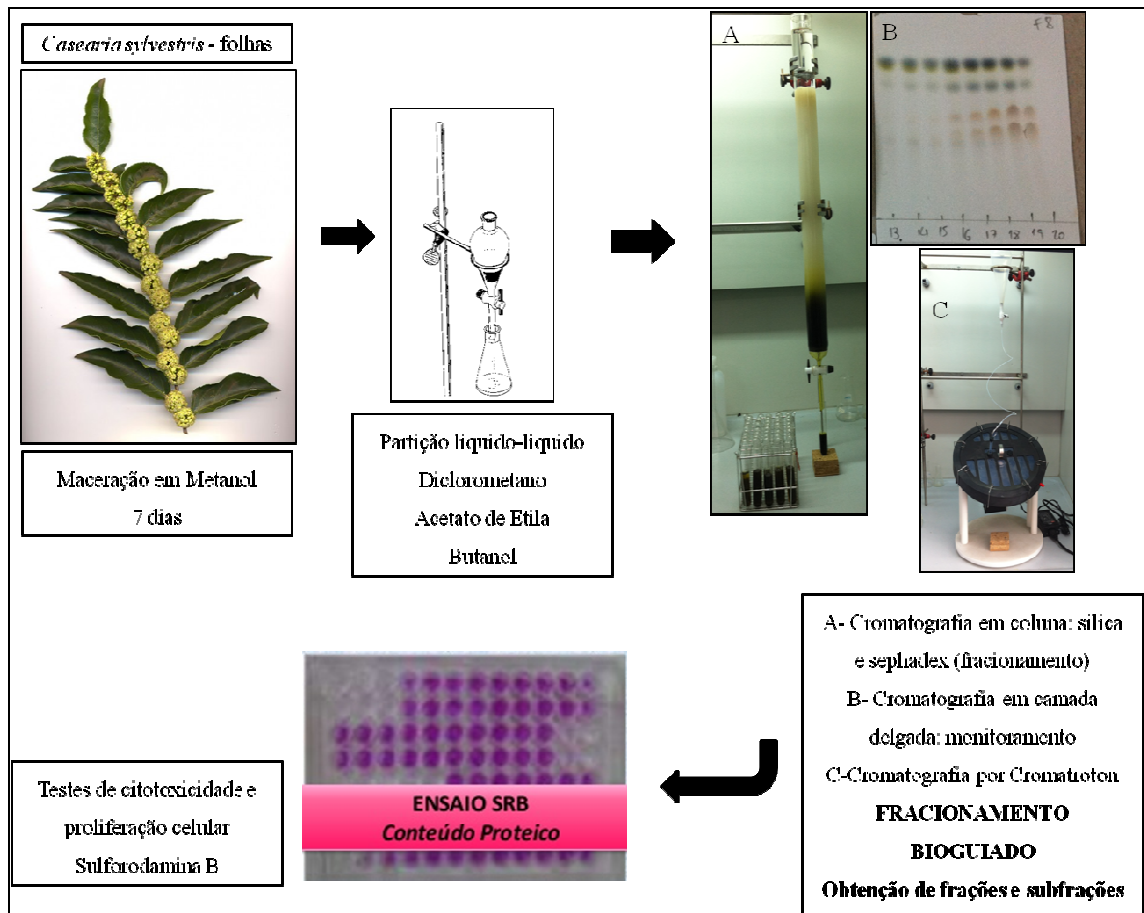
a) Cromatografia de adsorção em coluna aberta utilizando como fase estacionária géis de sílica comum (0,015 – 0,4 mm) (Silica gel 60, Macherey- Nagel).

b) Cromatografia de exclusão molecular utilizando gel dextrana Sephadex LH-20 (GE Healthcare).

c) Cromatografia preparativa de força centrífuga utilizando aparelho Cromatotron (modelo 7924T, 24VDC, 0.5 e placas de gel de sílica Merck 60 PF 254 de 2mm).

d) Cromatografia em camada delgada (CCD) e preparativa foram efetuadas em cromatoplasmas revestidas de géis de sílica (TLC Silica GEL 60, indicador de fluorescência F254, 20x20cm, espessura 0,20mm). A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi obtida através da exposição destas á radiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 365nm e/ou pela pulverização de solução de vanilina sulfúrica seguida de aquecimento em placa por 3 minutos.

Figura 8 - Desenho experimental do estudo bioguiado demonstrando etapas e metodologias adotadas na obtenção dos extratos, fracionamento químico e estudo de citotoxicidade



Fonte: (AMENI, 2015).

4.4.7.1 Monitoramento dos efeitos do EM e frações com o teste de citotoxicidade em linhagens celulares cancerosas

Para realização dos testes de citotoxicidade foram utilizadas linhagens celulares cancerosas provenientes de doações dos grupos colaboradores do IUBO/BIOLAB (*Universidad de Las Palmas de Gran Canaria* - Gran Canária/Espanha e *Vrije Universiteit* – Amsterdã/ Holanda): HBL-100 (carcinoma de mama humano), T-47D (tumor de mama humano), WiDr (adenocarcinoma de cólon humano), HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano), A549 (carcinoma epitelial de pulmão humano) e SW1573 (carcinoma alveolar de pulmão humano).

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI - 1640 suplementado com 2mM de glutamina, 100U/ml penicilina G, 0,1mg/ml de estreptomicina e 5% de soro fetal bovino em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% umidade relativa. Os subcultivos foram realizados quando a densidade celular atingiu mais de 80% de confluência. O repique de células foi realizado da seguinte maneira:

1- Aspirou-se o meio de cultivo do frasco que continha as células em crescimento exponencial, adicionando 2mL de PBS para remoção do meio de cultura contendo soro fetal bovino;

2- Eliminou-se o PBS por aspiração, adicionando 1mL de solução de Tripsina/EDTA (tripsina 0,25% e EDTA 1mM) seguidas de incubação durante 3 minutos a temperatura ambiente e 1 minuto a 37°C;

3- Adicionou-se 5mL de RPMI suplementado com soro fetal bovino para neutralizar o efeito de enzima;

4- Os aglomerados celulares foram desagregados mediante pipetagem suave e transferidos para tubos falcon para contagem celular.

O número células foi determinado em contador celular automático (Moxi Z OS 4.0, ORFLO®).

Após, inoculou-se em garrafas de cultivo (25 ou 75 cm², poliestireno, TPP) o número de células necessárias para a manutenção do cultivo celular e o restante foi pipetado em microplacas de 96 poços com fundo chato, depositando um volume de 100µL de meio contendo 10.000, 15.000 ou 20.000 células (100.000/mL, 150.000/mL ou 200.000/mL conforme a linhagem) para realização da avaliação da citotoxicidade.

Os testes de citotoxicidade foram realizados seguindo o protocolo preconizado pelo *National Cancer Institute* (NCI), com algumas modificações, utilizando-se um corante de proteína ligante Sulforodamina B (SRB), cujo mecanismo baseia-se na determinação do conteúdo total protéico de células que não foram mortas até o final do ensaio (MIRANDA et al., 2006). A ligação da SRB é estequiométrica, e a quantidade de corante extraído de células pigmentadas é diretamente proporcional a massa total de proteína e, portanto, correlacionada com o número de células (SKEHAN et al., 1990).

A citotoxicidade foi determinada dos índices de IC₅₀ (concentração inibitória 50%), TGI (inibição total de crescimento) e LC₅₀ (dose letal 50%).

Os valores foram calculados na seguinte maneira:

- T0 refere-se à densidade óptica (DO) correspondente ao número de células em cultivo a tempo zero;
- C refere-se à DO correspondente aos cultivos controle que cresceram na presença de excipiente (DMSO) na ausência de extrato;
- T refere-se à DO correspondente células expostas as diferentes concentrações dos extratos testados. A medida da viabilidade e sobrevivência celular após o cultivo na presença dos produtos, a qual representa a atividade antiproliferativa (PC) foi expressa seguindo instruções NCI (MONKS et al., 1991).

Para cálculos, os valores de DO foram corrigidos a partir da placa controle contendo somente meio de cultivo. A porcentagem de crescimento (PC) foi calculada comparando a DO em T0 das células controle (C) e células tratadas (T) com diferentes concentrações ao final do tempo de exposição.

$$\text{Se } T \geq T_0, \text{ PC} = [(T - T_0) / (C - T_0)] \times 100$$

$$\text{Se } T \leq T_0, \text{ PC} = [(T - T_0) / T_0] \times 100$$

Desta forma, foram originadas curvas dose/resposta para cada extrato e a partir delas foram calculados:

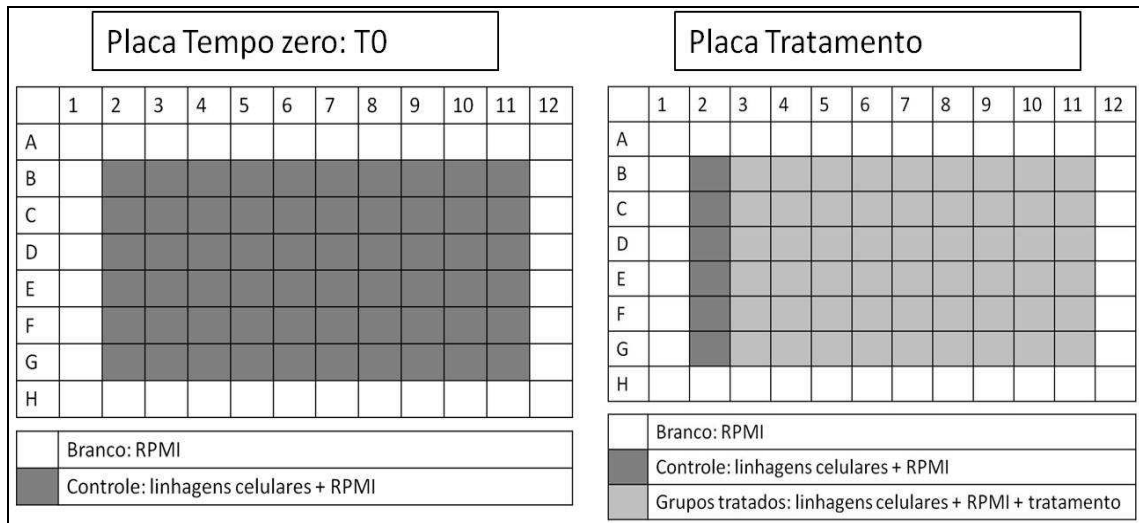
- TGI – inibição total crescimento
- IC50- inibição de crescimento 50%
- LC 50 - morte celular 50%.

4.4.7.2 Teste de citotoxicidade (ensaio com sulforrodamida B)

Inicialmente, cada amostra testada (EM, FDM, ACT e subfrações) foi dissolvido em DMSO (100mg/ml) para a obtenção da concentração máxima da dose testada (250µg/mL). As células controles foram expostas à equivalente exposição de DMSO (0,25% v/v, controle negativo).

Foram utilizadas duas microplacas de 96 poços, para cada linhagem celular, por ensaio. A placa tempo zero (T0) corresponde à da densidade óptica (DO) correspondente ao número inicial de células, a qual contém somente RPMI (branco) e linhagens celulares com RPMI (controle) e a placa de tratamento, a qual contém linhagens celulares com os extratos adicionados (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática das placas de 96 poços utilizadas para os ensaios de citotoxicidade



Fonte: (AMENI, 2015).

As linhagens celulares foram semeadas nas placas de 96 poços na densidade de 10.000, 15.000 ou 20.000 células/poço dependendo da linhagem celular (período T0), seguido por 48 horas de incubação em diferentes concentrações, variando entre: 250 – 25 - 2,5 - 0,25 – 0,025 e 0,0025µg/ml.

Finalizada a incubação de 48 horas, as células foram fixadas mediante a adição de 25µL de ácido tricloroacético (TCA 50%) e mantidas em refrigerador a 4°C durante 1 hora. Após, foi adicionado 25µL/poço de solução SBR (0,4% v/v em 1% ácido acético) e as placas mantidas em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após, foi eliminada a solução SBR mediante quatro lavagens com ácido acético a 1% com água corrente.

Uma vez o corante fixado, as células foram ressolubilizadas com 100µL/poço de solução tampão Tris Base 10mM (pH 10), sob agitação orbital (“Shaker”) com velocidade de 50rpm, à temperatura ambiente e durante um período de 5 minutos. A leitura da densidade óptica foi realizada com aparelho espectrofotômetro (BioTek’s, Winooski, USA; PowerWave XS Absorbance Microplate Reader) em comprimento de onda (λ) de 492nm.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett. Para dados não paramétricos e não homocedásticos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A existência de diferenças significativas entre dois grupos foi estabelecida pelo teste t-Student. Os dados foram expressos com média \pm desvio padrão (SD) ou mediana (mínimo - máximo) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

**DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL E
RESULTADOS**

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os experimentos realizados e os resultados obtidos.

