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

Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de
Jacaranda decurrens Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e
Piper umbellatum L.

Leandro Santoro Hernandez

São Paulo
2015

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

Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de
Jacaranda decurrens Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e
Piper umbellatum L.

Leandro Santoro Hernandez

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018
A original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Titular Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

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

Hernandes, Leandro Santoro

H557fa Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de
Jacaranda decurrens Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e *Piper*
umbellatum L. / Leandro Santoro Hernandez. -- São Paulo, 2015.
101p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Bacchi, Elfriede Marianne

1. Farmacognosia I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.321 CDD

Leandro Santoro Hernandez

Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de
Jacaranda decurrens Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e
Piper umbellatum L.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa. Titular Elfriede Marianne Bacchi
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

RESUMO

HERNANDES, L.S. **Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de *Jacaranda decurrens* Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e *Piper umbellatum* L..** 2015. 101 p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Jacaranda decurrens Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e *Piper umbellatum* L. são plantas nativas do Brasil, presentes no estado de São Paulo, com relatos de uso popular para atividade antiúlcera. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiúlcera de *J. caroba*, *J. decurrens* e formulações de nanocápsulas contendo *P. umbellatum*. Também pretendeu-se caracterizar a fitoquímica de tais formulações e extratos. Adicionalmente, foi avaliada a toxicidade aguda e subaguda de *J. caroba*. Os extratos de *Jacaranda* apresentaram compostos fenólicos em seus perfis cromatográficos obtidos por CCD e CLAE, característicos para cada espécie. Os diferentes extratos de *J. caroba* variaram sua composição química conforme a procedência e idade da planta. As espécies *J. decurrens* e *J. caroba* de três diferentes regiões não apresentaram ação antiúlcera aguda em ratos em modelo de indução por etanol acidificado, embora o extrato e as frações de *J. caroba* apresentaram potencial atividade anti *Helicobacter pylori*, com CIM variando entre 125 e 1.000 µg/mL. O extrato de *J. caroba* não promoveu sintomas de toxicidade aguda e subaguda em ratos. A DL₅₀ observada foi maior que 5.000 mg/kg. Não foram relatadas alterações significativas na aparência macroscópica e peso dos órgãos, porém houve indicação de atividade mutagênica em teste de Ames na linhagem TA98 de *S. typhimurium*, o qual apresentou uma tendência dose-resposta para concentrações entre 7,5 e 15,0 mg/placa após ativação metabólica (S9). A formulação de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona com extrato de *P. umbellatum* apresentou partículas com diâmetro médio de 181,6 ± 0,9 nm e potencial zeta de -31 ± 4 mV. Através de análise por CLAE observou-se maior eficiência de encapsulamento para a porção mais apolar da fração, enquanto que os compostos mais polares ficaram dispersos no meio. As nanocápsulas poliméricas apresentaram atividade gastroprotetora mesmo sem a adição de ativos e tiveram sua atividade aumentada pela fração clorofórmica de *P. umbellatum*.

Palavras-chaves: *Jacaranda decurrens*, *Jacaranda caroba*, *Piper umbellatum*, úlcera gástrica e nanocápsulas.