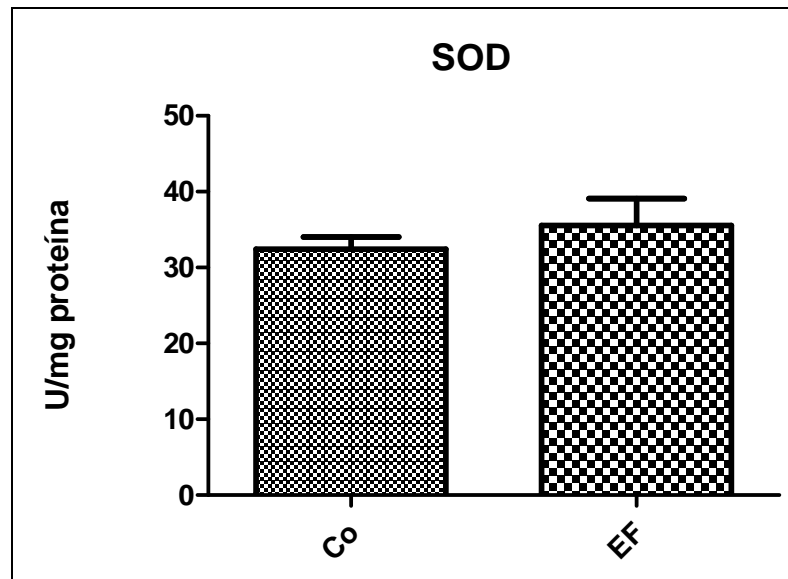
5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Foram utilizados 17 ratos machos *Wistar*, com idade de 60 dias (peso 200-250g), separados em dois grupos e tratados da seguinte forma: grupo controle (Co, n=5) – água e EF de *C. sylvestris* 240mg/kg (n=7), via oral por gavagem, por seis dias consecutivos. No 7º dia, após todos os animais serem submetidos à anestesia, realizou-se a perfusão do fígado *in situ* com KCL 1,15% até que o fígado se tornasse de cor caqui, a seguir os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e realizado procedimento de coleta e processamento das amostras do fígado conforme descrito no item 4.3.1., e, posteriormente, a dosagem das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathiona Reduzida (GHS) e Oxidada (GSSG) e a peroxidação lipídica conforme descrito nos itens 4.4.1.1, 4.4.1.2, 4.4.1.3, 4.3.1.4. A dosagem de proteínas do citosol foi realizada de acordo item 4.4.2.2.

5.1.1 Resultados

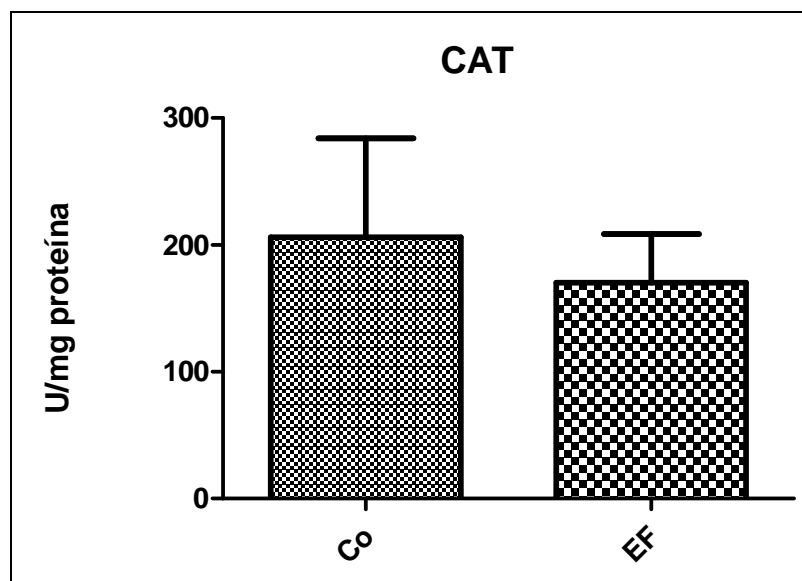
Tal como ilustrado nas figuras 10 e 11 abaixo, não foram observadas diferenças significantes na dosagem de enzimas antioxidantes SOD e CAT entre o grupo controle e aqueles tratados com EF 240mg/kg.

Figura 10 - Dosagem da atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD) no fígado de ratos tratados por seis dias, por via oral, através de gavagem, com água (grupo controle Co, n=5) e extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) (240mg/kg, n=7)



Legenda: SOD = Superóxido Dismutase
Nota: teste t -student.
Fonte: (AMENI, 2015).

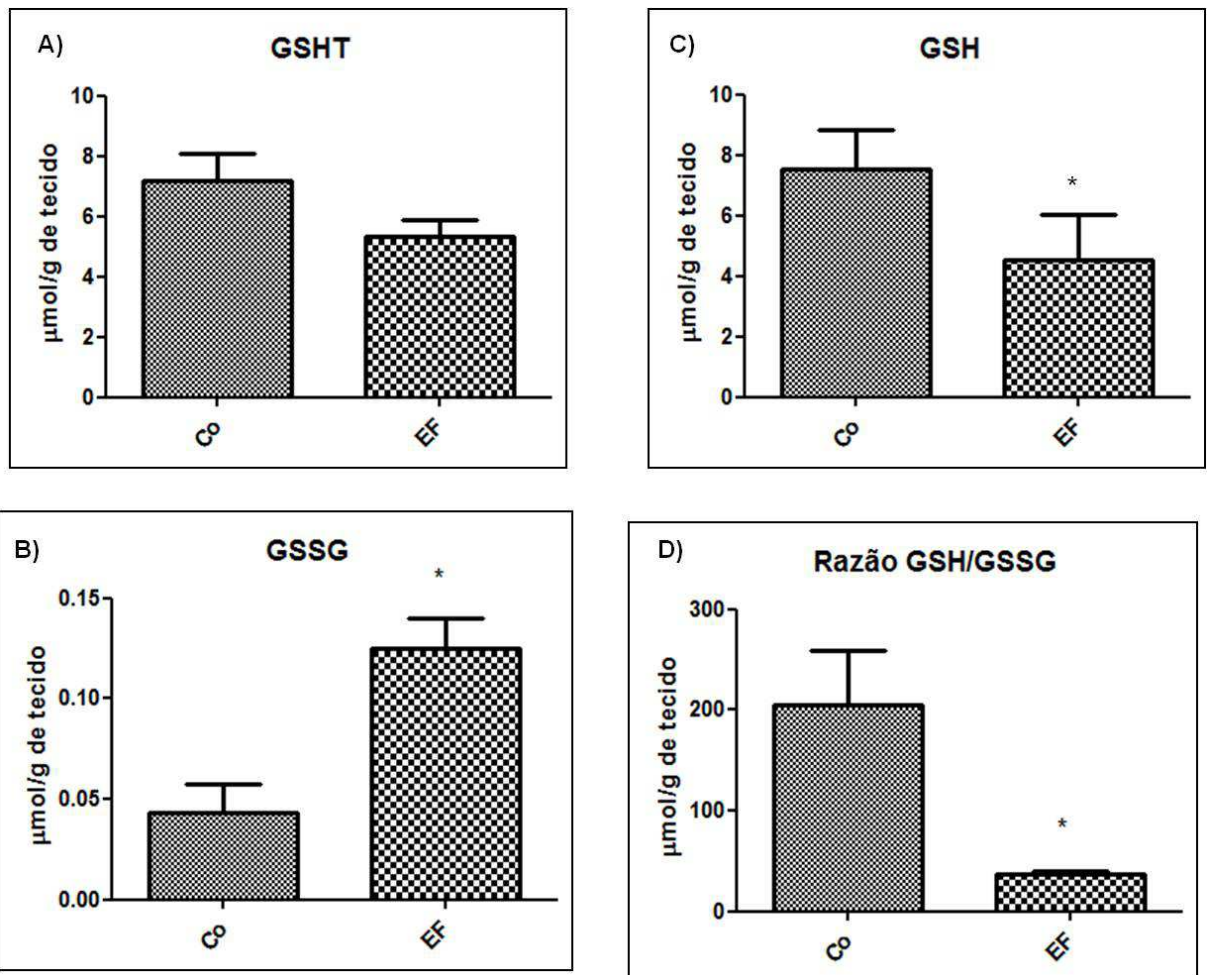
Figura 11 - Dosagem da atividade enzimática da catalase (CAT) no fígado de ratos tratados por seis dias, por via oral, através de gavagem, com extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) (240mg/kg, n=7) e grupo controle Co (água, n=5)



Legenda: CAT = Catalase
Nota: teste t - student.
Fonte: (AMENI, 2015).

Os níveis de GSHT também não apresentaram diferenças significantes entre os animais do grupo controle e aqueles tratados com EF 240mg/kg; porém, verificou-se diminuição nos níveis da GSH reduzida nos ratos provenientes do grupo EF quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0278$), sendo o inverso mostrado para os níveis de GSSG ($p = 0,0127$). A razão entre GSH/ GSSG mostrou diferenças estatísticas entre os dois grupos (p valor = 0,0014) (Figura 12).

Figura 12 - Dosagem da glutatona total (GSHT), glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e razão entre GSH/GSSG no fígado de ratos tratados por seis dias, por via oral, através de gavagem, com extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) (240mg/kg, n=7) e grupo controle Co (água, n=5)

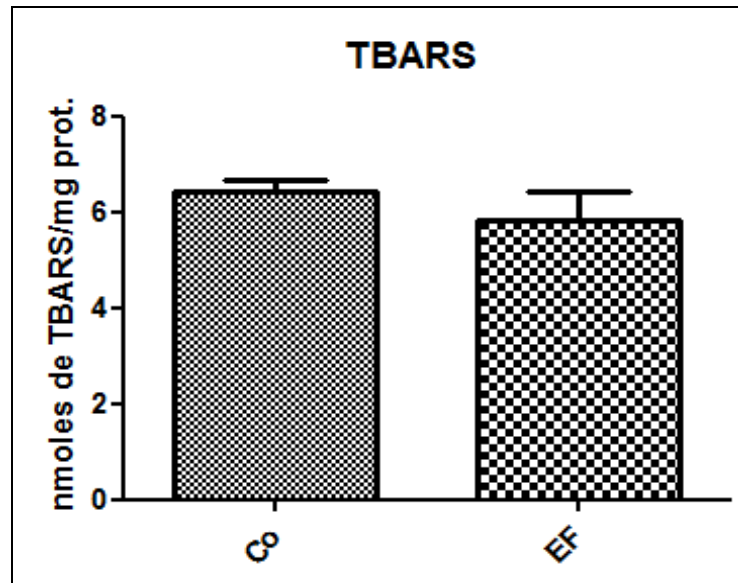


Legenda: GSHT = glutatona total ; GSH = glutatona reduzida ; GSSG = glutatona oxidada
 Nota: teste t-student
 Fonte: (AMENI, 2015).

A avaliação dos níveis de peroxidação lipídica não mostrou diferenças significantes entre os dados provenientes dos ratos, tratados ou não com o extrato, conforme ilustrado na figura 13; assim verifica-se não haver alteração nos níveis de

TBARS.

Figura 13 - Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), para avaliação da peroxidação lipídica no fígado de ratos tratados por seis dias, por via oral, através de gavagem, com extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) (240mg/kg, n=4) e grupo controle Co (água, n=3)



Legenda: TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Nota: teste t-student

Fonte: (AMENI, 2015).

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DO SISTEMA ENZIMÁTICO CITOCROMO P450 (CYP) APÓS ADMINISTRAÇÃO, VIA ORAL, DO EXTRATO FLUIDO DE *C. sylvestris* (EF)

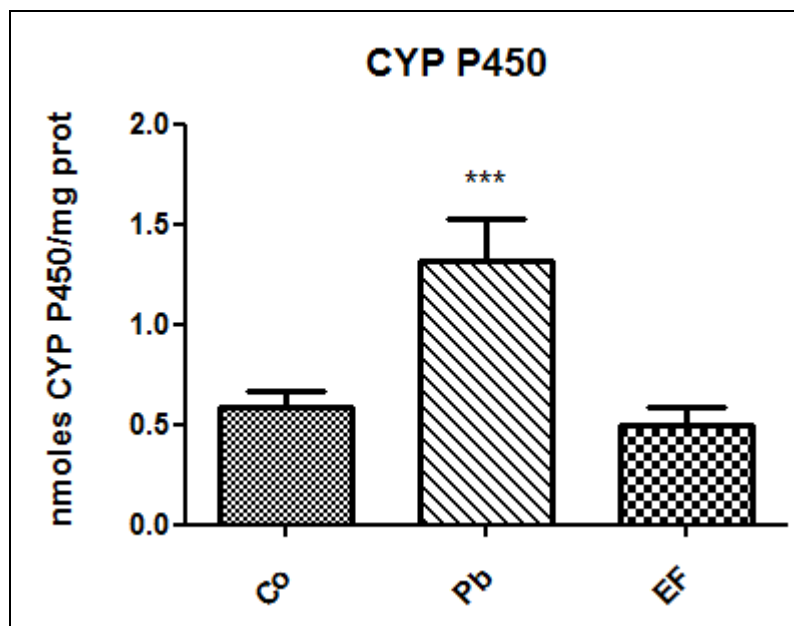
Foram utilizados 17 ratos machos Wistar, com idade de 60 dias (peso 200-250g), separados em três grupos tratados da seguinte forma: grupo controle (Co, n=5) – água, controle positivo e EF de *C. sylvestris* 240mg/kg (n=7), via oral por gavagem, por seis dias consecutivos. No 7º dia, após todos os animais serem submetidos à anestesia, realizou-se a perfusão do fígado *in situ* com KCL 1,15% até que o fígado se tornasse de cor caqui, a seguir os animais foram submetidos à eutanásia por decaptação e realizado procedimento de coleta e processamento das amostras do fígado conforme descrito no item 4.4.1. Após, foram obtidas as frações microsomais conforme descrito item 4.4.2.1. No dia da análise, as amostras obtidas foram descongeladas em temperatura ambiente e imediatamente foi realizada a

dosagem de proteínas conforme item 4.4.2.2 e a quantificação total de citocromos P450 na fração microsossomal hepática 4.4.2.3.

5.1.2 Resultado

A Figura 14 ilustra os dados relativos à determinação do conteúdo total de citocromo P450 da fração microsossomal hepática após administração oral do EF de *C. sylvestris*. Assim, não foi observada diferença significativa entre o conteúdo total de citocromo P450, quando comparou-se os dados provenientes dos animais do grupo controle e aqueles do grupo tratado com EF 240mg/kg. O fenobarbital, indutor enzimático, se mostrou efetivo como controle positivo para o experimento, apresentando acentuada indução da P450 em relação ao grupo controle e ao grupo tratado ($p < 0,0001$).

Figura 14 - Determinação do conteúdo total de citocromo P450 da fração microsossomal hepática provenientes de ratos tratados, durante seis dias, por via oral, através de gavagem, com água (Co, n=5), EF de *C. sylvestris* - 240mg/kg (n=7) e fenobarbital – controle positivo (Pb, n=5)



Legenda: CYP P450 = Citocromo P450

Nota: $p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnet, em relação ao controle. Co vs Pb ($p < 0,0001$ ***)

Fonte: (AMENI, 2015).

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA DO EXTRATO FLUIDO DE *C. sylvestris* (EF)

A avaliação da atividade antiúlcera do EF foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no item 4.4.3. Para tal, foram utilizados 30 ratos machos *Wistar*, com idade de 60 dias (peso 200-250g), separados em cinco grupos (n=6), os quais receberam, por via oral através de gavagem os seguintes tratamentos: água - grupo controle (Co), 30mg/kg de lansoprazol –controle positivo (Cp) e 3 doses do EF de *C. sylvestris* 60, 120 e 240mg/kg.

5.3.1 Resultados

Os resultados referentes à área relativa lesão, área de proteção e de áreas ulceradas do estômago de ratos submetidos aos tratamentos com as doses 60, 120 e 240mg/kg de EF da planta, pelo modelo de indução por etanol acidificado, estão descritos na tabela 1 e na figura 15.

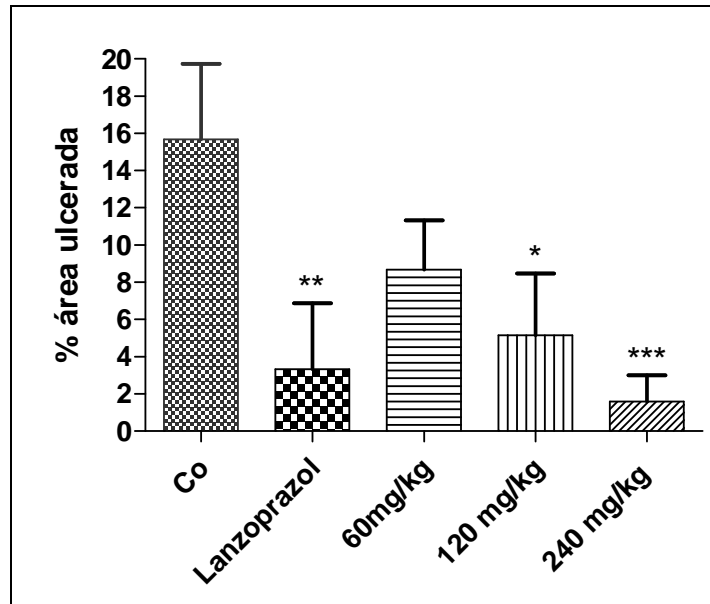
No modelo de indução de úlcera gástrica por etanol acidificado, o EF de *C. sylvestris* apresentou atividade dose-dependente, uma vez que, a dose de 240 mg/kg mostrou diferenças significantes ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle, na área ulcerada, mostrando-se assim, mais eficaz do que o fármaco empregado como referência Lansoprazol[®].

Tabela 1 - Efeito da administração, por via oral, através de gavagem, em ratos *Wistar*, das diferentes doses (60, 120 e 240 mg/kg) do extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) e do Lanzoprazol (Cp) (30mg/kg) pelo modelo de indução por etanol acidificado. Foram empregados 5 animais por grupo (n=6). Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão

Tratamento	Área relativa lesão (mm²)	Proteção (%)
Co	15,87 \pm 4,12	-
Cp 30mg/kg	3,17 \pm 3,37	80%
EF 60mg/kg	8,85 \pm 2,80	45%
EF 120mg/kg	4,94 \pm 3,53	69%
EF 240mg/kg	1,56 \pm 1,47	90%

Nota: $p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnet, em relação ao controle.
Fonte: (AMENI, 2015).

Figura 15 - Área ulcerada (%) dos estômagos após administração, por via oral, através de gavagem, em ratos *Wistar*, das diferentes doses (60, 120 e 240 mg/kg) do extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) e do Lanzoprazol (Cp) (30mg/kg) pelo modelo de indução por etanol acidificado. Foram empregados 5 animais por grupo (n=6)



Nota: $p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnet, em relação ao controle. Co vs 120 mg/kg ($P < 0.05$ *), Co vs lanzoprazol ($P < 0.01$ **), Co vs 240 mg/kg ($P < 0.001$ ***)
 Fonte: (AMENI, 2015).

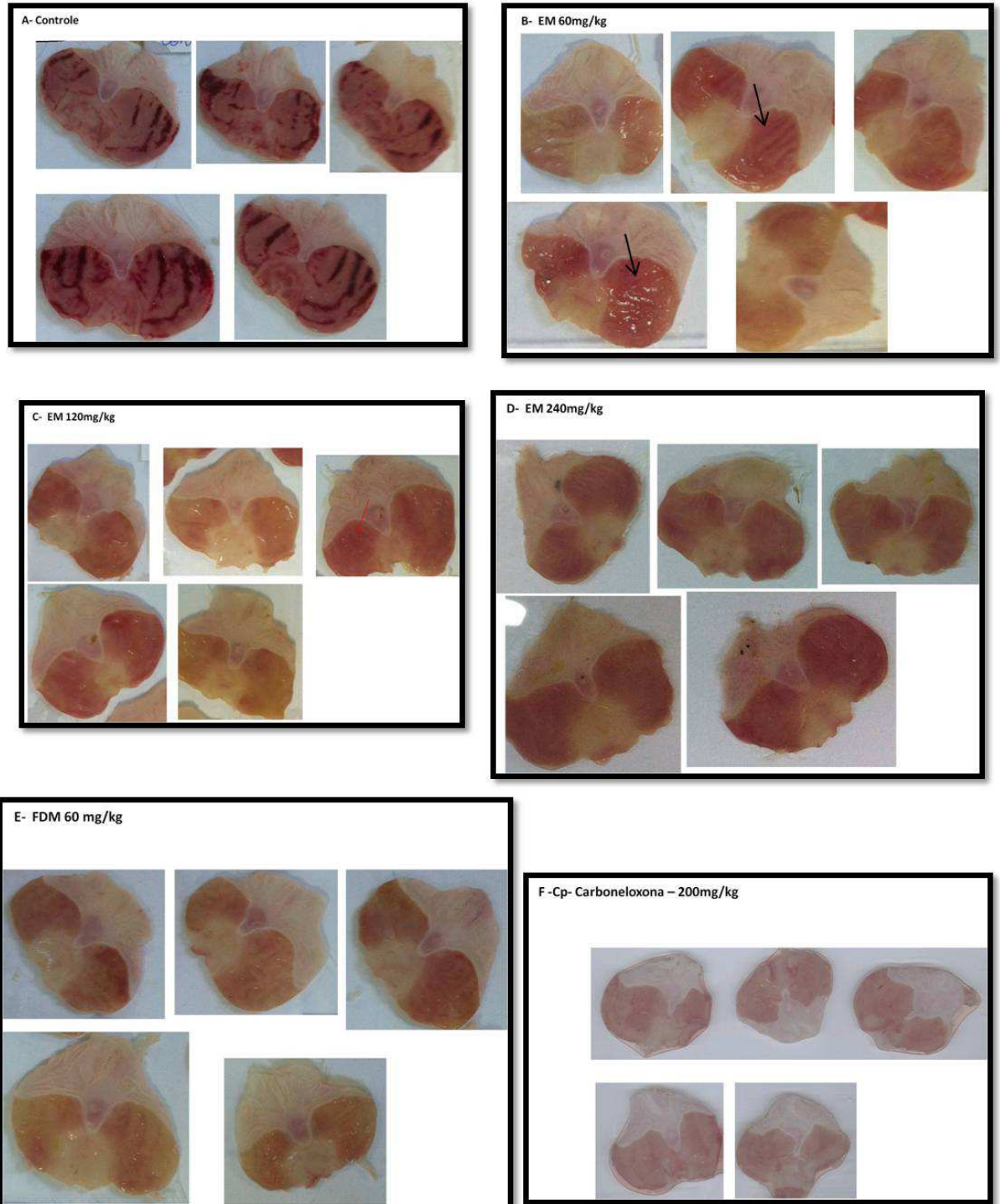
5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIÚLCERA DO EXTRATO METANÓLICO (EM) E FRAÇÃO DICLOROMETANO (FDM) DE *C. sylvestris*

A avaliação da atividade antiúlcera do extrato metanólico (EM) e fração diclorometano (FDM) da *C. sylvestris*, foi realizada de acordo com os procedimentos descritos no item 4.4.3. Foram utilizados 30 ratos machos *Wistar*, com 60 dias (peso 200-250g), separados em seis grupos iguais (n=5), os quais receberam, por via oral através de gavagem, os seguintes tratamentos: água - grupo controle (Co), 200mg/kg de carbonexolona – controle positivo (Cp), 3 doses do EF de *C. sylvestris* 60, 120 e 240mg/kg e 60mg/kg de FDM.

5.4.1 Resultados

Os ratos tratados previamente à administração do agente ulcerogênico (etanol acidificado) com as três diferentes doses do EM (60, 120 e 240mg/kg) e FDM (60mg/kg), mostraram 100% de proteção. Entretanto, como pode ser observado na figura 16, a atividade citoprotetora do EM é dose-dependente; neste sentido, verifica-se que o aumento das áreas edemaciadas no estômago dos ratos é inversamente proporcional à dose de EM empregada.

Figura 16 - Fotos dos estômagos após administração, por via oral, através de gavagem, em ratos *Wistar*: (A) água, (Cp) carbonexolona 200mg/kg, 3 doses do extrato metanólico de *C. sylvestris* (EM) (B) 60, (C) 120 e (D) 240mg/kg e (E) fração diclorometano (FDM) 60mg/kg



Legenda: EM= extrato metanólico de *C. sylvestris*, FDM= fração diclorometano
 Fonte: (AMENI, 2015).