ABSTRACT

HERNANDES, L.S. **Pharmacology and phytochemistry of extracts and formulations from *Jacaranda decurrens* Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. and *Piper umbellatum* L..** 2015. 101 p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Jacaranda decurrens Cham., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. and *Piper umbellatum* L. are native plants in Brazil, present in the state of São Paulo, with popular usage reports for anti-ulcer activity. This study aimed to evaluate the anti-ulcer activity of *J. caroba*, *J. decurrens* and nanocapsules formulations containing *P. umbellatum*. Also, we intended to characterize the phytochemistry of such formulations and extracts. Additionally, we evaluated the acute and subacute toxicity of *J. caroba*. Extracts from *Jacaranda* presented phenolic compounds in their chromatographic profiles obtained by TLC and HPLC, with variations between species. Samples of *J. caroba* extracts showed different chemical composition according to the origin and age of the plant. The species *J. decurrens* and *J. caroba* from three different regions showed no acute anti-ulcer action when tested in rats by acidified ethanol induction model. However, extract and fractions from *J. caroba* showed potential anti *Helicobacter pylori* activity, with MIC ranging from 125 and 1,000 ug/mL. *J. caroba* extract did not cause symptoms of acute and subacute toxicity in rats. The DL₅₀ was determined above 5,000 mg/kg. Also, there were no significant changes to the macroscopic appearance of organs or changes in their weights. Meanwhile, an indication of mutagenic activity was observed in the Ames test. The TA98 strain of *S. typhimurium*, showed a tendency of dose-response for concentrations between 7.5 and 15.0 mg/plate after metabolic activation (S9). The nanocapsules formulation of poly-ε-caprolactone containing *P. umbellatum* extract had an average particle diameter of 181.6 ± 0.9 nm and zeta potential of -31 ± 4 mV. HPLC analysis showed better entrapping efficiency for the more apolar portion of the fraction, while the more polar compounds were dispersed in the medium. The polymeric nanocapsules showed gastroprotective activity even without the addition of active molecules and had their activity increased by chloroform fraction of *P. umbellatum*.

KEYWORDS: *Jacaranda decurrens*, *Jacaranda caroba*, *Piper umbellatum*, gastric ulcer and nanoparticles.

Agradecimentos

A minha família. Por me ajudar a ter as qualidades e defeitos que tenho hoje, ou seja, por eu ser quem eu sou. Reconheço que são as pessoas mais importantes da minha vida. Amo vocês.

A minha orientadora, Elfriede Marianne Bacchi, por ser um exemplo pessoal e profissional. Sempre me auxiliou a tomar as melhores decisões, no cotidiano e para o futuro. Além de todos os ensinamentos acadêmicos, serei eternamente grato pelas lições de paciência, serenidade e perseverança. Sou muito grato por todo o seu tempo dedicado à minha formação.

Aos alunos de Iniciação Científica sem os quais esse trabalho não teria a mesma qualidade. Bruno Sgarioni, Caio Cesar Nazaro e Pedro Ramberger Castelo, agradeço por tudo que aprendi na convivência com vocês. E muito mais importante que esse trabalho, permanece a amizade.

Aos companheiros de laboratório, Alberto, Alexandra, Ângela, Carol, Flávia, Guilherme, Harry Leo, Peki. Sempre presentes nos bons momentos e nos tempos difíceis. Desejo que todos tenham carreiras fantásticas. Força para todos.

Aos professores da Farmacognosia, Paulo Chanel Deodato de Freitas, Dominique Corinne Hermine Fischer, Edna Tomiko Myiake Kato, por todos os ensinamentos e ajudas prestadas e pelos bons momentos fora do período de trabalho. Agradeço também ao professor Gabriel Lima Barros de Araújo, que apesar da área Farmacotécnica, fisicamente também pertence à Gnosia. Obrigado por compartilhar conosco seu conhecimento e convivência.

Especialmente à professora Nádia Araci Bou Chacra, pela imensa ajuda prestada durante o doutorado, por todas as conversas e bons momentos, e também por colaborar com meu futuro. Me sinto muito privilegiado por ter recebido sua atenção.

A todos os funcionários do Departamento de Farmácia, em especial ao Roberto, Alexandre e David, sempre prestativos e tornando o ambiente de trabalho mais divertido.

Aos professores de outros laboratórios, muito importantes na realização deste trabalho. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno, Telma Mary Kaneko, Silvia Berlanga

de Moraes Barros. Obrigado pelas conversas, pelo conhecimento e por todo o apoio.

Aos funcionários da faculdade que fazem tudo funcionar. À Elaine e ao Jorge por todo o apoio acadêmico e pelas divertidas conversas. À Cilene por ser tão simpática e prestativa, me apoiando nos estudos de piano. À Dora, Raquel, Cida e Francisca por todos os cafezinhos. Um grande obrigado ao Irineu, por toda a ajuda e paciência.

Ao professor José Luiz Aiello Ritto, por todo o tempo, atenção, paciência e dedicação empregados para a realização deste trabalho. Você foi uma das pessoas das quais sou grato por ter conhecido nesse período.

Aos meus amigos também farmacêuticos, em especial aos que estiveram mais presentes durante esses anos: Cláudia, Mit, Gabi, Ju Barbosa, Leo, Victor, Leandro, Rapha, Flávia e Ricardo, André e Ju. Obrigado pelas conversas, caronas, almoços, jantas, cafés e InterUSPs. São momentos que fazem a gente levar tudo em frente com sorriso no rosto. Será impossível eu lembrar dessa época sem lembrar de vocês.

Ao vôlei da Farma. Não seria a mesma pessoa sem esse time. Após 12 anos, é impossível medir o quanto colaborou para meu crescimento como ser humano. Agradeço a cada um que fez parte, principalmente aos técnicos: Carol, Paty, Henrique, Bispo, Manu, Holanda e Cortez. Não citarei nomes dos amigos jogadores pois certamente esquecerei alguém e todos foram importantes. Sou muito grato ao esporte, por me aproximar de pessoas fantásticas e ao mesmo tempo trazer lições inestimáveis.

Agradeço também ao time de vôlei feminino da Farma, principalmente às meninas que jogaram em 2013. Aprendi muito com vocês. Sou muito grato pelo período em que estive próximo do time. Vocês me trazem excelentes lembranças.

Um gigante agradecimento aos amigos do CoralUSP, que mudaram minha vida durante o doutorado. Nunca esquecerei de vocês. Primeiro ao Eduardo Fernandes pela amizade. Por ser tão incrível regente, pessoa e por ter me acolhido no coro, me proporcionando alguns dos melhores momentos da minha vida. Ao professor de técnica vocal Fernando Coutinho, por toda a paciência em me ouvir, pelos ensinamentos e amizade. Aos outros regentes e professores de técnica vocal, vocês são demais. Obrigado por tudo que aprendi com vocês. Aos amigos coralistas: não vou citar nomes para não ser injusto, foram muitas pessoas importantes, gosto muito de vocês e minha memória não funciona mais a essa altura do doutorado.

Um agradecimento especial às pessoas que foram tão gentis comigo durante os períodos em que estive em Araraquara. Pessoas fantásticas, de coração aberto, que me proporcionaram excelentes memórias. Às professoras Taís Maria Bauab e Eliana Aparecida Varanda, por disponibilizar laboratórios, recursos e tempo. Agradeço também a Flávia Resende Nogueira, Rone de Grandis, Matheus Ramos e Débora Leite, pela imensa colaboração neste trabalho. Vocês ajudaram a salvar meu doutorado.

Especialmente importantes foram as pessoas com quem convivi na República Caverna. Sou eternamente grato por ter sido tão bem acolhido na casa de vocês. Foi um dos melhores meses de Julho dos quais consigo me lembrar. Um mês em que trabalhei muito e vocês me fizeram sentir como se estivesse de férias, tamanha foi a satisfação em ter as suas companhias. Sempre lembrarei dessa época com muita saudade.

Agradeço também aos amigos que tão bem me receberam no exterior: Boi, Renata e Rui. Fizeram parecer que qualquer canto do mundo também é nossa casa.

Esses enormes agradecimentos não são capazes de representar individualmente cada pessoa que foi importante durante esses quatro anos. Peço desculpas por não incluir todos os nomes. Há várias pessoas que foram essenciais para o meu crescimento no cotidiano, no trabalho e nos momentos de lazer. Agradeço aos amigos, familiares, colegas e todas as pessoas com quem tive o privilégio de conviver.

Por fim ao CNPq, pela bolsa que sempre recebi em dia. E por ter me concedido a bolsa de Pós-Doutorado para dar continuidade ao trabalho.

Obrigado.