5.4 EXPERIMENTO 5: ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO FLUIDO DE *C. sylvestris* (EF)

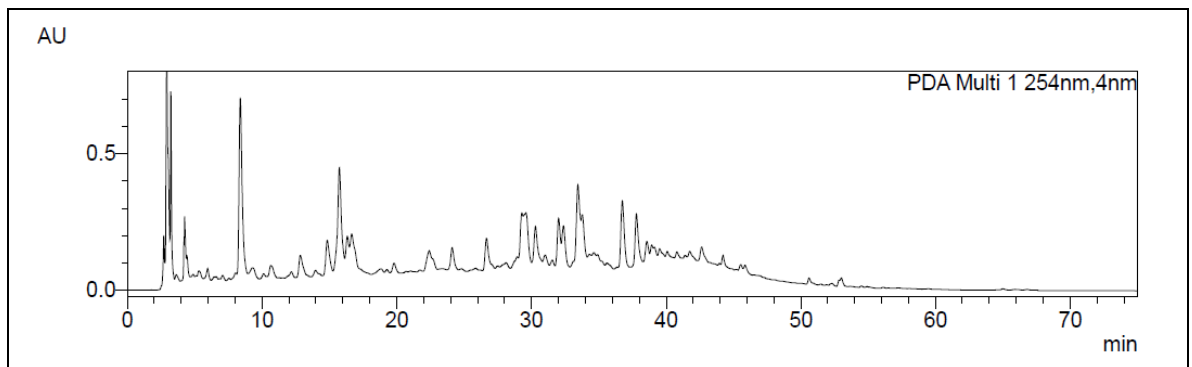
Inicialmente, o EF procurou-se caracterizar os compostos químicos presentes no extrato fluido da planta (descrito no item 4.4.5), empregando-se para tal o HPLC–DAD-UV e HPLC/ MS-MS, conforme descrito no item 4.4.5.1. A seguir, e objetivando-se obter-se mais dados relativos à composição do extrato, foi realizado o fracionamento químico do EF, conforme procedimento delineado no item 4.4.5.2. Assim, foram obtidas duas frações deste EF, a fração acetato etila (FAE) e a fração aquosa (FA). Procedeu-se à cromatografia da FAE em coluna aberta de sílica gel, monitoradas por CCD de onde foram obtidas 20 subfrações, conforme a metodologia descrita no item 4.5.1.3. As subfrações 5+6 e 7+8 mostraram manchas características dos compostos de interesse da planta, para continuação da análise após CCD. Assim, estas subfrações foram submetidas à cromatografia por coluna Sephadex LH-20, obtendo-se 80 subfrações de cada uma, sendo as subfrações de interesse, agrupadas, por análise CCD, SF 56-66 e SF 35-50, e submetidas a outra purificação através de cromatografia de camada preparativa para posterior análise RMN (itens 4.4.5.4, 4.4.5.5 e 4.4.5.6).

5.4.1 Resultados

O perfil cromatográfico do EF por HPLC é apresentado na figura 17, foram observados 17 picos majoritários nos tempos de retenção (T_r) entre 4 e 40 minutos, e estes estão descritos na tabela 2 com os respectivos T_r e os comprimentos de ondas de absorção ultravioleta visível ($\lambda = UV \text{ máx}$) em detecção 254nm.

A tabela 3 mostra os compostos identificados no EF, obtidos na análise do HPLC/ESI MS-MS. A identificação dos compostos foram feitas pelo padrão de fragmentação e massa molecular.

Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato fluido de *C. sylvestris* (EF) obtido por HPLC, fase móvel acetonitrila e água + ácido fórmico 1%



Legenda: Cromatograma obtido por HPLC, em coluna RP18- 5 μ m, 250 - 4,5mm, volume injeção 20 μ L, mantida a temperatura de 25°C. A fase móvel utilizada foi acetonitrila (grau HPLC) (C) e água + ácido fórmico 1% (D) com vazão constante de 1mL/min. O gradiente de eluição iniciou-se com 10% C e 90% D até 30 minutos. De 30 a 55 minutos 25% C e 75%D e de 55 a 75 minutos 60%C e 40%D, totalizando 75 minutos.

Fonte: (AMENI, 2015)

Tabela 2 - Picos detectados na análise do EF *C. sylvestris*, por HPLC, com seus respectivos tempos de retenção e os comprimentos de ondas de absorção ultravioleta visível ($\lambda = UV$ máx) em detecção 254nm

Picos	Tempo retenção (Tr)	Absorção na região do UV (λmáx)
1	4.41	276
2	8.41	330, 300sh, 240
3	12.80	314
4	14.83	327, 290sh, 240
5	15.76	325, 294sh, 240
6	16.35	329sh, 283sh, 240
7	16.65	320sh, 283sh, 240
8	22.52	329sh, 281sh, 240
9	24.14	336, 285sh, 268, 239
10	26.68	344, 286, 266, 240
11	30.26	322, 285, 241
12	32.03	344, 323sh, 287, 264, 241
13	32.42	345, 322sh, 287, 266, 240
14	33.45	353, 267sh, 255
15	33.74	351, 286, 267sh, 255
16	36.72	346, 323sh, 288, 266, 242
17	37.80	350, 287, 268sh, 252

Fonte: (AMENI, 2015).

Tabela 3 - Análise do EF *C.sylvestris* por HPLC/ESI MS-MS

Tempo retenção (Tr)	M- H	MS/MS	Tentativa de identificação
11.6-11.9	285	152 (-132)	Gallic acid pentoside
	757	739, 605, 577, 467, 287	288 dihexose rhamnose
15.3	353	191	Caffeoylquinic acid
14.83	469	289 (-180)	289: catechin?
	707	353 (2M-1)	Caffeoylquinic acid
	429	429-162=267 -88=179	hexoside
	581	-162=419, -186=233	hexoside
	523	-162=361	Lignan? 362 hexoside
22.52	755	591, 489, 301	Q-dirhamnoside hexoside
24.79	739	593, 575, 473, 393, 285	K-dirhamnose hexose
27- 28.4	595	301	Q-hexoside pentoside
27.4	609	301	Rutin
	503	-132 = 371 - 214 = 157	pentoside
27.8	<u>593</u>	473, 429, 285, 257	K-rutinoside K-hexose-rha
	463	301	Q-hexoside
	<u>593</u>	-48 = 545, -164:429 - 144: 284(5)	K-rhamnoside hexoside
29.58	<u>593</u>	447, 285	K- hexo-rhamoside
	579	530, 301	Q-rham-pentose
30.30	<u>623</u>	315	QMethyl ether hexo-rhamn
31.01	<u>593</u>	471, 327, 285	K- derivative
	505	-42=463 -162= 301	Q-acetyl hexoside
	<u>623</u>	315	QMethyl ether hexo-rhamn
	447	285	K-hexoside
	621	-144=477 - 162=315	QMethyl ether hexoside der
	315	284	Q methyl ether

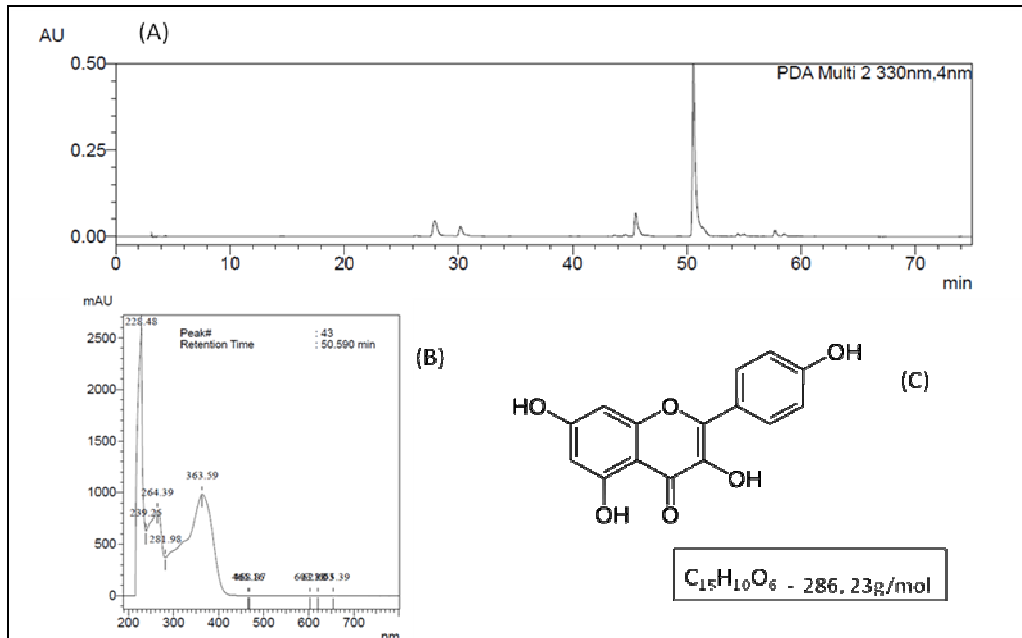
Fonte: (AMENI, 2015).

Da frações 5+6 cromatografada por Sephadex LH-20, foram obtidas as subfrações 56/66 na qual, após a purificação por camada delgada preparativa, foi identificado, por HPLC/MS-MS e RMN, o composto químico *Kaempferol* ($\lambda_{\text{máx}}$: 364, 325sh, 292sh e 265 nm, $T_r = 50,59$ min, $[M+H]^+ = 285m/z$, $C_{15}H_{10}O_6 = 286,23g/mol$) (Figura 18).

Da frações 7+8 cromatografada por Sephadex LH-20, foram obtidas as subfrações 35/50 na qual, após a purificação por camada delgada preparativa, foi identificado, por HPLC/MS-MS e RMN, o composto químico *Quercetina* ($\lambda_{\text{máx}}$: 368, 284, 255, 239sh, 226 nm, $T_r = 46$ min, $[M+H]^+ = 302 m/z$, $C_{15}H_{10}O_7 = 302,23 g/mol$) (Figura 19).

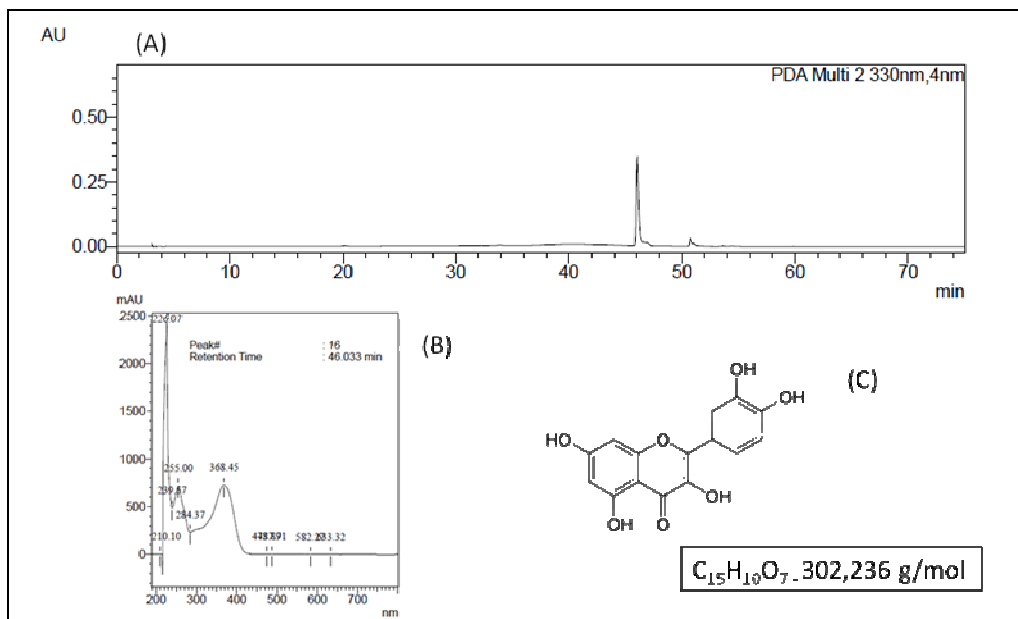
O monitoramento realizado por cromatografia em camada delgada, utilizando sistema acetato etila: diclorometano: acetona (4,5: 4,5: 1) e reveladas com anisaldeído, está exemplificado na figura 20.

Figura 18 - A – Cromatograma HPLC/UV da subfração 55/66, espectro ultravioleta UV $\lambda_{\text{máx}}$ (λ): 364, 325sh, 292sh e 265 nm; C – estrutura e peso molecular do *Kaempferol*.



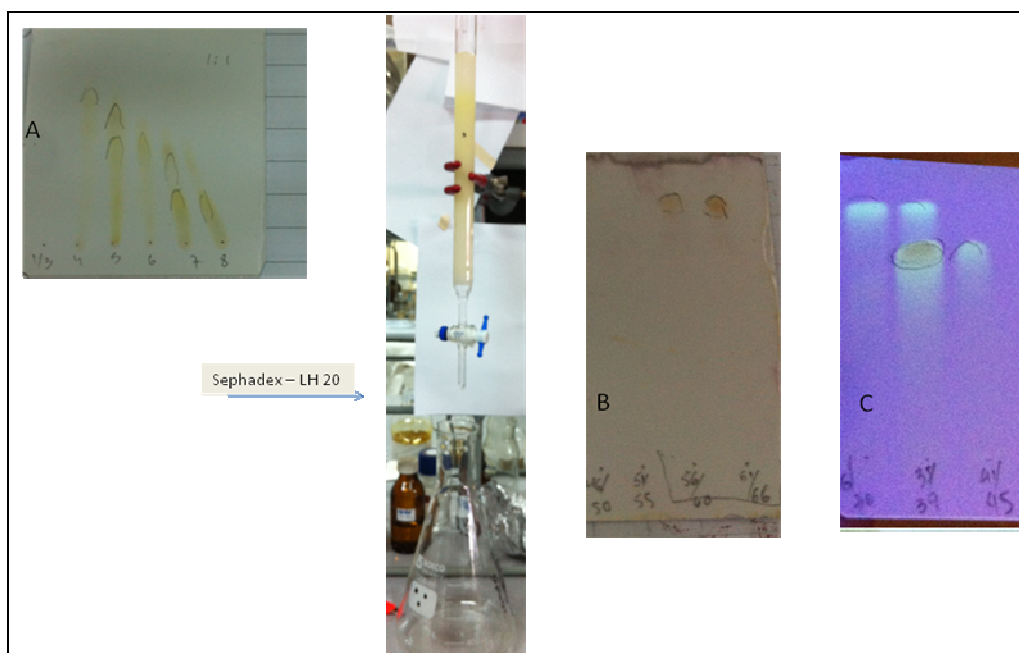
Fonte: (AMENI, 2015).

Figura 19 - A – Cromatograma HPLC/UV da subfração 30/50, espectro ultravioleta UV_{máx} (λ): 368, 284, 255, 239sh, 226nm; C – estrutura e peso molecular da *Quercetina*



Fonte: (AMENI, 2015).

Figura 20 - Desenho esquemático do monitoramento de EF - frações 5+6 e 7+8. A) Cromatografia de camada delgada (CCD) (EP:EtoAc, 1:1), seguido por separação por Sephadex LH20, (B) CCD das frações 56-66 derivadas da frações 5+6 e (C) CCD frações 35-45 derivadas da frações 7+8



Fonte: (AMENI, 2015).

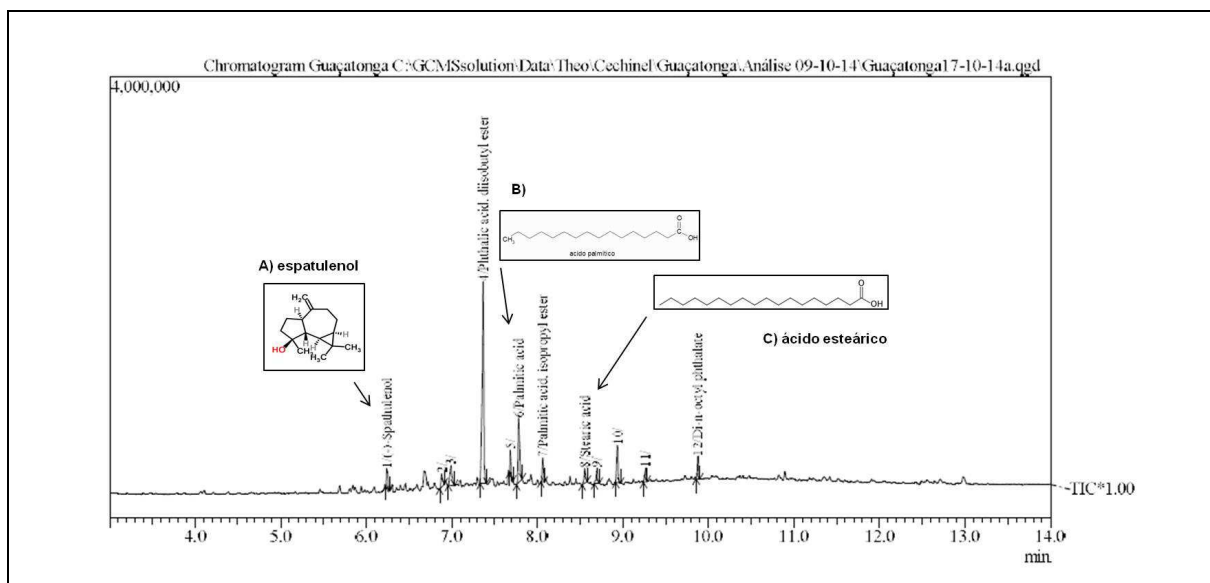
5.5 EXPERIMENTO 6: ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *C. sylvestris* (EM)

As folhas de *C. sylvestris* foram maceradas com metanol conforme descrito no item 4.5.2, após foi realizada partição líquido-líquido (item 4.5.2.1) obtendo-se três frações: diclorometano (FDM), acetato de etila (ACT) e butanol (BUT). A fração FDM foi cromatografada em coluna de sílica gel obtendo-se 35 subfrações, das quais as subfrações 14-20 (SF A) foram escolhidas após análise por CCD para continuar o fracionamento. A SF A foi novamente cromatografada em coluna sílica gel obtendo-se 3 subfrações X, Y e W que foram submetidas a coluna flash, afim de obter compostos mais purificados. Da análise por CCD reunimos as frações com padrões similares e novamente foi realizada cromatografia com coluna flash. O procedimento completo está descrito no item 4.4.6.2 Por fim, foram obtidos 2 subfrações purificadas SF 11-13 a qual foi submetida a análise por CG/MS (item 4.4.6.3) e H 17-19 a qual foi submetida a análise por RMN para identificação dos compostos químicos.

5.5.1 Resultados

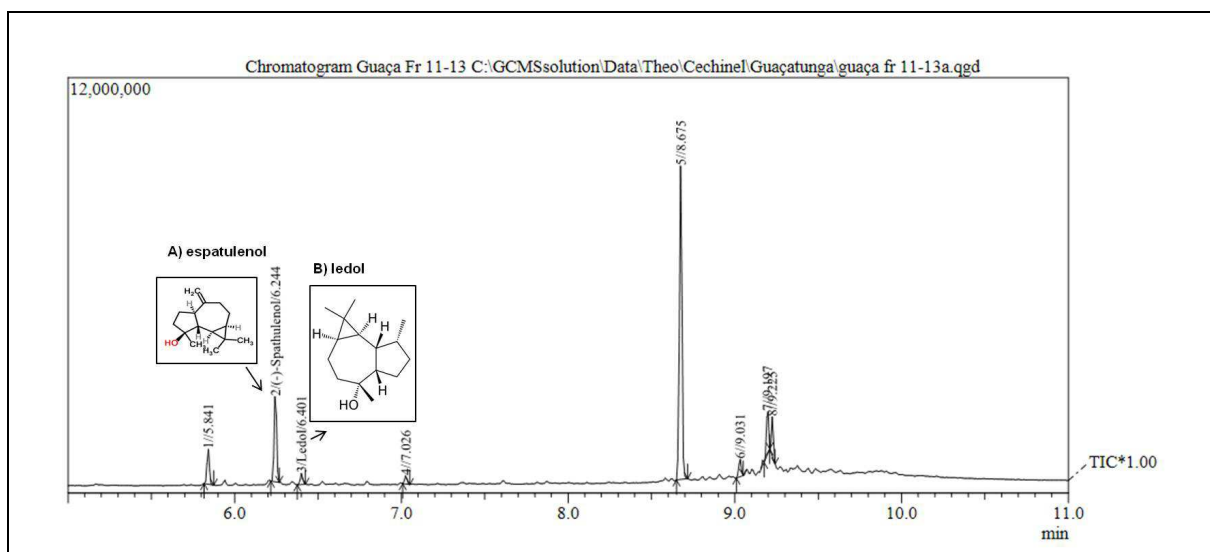
A análise da fração FDM por CG/MS identificou os compostos espatulenol (4%), ácido palmítico (13,5%), ácido palmítico isopropil éster (5%) e ácido esteárico (3%), por comparação de base de dados (Figura 21). Este composto, espatulenol, também foi identificado na análise de SF 11-13 por CG/MS junto com o ledol (15% e 2% respectivamente) (Figura 22). O composto majoritário mostrado na análise por CCD foi identificado por RMN e confirmou a presença do espatulenol (Figura 23).

Figura 21 - Cromatograma obtido por CG/MS do EF de *C. sylvestris*. A) espatulenol, B) ácido palmítico e C) ácido esteárico



Fonte: (AMENI, 2015).

Figura 22 - Cromatograma obtido por CG/MS da SF 11-13. A) espatulenol, B) ledol



Fonte: (AMENI, 2015).

Figura 23 - Cromatografia em camada delgada (CCD) da fração FDM e da subfração H 17-19, sistema solventes hexano: acetona (9:2), mostrando o composto majoritário identificado - espatulenol



Legenda: FDM= Fração diclorometano, H17-19= subfração proveniente do FDM
 Fonte: (AMENI, 2015).

5.6 EXPERIMENTO 7: FRACIONAMENTO BIOGUIADO DO EXTRATO METANÓLICO (EM) E FRAÇÕES FDM E ACT E AVALIAÇÃO DE CITOXICIDADE

Para o experimento foram testados: extrato metanólico de *C. sylvestris* (EM) e as frações diclorometano (FDM) e acetato de etila (ACT) obtidos de acordo com o item 4.4.7 Foram testadas 6 linhagens de células cancerosas: HBL-100 (carcinoma de mama humano), T-47D (tumor de mama humano), WiDr (adenocarcinoma de cólon humano), HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano), A549 (carcinoma epitelial de pulmão humano) e SW1573 (carcinoma alveolar de pulmão humano), as quais foram cultivadas, replicadas e semeadas seguindo o procedimento descrito no item 4.4.7.1.

Todos os testes foram realizados da seguinte maneira: após o preparo das células : HBL-100 (carcinoma de mama humano), T-47D (tumor de mama humano), WiDr (adenocarcinoma de cólon humano), HeLa (carcinoma epitelial de cérvix humano), A549 (carcinoma epitelial de pulmão humano) e SW1573 (carcinoma alveolar de pulmão humano), conforme descrito em 4.3.5.2, determinou-se a citotoxicidade dos índices de IC50 (concentração inibitória 50%), TGI (inibição total de crescimento) e LC50 (dose letal 50%) de acordo com o item 4.3.5.1.

Os experimentos foram procedidos de forma bioguiada, de forma que, a escolha da amostra (EM, FDM, ACT e subfrações) a ser utilizada e o seu posterior fracionamento químico foi guiado pela verificação da atividade citotóxica (ensaio com sulforrodamina B) a partir da determinação da concentração inibitória de crescimento celular 50% (IC50). Desta forma, as frações e subfrações testadas foram aquelas nas quais se observou a maior atividade citotóxica e antiproliferativa, e também a quantidade de amostra adquirida no fracionamento químico.

5.6.1 Resultados

Na avaliação da atividade citotóxica do EM de *C. sylvestris*, e das frações FDM e ACT sobre a linhagens tumorais celulares observou-se que a fração FDM apresentou melhor atividade citotóxica para todas linhagens celulares em relação ao EM e ACT (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade citotóxica do extrato metanólico (EM) de *C. sylvestris* e das frações diclorometano (FDM) e acetato de etila (ACT) sobre as linhagens celulares A549, HBL-100, SW1573, HeLa, T-47D e WiDr, mostrando os valores de IC50

Frações	IC 50 (µg/ml)					
	A549	HBL-100	SW1573	HeLa	T-47D	WiDr
EM	5,0	4,5	4,4	2,9	2,6	3,5
FDM	4,0	2,9	1,9	0,8	0,9	1,8
ACT	45	30	31	9,0	36	42

O extrato FDM foi então cromatografado em sílica gel (fina), utilizando uma coluna de 74,5 cm comprimento e 2,5cm diâmetro, carregada com 100g sílica gel (32,5cm), utilizando-se sistema solvente hexano e acetato de etila (HE:EtoAc) da seguinte maneira: 15g de FDM foi injetado na coluna com gradiente de eluição variando a cada 1 litro na proporção do solvente (100:0, 95:5, 90:10.....até 0:100) e após acetato etila e metanol (EtoAc: MeOH - 80:20 e 0:100), obtendo-se 14 frações (F1-F14). Essas frações foram novamente submetidas a avaliação de citotoxicidade.

A tabela 5 mostra que dentre as frações obtidas no fracionamento do FDM F-1 a F-14, F7e F8 foram aquelas que apresentaram maior atividade citotóxica com IC50 <2,5µg/ml sendo, portanto, submetidas a novo fracionamento na continuação do estudo bioguiado.