Lista de Abreviaturas e Siglas

CCD / TLC: Cromatografia em Camada Delgada

CLAE / HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CIM / MIC: Concentração Inibitória Mínima

CIM: concentração inibitória mínima

DL₅₀: dose letal para 50% dos animais

MAO: monoamino-oxidase

LC/MS: cromatografia líquida / espectro de massas

DPPH: radical difenilpicril-hidrazila

4-NC: 4-nerolidilcatecol

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

ANOVA: análise de variâncias

PDA: arranjo de fotodiodos

TFA: ácido trifluoroacético

ACN: acetonitrila

MeOH: metanol

DMSO: dimetilsulfóxido

FBS: tampão fosfato

ARL: área relativa de lesão

UV-Vis: ultravioleta-visível

IL- β : interleucina beta

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

Sumário

0. Organização do Trabalho	17
1. Introdução	18
1.1. <i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) DC.....	19
1.2. <i>Jacaranda decurrens</i> Cham.....	20
1.3. <i>Piper umbellatum</i> L.....	22
1.4. Úlcera gástrica.....	23
1.5. Formulações de nanocápsulas e extratos vegetais	24
2. Objetivos	25
PARTE I - Farmacologia e fitoquímica de <i>Jacaranda decurrens</i> Cham. e <i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) DC.....	27
3. Metodologia	29
3.0. Obtenção do material vegetal	29
3.1. Preparo do extrato bruto liofilizado e frações	29
3.2. Caracterização fitoquímica.....	30
3.3. Farmacologia direcionada à atividade antiúlcera	33
3.4. Avaliação toxicológica do extrato de <i>Jacaranda caroba</i>	35
3.5. Análise estatística	38
4. Resultados	39
4.1. Preparo do extrato bruto e frações	39
4.2. Caracterização fitoquímica.....	40
4.3. Farmacologia direcionada à atividade antiúlcera	52
4.4. Avaliação toxicológica do extrato de <i>Jacaranda caroba</i>	57
5. Discussão.....	66
PARTE II - Desenvolvimento de formulação para otimizar as propriedades farmacêuticas de extratos de <i>Piper umbellatum</i> L.	75
6. Metodologia	77
6.1. Preparo de nanocápsulas com extratos de <i>Piper umbellatum</i> L.	77
6.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas	78
6.3. Atividade gastroprotetora da formulação de nanocápsulas	79
7. Resultados	80
7.1. Preparo do extrato bruto liofilizado e fração clorofórmica	80
7.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas	80
7.3. Atividade gastroprotetora da formulação de nanocápsulas	85
8. Discussão.....	87
9. Conclusão	91
10. Referências Bibliográficas.....	93
APÊNDICE A	101

0. Organização do Trabalho

O projeto original deste trabalho de doutorado visava à comprovação da atividade antiúlcera de folhas da espécie *Jacaranda caroba* (Vell.) DC., devido a excelentes resultados obtidos por alunos do laboratório entre os anos de 1998 e 1999. Essa escolha foi feita pois a investigação naquela época não teve aprofundamento. No entanto, alguns fatos e resultados inesperados mudaram o rumo deste trabalho.

Após verificar que a espécie utilizada nos primeiros experimentos era *J. decurrens* e não *J. caroba*, foram procurados os espécimes de *J. caroba*. No entanto, a fazenda onde as amostras eram coletadas (região de Leme - SP) não apresenta mais a mesma cobertura original, já que grande parte foi substituída por plantações.

Não havendo possibilidade de estudo de amostras de Leme, realizou-se o ensaio com espécimes do Instituto de Biociências da USP, na Cidade Universitária Amando de Salles Oliveira (Butantã - São Paulo - SP). Entretanto, tal amostra não reproduziu a atividade encontrada no passado.

Devido aos anteriores resultados promissores optou-se por repetir os experimentos com exemplares de outras regiões. Para tal decisão foi levado em consideração que no passado os extratos e frações eram muito ativos, e foram feitas diversas coletas por diferentes pessoas em épocas diferentes, indicando reprodutibilidade. Para o presente trabalho foram obtidas então amostras de Araxá - MG e Pirassununga - SP (esta última pela proximidade com a região de Leme). No entanto, ambas não demonstraram a proeminente atividade, anteriormente atribuída à espécie *J. caroba*.