Tabela 5 - Atividade citotóxica das frações obtidas da fração diclorometano (FDM) sobre a linhagens celulares A549, HBL-100, SW1573, HeLa, T-47D, mostrando os valores de IC50

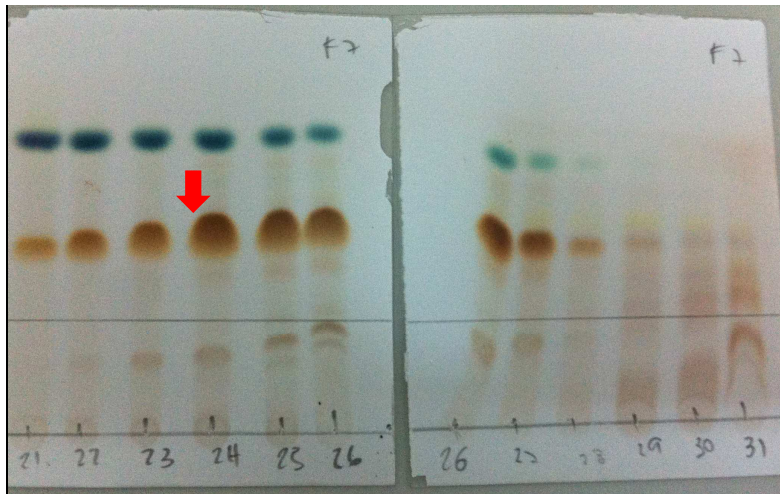
Frações	IC 50 (µg/ml)					
	A549	HBL-100	SW1573	HeLa	T-47D	WiDr
FDM						
F1	8	18	9	8	15	NT
F2	30	13	9	8	31	NT
F3	19	9	7	6	21	NT
F4	17	11	8	8	14	NT
F5	14	8	7	6	11	NT
F6	3	3	<2,5	<2,5	<2,5	NT
F7	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	NT
F8	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	NT
F9	3	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	NT
F10	25	19	9	8	12	NT
F11	16	10	6	5	10	NT
F12	21	8	5	5	9	NT
F13	28	12	7	7	14	NT
F14	83	13	52	56	68	NT

* Frações testadas apenas em 3 doses: 250, 25 e 2,5µg/ml. NT = não testado

As frações F7(926mg) e F8 (1,61mg) foram então cromatografadas em coluna Sephadex LH20, utilizando como fase móvel os solventes clorofórmio e metanol, na proporção 1:1, utilizando método isocrático em volume de 1,5L. Da fração F7, foram obtidas 37 subfrações, as quais foram monitoradas por CCD com sistema de solventes diclorometano e acetona (9:1). A partir desta análise, as frações semelhantes foram agrupadas em *pools*: 1-20, 21-23, 24-28, 29-37. O mesmo foi realizado com a F8 (35 subfrações), obtendo-se os *pools*: 1-11, 12-15, 16-19, 20-23, 24-27, 28-35.

No *pool* correspondente a fração F7-24-28, após análise por CCD, foi observado um composto majoritário, conforme ilustra a figura 24.

Figura 24 - Cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sistema de solventes diclorometano e acetona (9:1), mostrando o composto majoritário presentes no *pool* contendo as subfrações F7-24-28.



Fonte: (AMENI, 2015).

Os *pools* referentes ao fracionamento das frações F7 e F8, mencionados anteriormente, foram monitorados por CCD e realizou-se a avaliação de citotoxicidade com aqueles que se mostraram interessantes para análise devido ao padrão cromatográfico (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade citotóxica das subfrações, obtidas das frações F7 e F8 da fração diclorometano (FDM), sobre a linhagens celulares A549, HBL-100, SW1573, HeLa, T-47D, mostrando os valores de IC50

Subfrações	IC 50 (µg/ml)					
	A549	HBL-100	SW1573	HeLa	T-47D	WiDr
F7 21-23	2,34	0,72	0,55	0,83	0,22	0,36
F7 24-28	1,26	0,30	0,22	0,63	0,09	0,13
F7 29-37	5,45	5,33	7,39	6,04	8,57	8,66
F8 12-15	2,29	0,56	0,40	0,73	0,12	0,15
F8 16-19	0,75	0,15	0,13	0,54	0,07	0,05
F8 20-23	0,72	0,11	0,19	0,43	0,02	0,03
F8 24-27	1,64	0,03	0,18	0,40	0,01	0,02

A análise geral de todos os resultados obtidos na avaliação de citotoxicidade mostrou que, independente das subfrações testadas, a linhagem celular T-47D (carcinoma de mama humano), foi a mais suscetível ao tratamento e a linhagem celular A549 (adenoma epitelial de pulmão humano) a menos suscetível (Tabela 6). A subfração F 29-37 não inibiu o crescimento celular de nenhuma das linhagens testadas (Tabela 6).

O *pool* F7-24-28, o qual apresentou bom índice IC 50 e apresentava-se com quantidade suficiente para novo fracionamento, foi então novamente submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como fase móvel o sistema clorofórmio e acetona (100:0 até 0:100), gerando três subfrações: G1, G2, G3. A subfração G2 foi submetida a cromatografia preparativa de força centrífuga (Cromatotron), empregando-se o sistema solvente clorofórmio e acetona em diferentes proporções (95:5; 94:6; 92:8; 90:10), de onde se obteve 50 subfrações. O *pool* G2-17-24 foi cromatografado em camada delgada preparativa utilizando sistema de solventes hexano e acetona (7:3) obtendo-se três subfrações: H1, H2, H3. As subfrações G2, G2-17-24 e H1 também foram submetidas ao teste de citotoxicidade e os resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Atividade citotóxica das subfrações, obtidas das subfrações G2, G2-17-24 e H1, sobre a linhagens tumorais celulares A549, HBL-100, SW1573, HeLa, T-47D, mostrando os valores de IC50

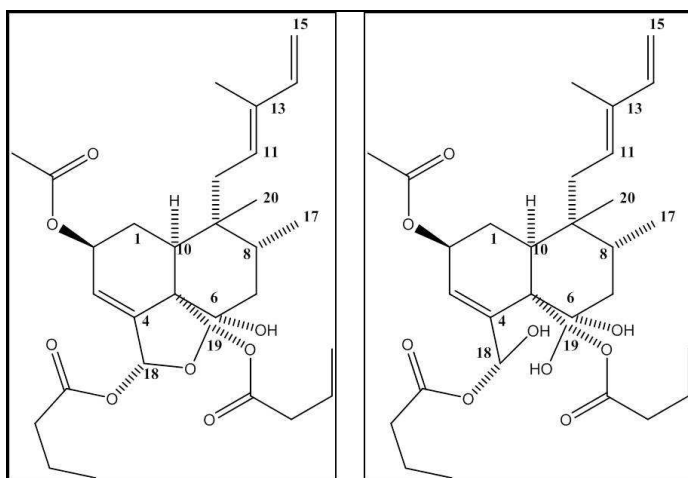
Subfrações	IC 50 (µg/ml)					
	A549	HBL-100	SW1573	HeLa	T-47D	WiDr
G2	1,39	0,38	0,27	0,54	0,05	0,01
G2 17-24	6,04	0,69	0,60	0,84	0,21	0,01
H1*	3,95	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5

Nota: * subfração testada apenas em 3 doses: 250, 25 e 2,5µg/ml.

A análise da tabela 7 mostra que as células A549 foram aquelas que apresentaram menor susceptibilidade ao tratamento, observando o mesmo resultado dos testes anteriores com as subfrações derivadas de F7 e F8, enquanto que as células WiDr foram as mais suscetíveis.

De G2-17-24 foi realizada análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H a fim de identificar o composto majoritário encontrado durante o monitoramento por CCD. De acordo com os dados espectroscópicos de RMN e comparação com dados de literatura (OBERLIES et al., 2002) é possível afirmar que a substância em questão trata-se de um diterpeno clerodânico (estrutura aberta). A subfração H1, foi submetida a cromatografia em camada preparativa obtendo-se a estrutura fechada do diterpeno clerodânico (Figura 25).

Figura 25 - Estruturas proposta de diterpeno clerodânico através da análise por ressonância magnética da subfração G2-17-24. A) estrutura aberta e B) estrutura fechada



Fonte: (AMENI,2015).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Em estudos prévios, na Dissertação de Mestrado (AMENI, 2011) avaliou-se avaliamos a toxicidade pré-clínica da administração oral do extrato fluido de *C. sylvestris*. Nesse estudo, verificamos que o extrato da planta não causou efeitos tóxicos, quando administrado em dose única de 2000mg/kg, bem como quando os ratos foram submetidos à administração em doses repetidas, por 28 e 90 dias do extrato da planta (60,120 e 240mg/kg), empregando-se o protocolo de avaliação de toxicidade proposto pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 1998, 2008).

Desta maneira, na presente pesquisa, seguiu-se investigando os possíveis efeitos tóxicos, da administração oral do extrato fluido de *C. sylvestris* na função hepática por meio da avaliação dos possíveis efeitos no estresse oxidativo hepático (avaliação do sistema antioxidante) e na indução ou inibição do complexo enzimático P450. A escolha deste protocolo se deve ao fato de que já está completamente estabelecido que o fígado desempenha papel primordial, particularmente na biotransformação de pró-fármacos, tornando-os biodisponíveis e, portanto, mais ou menos eficientes, e, também, na eliminação de metabólitos, que podem ser tóxicos ao organismo (PARKINSON, 2001).

Durante o processo de biotransformação hepática pode haver a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) como óxido nítrico (NO^{\bullet}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}) e uma forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que são resultantes do metabolismo de oxigênio, fundamental em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, que são responsáveis por manter a sobrevivência e a homeostase celular (BARBOSA et al., 2010). O desequilíbrio entre a formação e a remoção de EROs no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, ou seja, alterações no sistema de defesa antioxidante, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, processo esse conhecido como estresse oxidativo, que pode culminar na morte celular (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Para a análise dos efeitos do EF de *C. sylvestris* no estresse oxidativo, foram dosadas as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), as quais

participam do sistema de defesa antioxidante enzimático, agindo por meio de mecanismo de prevenção, impedindo ou controlando a formação de EROs (KORRAPATI; MEHENDALE, 2005). A SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^{\bullet}) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2); por outro lado, a CAT atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e água (H_2O). Desta forma, estas enzimas evitam o acúmulo O_2^{\bullet} e H_2O_2 , para que não ocorra a produção de radical hidroxil (OH^{\bullet}), que é um poderoso agente oxidante que pode reagir com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas na célula, incluindo DNA, proteínas, lipídios, aminoácidos, açúcares e metais (BARBOSA et al., 2010). O OH^{\bullet} ao reagir com ácidos graxos presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001)

Neste estudo, verificou-se que a administração do EF (240mg/kg) por seis dias consecutivos não promoveu alteração do sistema de defesa antioxidante hepático, tanto em relação à SOD quanto à CAT. Além disso, não houve alteração nos resultados do potencial peroxidativo hepático, uma vez que, que não foi observada diferença entre os valores de TBARS obtidos neste parâmetro nos animais provenientes do grupo controle e aqueles de animais que receberam tratamento com EF da *C. sylvestris*. Desta forma, pode-se sugerir que o EF de *C. sylvestris* não é um agente indutor de estresse oxidativo.

Ainda, neste estudo, foram avaliados o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona é um potente antioxidante endógeno, formado pela união de três aminoácidos (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) e possui papel central na biotransformação, na eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (HUBER; ALMEIDA, 2008). Esta enzima apresenta-se no organismo sob duas formas: a reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG). Ambas atuam direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular, sendo seu ciclo regulado pelas enzimas: glutathiona oxidase (GO), glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR). As GO e GPx catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a GR, é aquela responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (ROVER JÚNIOR et al., 2001). No fígado, a principal forma de glutathiona é a reduzida (GSH), que é o

produto da ação da GR sob a GSSG, sendo que esta forma de enzima representa ao redor de 99% do total de glutathione presente no tecido hepático, e a razão GSH/GSSG apresenta-se alta em condições fisiológicas normais (KRETZSCHMAR, 1996).

Na presente pesquisa, verificou-se uma alteração no ciclo-redox hepático da glutathione nos animais tratados com EF da planta, pois estes ratos apresentaram aumento significativo da glutathione oxidada (GSSG), e diminuição da glutathione reduzida (GSH) quando comparados aos valores obtidos das duas enzimas, obtidos naqueles animais do grupo controle, apresentando, assim, baixa razão GSH/GSSG. Embora não tenha sido realizado estudo mais específico referente ao efeito da EF da *C. sylvestris* na glutathione redutase, é plausível supor que pelo menos algum princípio ativo, da planta, possa ter interferido nesta enzima, alterando dessa maneira, a interconversão de GSH para GSSG. Além disso, deve-se salientar que as reações que causam depleção de GSH, podem promover efeito deletério, somatório ou sinérgico se administrada em conjunto com outras drogas que provocam o mesmo efeito, uma vez que a conjugação com a glutathione, na fase II na biotransformação hepática, é um importante mecanismo de detoxificação de xenobióticos, atuando em conjunto com as enzimas GPx e glutathione-S-transferase (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). Desta forma, estudos futuros são necessários, para melhor compreensão da ação da *C. sylvestris*, no ciclo-redox da glutathione, principalmente no que diz respeito à interferência nos sistemas de biotransformação hepática. Tal fato se reveste de grande importância no que se refere à saúde pública e farmacovigilância, haja vista que é prática comum da população, o emprego de plantas medicinais, associado aos medicamentos convencionais. Portanto, a alteração neste sistema de biotransformação, poderia causar o comprometimento desta fase da farmacocinética, promovendo, por exemplo, retardo no tempo de biotransformação e, conseqüentemente, da excreção, tanto dos princípios ativos contidos na planta, bem como do medicamento, e conseqüentemente causar efeitos tóxicos e reações adversas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

De fato, segundo NA et al. (2001), as interações entre fármacos e componentes químicos presentes nas plantas e/ou nos fitoterápicos podem causar mudanças em relação à eficácia e/ou segurança de ambos, uma vez que a administração concomitante destes pode alterar os níveis de resposta biológica, provocando a ampliação ou redução do efeito farmacológico esperado, devido às

ações sinérgicas ou antagônicas. Nesse sentido, são vários os estudos que mostram, de maneira conclusiva, que a administração de plantas ou fitoterápicos, concomitantemente com certos medicamentos convencionais, podem causar significativa interferência em vários processos atinentes à farmacocinética, particularmente na biotransformação hepática (fase I), processo no qual as enzimas do complexo citocromo P450, são as principais responsáveis, participando de cerca de por 70 a 80% das reações (IZZU; ERNST, 2009).

Os dados obtidos, neste estudo, mostraram que o EF da planta não produziu efeito indutor ou inibidor de CYP. Portanto, é possível sugerir que a *C. sylvestris* pode ser associada aos medicamentos convencionais. No entanto, para se concluir definitivamente sobre esta questão será necessária a realização de mais estudos uma vez que, o processo da biotransformação depende não somente da concentração de citocromo P450, mas também da proporção das isoformas de citocromo P450, da afinidade pelo substrato, da redução do complexo droga-citocromo P450 e da competição entre substratos endógenos e exógenos (ZANGER; SCHWAB, 2013). Essa futura avaliação se recobre de importância ainda maior se for considerado que no presente EF foram identificados os flavonóides quercetina, kaempferol e derivados. Ressalta-se que estes compostos podem ter efeito sobre a biossíntese e a modulação (inibição ou estimulação) de isoformas específicas como CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002; MOON; WANG; MORRIS, 2006). Além disso, sabe-se que a quercetina e o kaempferol podem ter efeitos sobre as enzimas participantes da biotransformação de fase II, interferindo na atividade das enzimas glutathione-S-transferase, UDP-glucoronil-transferase e N-acetiltransferase como também na microflora intestinal (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002).

A principal característica das plantas medicinais é a presença de diversos princípios ativos que podem exercer efeitos terapêuticos devido à ação isolada ou em sinergismo (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). Neste sentido, sabe-se que a *C. sylvestris*, vem sendo amplamente estudada quanto às suas propriedades terapêuticas como a antiulcerogênica, anti-inflamatória, cicatrizante e antitumoral, entre outras (FERREIRA et al., 2011). Porém, até o momento, pesquisas que visam elucidar quais os princípios ativos responsáveis pela ação terapêutica, tanto em estudos experimentais, em animais de laboratório, quanto em pacientes humanos, ainda são escassas (ARAÚJO et al., 2014).

Assim, foi também objetivo desta pesquisa, avaliar dois extratos de *C. sylvestris*: fluido (EF) e metanólico (EM), juntamente com a fração diclorometano (FDM) deste extrato, quanto à possível atividade antiulcerogênica. Para tal, empregou-se o modelo de indução de úlcera por etanol acidificado. Este modelo já está bem definido, sendo um dos principais ensaios empregados para avaliação de compostos antiulcerogênicos (LAHIRI; PALIT, 2012). Como desdobramento deste objetivo principal, também foi escopo do presente estudo procurar definir, se caracterizado o efeito antiulcerogênico, quais compostos presentes nestes extratos seriam os responsáveis por esta atividade.

Os dados obtidos na presente pesquisa claramente mostraram que ambos os extratos EF e EM, assim como a fração FDM, apresentaram atividade antiulcerogênica. Neste estudo, também foi possível verificar que o EM e a fração FDM mostraram-se mais potentes, uma vez que inibiram 100% do quadro ulcerativo induzido pelo etanol-acidificado.

Em relação ao estudo fitoquímico, foram identificados no EF principalmente compostos da classe dos flavonóides como quercetina, rutina e kaempferol e seus derivados, enquanto que no EM e fração FDM, foram identificados ácidos graxos, e compostos da classe dos terpenos como o espatulenol.

Dados de literatura mostram que os flavonóides podem exercer diferentes ações terapêuticas no trato gastrointestinal por meio de diferentes mecanismos de ação, como proteção da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos, sequestrador de radicais livres e ações antioxidantes, aumento da produção de muco, inibição de atividade secretória e, ainda, inibição de crescimento da bactéria *Helicobacter pylori* (BORRELLI; IZZO, 2000). De fato, os flavonóides identificados na *C. sylvestris*, no presente estudo: rutina, quercetina e kaempferol, são descritos como agentes antiúlcero-gênicos, avaliados por diferentes modelos experimentais como: indução por etanol e etanol acidificado, por estresse imobilização e imersão em água, por antiinflamatórios não esteroidais, ligação de piloro e reserpina, (DI CARLO et al., 1999; BORRELLI; IZZO, 2000; LA CASA et al., 2000). Da mesma forma, dados de literatura mostram que o sesquiterpeno espatulenol, identificado tanto no EM quanto na fração FDM da planta, já havia sido descrito na composição tanto do óleo essencial de *C. sylvestris* quanto, nos óleos essenciais de outras plantas com atividade antiúlcero-gênica como *Baccharis dracunculifolia*, *Croton*

cajucara, *Pteridon emarginatus*, entre outras (ESTEVES et al., 2011; ROZZA; PELLIZZON, 2013).

Atualmente, os fármacos mais eficazes na supressão da secreção de ácido gástrico são aqueles que inibem a bomba de prótons (bomba H⁺/ K⁺- ATPase), como por exemplo o lansoprazol, medicamento aqui empregado como controle positivo na avaliação dos efeitos antiulcerogênicos do EF. Por outro lado, sabe-se que medicamentos deste grupo podem ocasionar reações adversas graves como trombocitopenia, nefrite intersticial aguda nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, reações anafiláticas ginecomastia e impotência; além disto, este grupo de medicamentos possui custo elevado, não sendo assim, acessível para a grande maioria da população brasileira e, portanto, inviabilizando o tratamento (YUAN; PADOL; HUNT, 2006). Dessa forma, pode-se afirmar que o EF de *C. sylvestris* é bastante promissor como agente antiulcerogênico considerando que este apresentou maior proteção aos efeitos do etanol-acidificado quando comparado ao lansoprazol (90% vs 80% proteção). Deve-se ainda, considerar que no estudo toxicidade do EF da planta não foi observado nenhum sinal de toxicidade ou reação adversa (AMENI, 2011), apresentando, assim, mais esta vantagem em relação aos medicamentos antiulcerogênicos sintéticos usados tradicionalmente.

Cabe salientar que também se verificou neste estudo que o extrato metanólico da *C. sylvestris* também se mostrou bastante promissor para o emprego no tratamento da úlcera; porém, para que seja possível realizar a indicação para o uso clínico deste extrato é necessária a condução de estudos de toxicidade pré-clínica, para avaliar a segurança deste.

A associação dos dados provenientes da literatura, com os resultados aqui obtidos, permite sugerir que a atividade antiulcerogênica da *C. sylvestris*, não estaria relacionada à presença de somente uma substância ativa, mas sim devido ao efeito sinérgico entre os diferentes compostos da classe dos flavonóides bem como o de terpenos presentes na planta. Esta hipótese corrobora o estudo de Donatini et al., (2009), no qual indica que os compostos flavonóides bem como os terpenos, apresentam atividade antiúlcera. Vale ressaltar que atualmente estes compostos vêm sendo bastante estudados, com o objetivo de serem desenvolvidos novos agentes terapêuticos para o tratamento de úlceras gástricas (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013; CHATTERJEE; BANDYOPADHYAY, 2014). Tais pesquisas visam buscar fármacos mais eficazes, menos tóxicos e de custo mais baixo.

O estudo fitoquímico realizado na presente pesquisa permitiu melhor esclarecimento sobre os possíveis compostos, presentes na *C. sylvestris*, que são responsáveis pela atividade antiulcerogênica. Além disso, as informações das análises fitoquímica aqui obtidas, forneceram dados importantes para o estabelecimento de quais os marcadores químicos (princípios ativos) que podem ser utilizados para a padronização e o controle de qualidade de fitoterápicos a base de *C. sylvestris*. Salienta-se que até o presente momento não foi estabelecido um extrato padronizado para o uso terapêutico, sendo atualmente preconizadas as formas de infusão e compressas (uso popular) pelo Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011). Além disso, salienta-se que a elaboração de extratos secos padronizados permite assegurar maior estabilidade, facilidade de manipulação, precisão das doses, eficácia e segurança da administração da planta (ALEXANDRE; GARCIA; SIMÕES, 2005).

Outra proposta da presente pesquisa foi a de realizar um *screening* do potencial antitumoral da *C. sylvestris*. Este estudo foi realizado, a partir de um embasamento dos programas de prospecção do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), que preconiza que uma avaliação em diversos tipos de células neoplásicas possibilita a descoberta de substâncias com maior especificidade para o tratamento de diferentes tipos de câncer, sendo assim mais efetivo no tratamento (MONKS et al., 1991).

Neste sentido, de acordo com os protocolos propostos pelo NCI, para que se considere um extrato bruto promissor para posterior isolamento, purificação e elucidação estrutural dos princípios ativos, sua IC₅₀ (concentração do extrato que induz 50% de lise ou morte celular) deve ser menor que 30µg/mL, e as amostras testes IC₅₀ ≤ 4,0µg/mL são classificadas como drogas de forte atividade antineoplásica (RUBINSTEIN et al., 1990). De fato, os dados aqui obtidos mostram que o EM de *C. sylvestris* apresentou efeito citotóxico para todas as linhagens cancerosas testadas, apresentando valores de IC₅₀ ≤ 5µg/ml. Ainda, a partir do seu fracionamento e posterior purificação, foi possível obter compostos com atividade citotóxica mais pronunciada. Além disso, foi possível identificar no EM, um composto majoritário, com estrutura molecular correspondente ao diterpeno clerodânico, o que corrobora os estudos anteriores com esta planta, nos quais foram propostos serem os diterpenos clerodânicos (casearinas e caseavestrinas) os principais compostos

ativos responsáveis pela atividade antitumoral (ITOKAWA et al., 1988; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; FERREIRA et al., 2010).

O estudo bioguiado desde o extrato bruto até a subfração mais purificada, realizado na presente pesquisa revela que o efeito citotóxico esteve presente em todas as etapas, o que permite sugerir que este efeito não ocorreria devido somente a um único composto (ou seja, ao diterpeno clerodânico), mas sim devido a um conjunto de substâncias presentes na planta. Neste sentido, a literatura mostra que outros compostos químicos contidos na *C. sylvestris*, como sesquiterpenos, monoterpenos, compostos fenólicos, entre outros, também estão descritos como importantes compostos com ação antitumoral (XIA et al., 2015). Como exemplo, cita-se o óleo essencial da *C. sylvestris* contendo os compostos bicyclogermacrene, β -cariofileno, α -humuleno, espatulenol, germacreno B, α -pineno, germacreno D, globulol, α -muurolol, os quais mostraram boa seletividade citotóxica frente à linhagens tumorais celulares HeLa, A-549 e HT29 (SILVA et al., 2008). É notório concluir, a partir dos resultados aqui obtidos, juntamente com os dados da literatura, que a *C. sylvestris* apresenta atividade antitumoral, portanto, encorajando à prospecção, de princípios ativos, nela contidos, com potencial efeito antitumoral.

O uso racional de plantas medicinais deve ser fundamentado em evidências experimentais comprobatórias de risco e benefício através de ensaios que comprovem a eficácia terapêutica bem como a avaliação da toxicidade (LAPA et al., 2007).