Durante o trabalho, para padronizar a escrita, foi adotada a seguinte condição: sempre que for referida a espécie *J. caroba*, trata-se da amostra coletada em Araxá - MG, a menos que esteja explícito de outra maneira. Tal escolha foi feita pois essa foi a amostra mais utilizada.

Já o estudo das raízes da espécie *Piper umbellatum* L. fez parte do tema da dissertação de mestrado deste autor, e os experimentos foram continuados em paralelo a esse trabalho. Como os resultados têm se mostrado interessantes, optou-se por sua inclusão na tese.

Dessa forma, as seções referentes à metodologia, resultados e discussão foram

divididas em 2 partes. A primeira tratará das diferentes amostras de *Jacaranda*. A segunda discorre sobre a continuação do trabalho de mestrado, com foco na atividade antiúlcera de formulações desenvolvidas com extratos dessa espécie.

1. Introdução

De acordo com estimativa feita pela Organização Mundial da Saúde (apud LUQMAN *et al*, 2014), mais de três quartos da população de países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais para cuidados básicos com a saúde. Através das pesquisas realizadas na área, um grande número de plantas se provou útil no tratamento de enfermidades e os avanços recentes nas áreas médicas e biológicas trouxeram novas tecnologias para aprofundar o conhecimento sobre a importância biológica de fitoterápicos e seu uso clínico, permitindo entender os mecanismos de ação desses medicamentos para o desenvolvimento de terapias eficazes (LUQMAN *et al*, 2014).

Dados epidemiológicos estimam que em algum momento de suas vidas, entre 4 a 12% da população adulta desenvolva um quadro de úlcera gástrica e que o risco atribuível para o desenvolvimento de uma infecção por *Helicobacter pylori* é de 48% (LEONTIADIS & NYRÉN, 2014). Cerca de 70 - 90% dos pacientes com úlcera gástrica e 80 - 95% dos acometidos por úlcera duodenal estão infectados por *H. pylori* (CHOUDHARY e SINGH, 2014). A epidemiologia detalhada mais recente consta de 2009, quando Sung publicou que a incidência anual de úlcera péptica no mundo varia de 0,10 a 0,19%, e a prevalência, de 0,12 a 1,5%. Significa que dezenas de milhões de pessoas no mundo apresentam essa enfermidade, tornando-a uma das mais relevantes da atualidade.

Produtos de origem natural apresentam atividade antiúlcera através de diferentes mecanismos: profilático (gastroprotetor), terapêutico (cicatrizante) ou a combinação de ambos. Os profiláticos produzem efeitos principalmente através de atividade antioxidante e anti-inflamatória, enquanto que os terapêuticos apresentam propriedades antissecretoras (de ácido) ou cicatrizantes. Adicionalmente, a atividade anti *H. pylori* de algumas plantas pode contribuir para sua atividade antiúlcera (AWAAD *et al*, 2013).

Dessa forma, busca-se nas plantas medicinais terapias alternativas aos medicamentos existentes para o tratamento de úlcera gástrica. Através da virtualmente infinita gama de metabólitos secundários presentes na biodiversidade da flora brasileira e utilizando o conhecimento popular de séculos acerca do uso de plantas medicinais, espera-se obter novos medicamentos que ofereçam melhor eficácia e menos efeitos adversos.

As espécies *Jacaranda caroba* (Vell.) DC., *Jacaranda decurrens* Cham. e *Piper umbellatum* L. apresentam relatos de uso popular como antiúlcera, e foram escolhidas para o estudo de suas propriedades fitoquímicas e farmacológicas. Assim, espera-se contribuir com conhecimento acerca dessas espécies, visando ao desenvolvimento de futuras terapias contra úlcera gástrica.

1.1. *Jacaranda caroba* (Vell.) DC.

Jacaranda caroba (Vell.) DC. pertence à família Bignoniaceae e apresenta como sinônimos *Bignonia caroba* Vell., *Jacaranda clauseniana* Casar., *Jacaranda elegans* Mart. ex DC., *Jacaranda mendoncae* Bureau & K.Schum. e *Jacaranda oxyphylla* Cham. (IPNI, 2015; The Plant List, 2015). Popularmente utilizada para afecções do trato gastrintestinal (BACCHI, 1986), é uma espécie ainda pouco explorada do ponto de vista científico. Na **Figura 1.1** verifica-se um ramo de *J. caroba* coletado em São Paulo, no campus da USP.

Figura 1.1 - Ramo de *J. caroba* com lagarta camuflada (HERNANDES, L.S.; 2013).

Foram encontrados raros trabalhos na literatura sobre *J. caroba*, sendo vários referentes à toxicidade e metabolismo de lipídeos da Ierobina®, formulação fitoterápica

indicada para o tratamento de dispepsias que contém extratos fluídos de algumas espécies, incluindo *J. caroba* (BOTION *et al*, 2005; TAGLIATI *et al*, 2008). No entanto não foram encontrados artigos sobre pesquisas relacionadas a essa atividade. Este produto foi retirado do mercado pela ANVISA, por não apresentar comprovação de eficácia (até o momento da escrita desse trabalho, não foi encontrado novo registro para esse produto na ANVISA). Recentemente, foram retomadas pesquisas incluindo essa formulação, sugerindo a possibilidade que retorne ao mercado em breve. Em 2012, Silva *et al* publicaram resultados referentes à toxicidade crônica da Ierobina®, onde administraram a ratos doses de 2.800 mg/kg por 180 dias. Não foram observadas alterações nos órgãos avaliados. Apareceram sintomas de alterações nos animais, porém todos reversíveis, indicando baixa toxicidade para uma dose bem alta do medicamento. No ano de 2003, Braga *et al* identificaram em *J. caroba* os ácidos ursólico e oleanólico, além de α -amirina, com a finalidade de controle de qualidade da Ierobina®.

Foi publicado um trabalho com experimentos *in vitro* que indicaram atividade antioxidante e inibidor da MAO de extratos (aquoso e hidrometanólico) de folhas de *J. caroba*, porém baixa atividade anticolinesterásica. Através de LC-MS Foram identificados 13 compostos fenólicos que podem estar associados a essas atividades (FERRERES *et al*, 2013).

Em 2010, Endringer *et al* testaram um extrato etanólico e frações em experimentos *in vitro* frente a alvos de quimioprevenção de câncer. O grupo identificou em uma das frações a mistura de ácidos ursólico e oleanólico, sugerindo que esta espécie pode ser uma potencial fonte de ativos para a quimioprevenção do câncer.

Por fim, também foi testada a atividade anti *Leishmania amazonensis*, para qual *J. caroba* não obteve atividade comparada à anfotericina B. No mesmo trabalho, *J. caroba* não apresentou citotoxicidade contra macrófagos de ratos (RIBEIRO *et al*, 2014).

1.2. *Jacaranda decurrens* Cham.

Jacaranda decurrens Cham pertence à família Bignoniaceae e apresenta como sinônimos *Jacaranda pteroides* Silva Manso e *Jacaranda robertii* S.Moore. (IPNI, 2015; The Plant List, 2015). É popularmente conhecida como carobinha-do-campo,

carobinha ou caroba e é endêmica do cerrado, encontrada nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (MAURO *et al*, 2007). Na **Figura 1.2** observa-se um ramo florido de *J. decurrens*.

Figura 1.2 - Preparo de amostra para exsicata de *J. decurrens*. (HERNANDES, L.S.; 2010).

Em resultados preliminares publicados em 1998, por Blatt *et al*, foi indicada a presença de luteolina, luteolina-7-*O*-glicosídeo e 6-hidróxiluteolina-7-*O*-glicosídeo, através de técnicas cromatográficas e espectroscopia UV-Vis. Em 1992, Varanda *et al* identificaram a presença de ácido ursólico na cera epicuticular de *J. decurrens*. Carvalho *et al* (2009), sugerem a presença de ácido oleanólico, flavonas e flavonóis através de análise por CLAE, porém sem isolamento dos compostos. Adicionalmente demonstram atividade antioxidante *in vitro* pelo método do radical DPPH. Outro grupo atribui a esta espécie uma potencial atividade antimicrobiana relacionada a compostos presentes no extrato, testada em bactérias Gram positivas e negativas (ZATTA, *et al* 2009).