Os dados obtidos neste estudo sobre os constituintes químicos presentes no extrato fluido da *C. sylvestris*, foram importantes para posterior padronização do mesmo e identificação dos marcadores biológicos relacionados a atividade antiúlcera. Além disso, essas informações poderão ser utilizadas para realização de experimentos futuros, para melhor compreensão do mecanismo de ação e também na quantificação dos princípios ativos necessários para estabelecimento da dose a ser utilizada para forma farmacêutica (posologia), assim como para realização de ensaios clínicos. É importante salientar que somente com a padronização de um fitoterápico e a realização de todos os testes de eficácia e segurança com este extrato, é que será possível a confiabilidade dos resultados. Além disso, resultados advindos do estudo de toxicidade indicam que o uso do EF concomitante com outros medicamentos deve ser realizado com cautela, uma vez que foram observadas possíveis interferências nos processos de detoxificação hepática.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. O EF de *C. sylvestris* não alterou a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, bem como não mostrou efeitos sobre a peroxidação lipídica quando administrado por via oral, por seis dias consecutivos, nos ratos tratados com o extrato. Porém foram observadas alterações no ciclo-redox da glutathione, observando-se a razão GHS/GSSG diminuída;
2. O EF de *C. sylvestris* não mostrou efeito na indução ou inibição do complexo enzimático do citocromo P450;
3. Os extratos EF, EM e fração FDM mostraram efeito antiulcerogênico;
4. O EM de *C. sylvestris*, frações e subfrações da planta mostraram atividade citotóxica frente a todas linhagens celulares cancerosas (mama, colón, cérvix e pulmão) testadas;
5. No estudo fitoquímico foram identificados no EF compostos da classe dos flavonóides e no extrato metanólico compostos da classe dos terpenos e ambos foram correlacionados a atividade antiúlgerogênica.

REFERÊNCIAS

- ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER-HEYDEN, T. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1772, n. 1, p. 1-8, 2007.
- ALBANO, M. N.; DA SILVEIRA, M. R.; DANIELSKI, L. G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A. P. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 3, p. 612-617, 2013.
- ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Evidence-based herbal medicine. Part 2. Phytopharmaceuticals elaborated with artichoke, horse chestnut, ginseng and passion flower. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 310-314, 2005.
- AMENI, A.Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos Wistar**. 2011. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- ARAUJO, E. J. F.; ARAÚJO, D. Y. M. L.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 3, n. 35, p.355 - 361, 2014.
- 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.
- BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 185-197, 1990.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n., p. 629-643, 2010.
- BERNHEIM, F.; BERNHEIM, M. L. C.; WILBUR, K. M. THE REACTION BETWEEN THIOBARBITURIC ACID AND THE OXIDATION PRODUCTS OF CERTAIN LIPIDES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 174, n. 1, p. 257-264, 1948.
- BEUTLER, J. A.; MCCALL, K. L.; HERBERT, K.; HERALD, D. L.; PETTIT, G. R.; JOHNSON, T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 657-661, 2000.
- BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.;

GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comparative Biochemistry and Physiology – B. Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, n. 1, p. 21-30, 2000.

BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*, v. 14, n. 8, p. 581-591, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de fitoterápicos da farmacopéia brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.126p.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAMARGO, F. G.; PEREIRA, J. A.; BUENO, V. S.; GOMES, E.; ANDO, T. Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo – Parte II – Estudo histológico. *LECTA*, v. 14, n. 1, p. 61-86, 1996.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHATTERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, S. K. Herbal Remedy: An Alternate Therapy of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Induced Gastric Ulcer Healing. *Ulcers*, v. 2014, n. 2014, p. 1-13, [2014].

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHITLANGE, S. S.; BHUJBAL, S. S.; KULKARNI, A. A. ; IMRAN, M. ; KULKARNI, S. P. Chromatographic fingerprint analysis for herbal medicines : a quality control tool. *Pharmaceutical Reviews*, v. 6, n. 2, 2008. Disponível em: <http://www.pharmainfo.net/reviews/chromatographic-fingerprint-analysis-herbal-medicines-quality-control-tool>. Acesso : 25 maio 2015.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n.2, p. 107-114, 2011.

CURY, V. G. C. **Eficácia terapêutica da Casearia sylvestris sobre herpes labial e perspectiva de uso em saúde coletiva**. 2005. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2005.

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from Casearia sylvestris SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 655-666, 2008a.

DA SILVA, S. L.; CHAAR, J. D. S.; DAMICO, D. C. S.; FIGUEIREDO, P. D. M. S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of Casearia sylvestris. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 347-351, 2008b.

DE CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. D. S. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from Casearia sylvestris. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

DE MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

ESTEVES, I.; LIMA, L. M.; SILVA, M. L.; SANTOS, L. S.; RODRIGUES, M.; DA SILVA, J. M. S.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Casearia sylvestris Sw. essential oil activity in inflammation in rats induced by bothrops alternatus venom. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 7, n. 2, p. 28-32, 2011.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 1926. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/farmacopeia.htm>>. Acesso em: 25 maio de 2015.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 25 maio de 2015.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P. M. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BARROS, F. W. A.; MARTINS, A. M. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SANTOS, A. G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of casearia sylvestris: A medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FIAMEGOS, Y. C.; NANOS, C. G.; VERVOORT, J.; STALIKAS, C. D. Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, n. 1–2, p. 11-18, 2004.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 1-12, 2009.

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; ANDRADE, A. M.; HILDER, E. F.; CAVALHEIRO, A. J. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 1-2, p. 37-44, 2014.

HO, C. S.; LAM, C. W. K.; CHAN, M. H. M.; CHEUNG, R. C. K.; LAW, L. K.; LIT, L. C. W.; NG, K. F.; SUEN, M. W. M.; TAI, H. L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3-12, 2003.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, n. 1, p. 1-21, 2002.

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.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. Antitumor principles from *Casearia sylvestris* sw. (flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 1585-1588, 1988.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

IZZO, A.; ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. **Drugs**, v. 69, n. 13, p. 1777-1798, 2009.

KORRAPATI, M. C.; MEHENDALE, H. M. Xenobiotics. In: Wexler, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. 2. ed. New York: Elsevier, 2005. p.469-470.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 48, n. 5, p. 439-446, 1996.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTÍN CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural

flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.

LAHIRI, S.; PALIT, G. An overview of the current methodologies used for evaluation gastric and duodenal anti-ulcer agents. **Pharmacologia**, v. 3, n. 8, p. 249-257, 2012.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. M.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. cap. 11, p. 247- 262.

LIMA, E.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIANG, Y. Z.; XIEP, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MIRANDA, P. O.; PADRÓN, J. M.; PADRÓN, J. I.; VILLAR, J.; MARTÍN, V. S. Prins-Type Synthesis and SAR Study of Cytotoxic Alkyl Chloro Dihydropyrans. **ChemMedChem**, v. 1, n. 3, p. 323-329, 2006.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sciences**, v.38, p. 2163-2167, 1986.

MOISEEV, D. V.; BUZUK, G. N.; SHELYUTO, V. L. Identification of flavonoids in plants by HPLC. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, n. 1, p. 47-50, 2011.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 2, p. 187-210, 2006.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

MOSADDIK, M. A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, v. 11, n. 5, p. 461-466, 2004.

NA, D.; JI, H.; PARK, E.; KIM, M.; LIU, K.-H.; LEE, H. Evaluation of metabolism-mediated herb-drug interactions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 11, p. 1829-1842, 2011.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals**: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. 2008. Guideline 407. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en;jsessionid=cr1l8e7p7tr9.epsilon>. Acesso em: 13 maio de 2015.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals**: repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. 1998. Guideline 408. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en;jsessionid=cr1l8e7p7tr9.epsilon>. Acesso em: 13 maio de 2015.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I- Evidence for its hemoprotein nature. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 7, p. 2370-2378. 1964.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C. M. V.; ANDRÉO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; SILVA, M. G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-i, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 11, n., p. 465-478, 2005.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C. D. (Org.). **Casarett and Doull's toxicology**: the basic science of poisons. 9th ed. New York: McGraw_Hill, 2001. p. 113–186.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina popular III. Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 4, p. 85-86, 1992.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1–3, p. 222-239, 2006.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RENISUS. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 4 mar 2015.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. Políticas Públicas em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

ROZZA, A. L.; PELLIZZON, C. H. Essential oils from medicinal and aromatic plants: A review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 51-63, 2013.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1113-1117, 1990.

RUPPELT, B. M.; GONCALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti snake venom. II. Increase of cutaneous capillary permeability and lethality of jararaca venom (*Bothrops jaracaca*). **Abordagem farmacologica de plantas recomendadas pela medicina folclorica como antiofidicas. II. Bloqueio da atividade na permeabilidade capilar e na letalidade do veneno de jararaca (Bothrops jararaca)**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 71, n. 3, p. 57-58, 1990.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de casearia sylvestris**: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. 2008. 361 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA JR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. D. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. D. Ó.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: Evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R.. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

SILVA, F. A.; BAISCH, A. L. M.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E. S.; ALAM, M. F.; APOLINÁRIO, J. C. G.; LAPA, A. J. Estudos Farmacológicos Preliminares dos Extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. **Acta Amazônica título da revista por extensor**, v. 18, p. 219-29, 1988. Supplement.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. Natural medicaments in endodontics -- a comparative study of the anti-inflammatory action. **Pesquisa odontologica brasileira = Brazilian oral research**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; CHASE, M. W.; MORT, M. E.; ALBACH, D. C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W. H.; HOOT, S. B.; FAY, M. F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S. M.; PRINCE, L. M.; KRESS, W. J.; NIXON, K. C.; FARRIS, J. S. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 133, n. 4, p. 381-461, 2000.

SOUSA, F. G.; SCHNEIDER, N. F. Z.; MENDES, C. E.; DE MOURA, N. F.; DENARDIN, R. B. N.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. S. Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from *Casearia sylvestris* swart. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 4, p. 376-378, 2007.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 435-440, 2010.

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq.(Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 239-258, 1986.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X. C.; KHAN, I. A. Clerodane and ent-kaurane diterpene glycosyl and glycoside derivatives from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, n. 9, p. 1829-1839, 2009.

WANG, W.; ALI, Z.; LI, X. C.; KHAN, I. A. Neolignans from the leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, n. 1, p. 139-146, 2010.

WEISSMAN, S. M. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd ed. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 49, n. 3, p. 310-311, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011. 12p.

WOLFENDER, J. L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 794, n. 1-2, p. 299-316, 1998.


XIA, L.; GUO, Q.; TU, P.; CHAI, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 99-135, 2015.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova**, v. 24, n., p. 147-152, 2001.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80-89, 2006.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103-141, 2013.

ANEXO A – Certificado de análise das folhas *Casearia sylvestris*



Plantamos mais Saúde.

Certificado de Análise

Produto: Boletim: 10213		Nome popular: <i>Guaçatonga</i> Nome científico: <i>Casearia sylvestris swartz</i>	
Fabricação: 03/2013		Parte utilizada: Folha	
Validade: 03/2015		Lote: 1096131	
Referência Panizza: MAPA/A-073			

Físico-químico		
Testes	Especificações	Resultados
Aspecto Macroscópico/característica organoléptica	Folhas simples, peciolas cortíceas, elíptico-lanceoladas, de margens serradas-denteadas, glabras. Na parte superior é luzidio opaco e de cor mais clara na inferior, talos finos de cor clara. Odor e sabor característico.	De acordo
Aspecto Microscópico	Epiderme clabro, formado de células poligonais, mesófilo heterogêneo, assimétrico, na parte superior formado por camadas de parênquima de células ovais ou arredondado, observa-se bolsas secretoras.	De acordo
pH	5,5 - 7,5	6,3
Perda por dessecação	≤ 14,0 %	9,8 %
Elementos Estranhos	Tanto quanto possível, isenta de fungos de insetos e de outros contaminantes de origem animal. Salvo indicação em contrário, a porcentagem de elementos estranhos não é superior a 2 por cento m/m.	De acordo
Cinzas Totais	Maximo 15,0 %	5,5 %
Cinzas Insolúveis em ácido	Maximo 5,0 %	1,3 %
Metais pesados	≤ 10 PPM	< 10 PPM
Determinação de Taninos	Positivo	Positivo

Microbiológico		
Testes	Especificações	Resultados
Contagem de Bactérias aeróbias totais	Máximo 1,0 x 10 ³ UFC/g	< 10 UFC/g
Contagem de Bolor e Leveduras	Máximo 1,0 x 10 ³ UFC/g	< 10 UFC/g
Coliformes Totais e Fecais (<i>E. coli</i>)	Máximo 10 NMP/g	< 3 NMP/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Máximo 5 NMP/g	< 3 NMP/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente

Rosilda Mendes Nunes
Analista Controle Qualidade

Rosilda

Farmacêutica Controle Qualidade

FCQ

Rua Brasileira Beu, 85 - Vila Indiana - Taboão da Serra - SP - CEP: 06786-450 - Tel/Fax: (11) 4137-0255
 E-mail: controlequalidade@panizza.com.br
www.panizza.com.br