Na última década, nota-se um aumento no número de publicações envolvendo essa espécie, impulsionado principalmente pelo grupo da Universidade Federal de Dourados - MS. Arena *et al* (2012) testaram a ação de *J. decurrens* sobre o desenvolvimento fetal e lactação em ratos. Através do modelo testado, observou-se adiantamento no desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos, porém sem efeitos observados na vida adulta dos animais. Em 2012, Santos *et al* atribuíram atividade anti-inflamatória à espécie, juntamente com o relato de que a DL₅₀ desse extrato é maior que 2.000 mg/kg. No ano seguinte, o mesmo autor publicou os resultados referentes ao ensaio subagudo, e não foram observados quaisquer sintomas de toxicidade nos parâmetros avaliados, em doses de 250, 500 e 1.000 mg/kg (SANTOS *et al*, 2013). Em outro estudo envolvendo o mesmo grupo, foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, onde se observou potencial

antioxidante nos dois modelos. Observou-se também a proteção de eritrócitos contra hemólise induzida e citotoxicidade em células de leucemia K562 (CASAGRANDE, 2014).

1.3. *Piper umbellatum* L.

Esta espécie pertence à família Piperaceae e apresenta como sinônimos de *Piper umbellatum* L.: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., *Lepianthes umbellata* (L.) Raf., *Heckeria umbellata* (L.) Kunth, *Peperomia umbellata* (L.) Kunth, *Peperidia umbellata* (L.) Kostel., *Piper cuernavacatum* C. DC., *Piper postelsianum* Maxim., *Piper subpeltatum* Willd., *Pothomorphe dombeyana* Miq. e *Pothomorphe subpeltata* (Willd.) Miq.. (IPNI, 2015; The Plant List, 2015). A aparência de suas partes aéreas pode ser vista na **Figura 1.3**.

Figura 1.3 - Partes aéreas de *P. umbellatum* (HERNANDES, L.S.; 2008).

P. umbellatum também tem o uso como agente antiúlcera relatado pela população (BALBACH, 1971). Através de trabalhos científicos, atividades relacionadas à ação antiúlcera foram atribuídas à pariparoba (seu nome popular), como a atividade antioxidante (AGBOR *et al*, 2007; BARROS *et al*, 1996; DESMARCHELIER *et al*, 1997; TABOPDA *et al*, 2008). O extrato bruto das partes aéreas apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória, com efeito semelhante à indometacina, porém em doses maiores (PERAZZO *et al*, 2005). Um composto isolado de suas partes aéreas (*N*-benzoilmescalina) apresentou significativa atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Helicobacter pylori* (ISOBE *et al*, 2002).

Nos últimos anos, novos estudos foram feitos aprofundando os dados sobre a já

conhecida atividade antioxidante da espécie. Fernandes *et al* (2013) encontraram atividade antioxidante em membranas fosfolipídicas e lipossomos, além de atestar que enquanto o α -tocoferol captura um radical de DPPH por molécula, o 4-NC (4-nerolidilcatecol, principal metabólito secundário de *P. umbellatum*) captura dois por molécula. Em 2011, Costa *et al* observaram que outras moléculas além do 4-NC apresentam atividade antioxidante. Ao elaborar o extrato com auxílio de ultrassom, estes apresentavam menor conteúdo de 4-NC, porém uma atividade antioxidante mais pronunciada. Lopes *et al*, em 2012, atestaram que o extrato etanólico de partes aéreas apresenta maior atividade antioxidante que o 4-NC, confirmando os resultados obtidos por Costa *et al* (2011).

Tais descobertas colaboram para o interesse na busca por frações ou moléculas que apresentem ação antiúlcera, já que a atividade antioxidante participa dos mecanismos envolvidos. Uma extensa revisão sobre a espécie *P. umbellatum*, pode ser encontrada na dissertação de mestrado de Hernandes, de 2010. Durante o mestrado, foi constatada atividade antiúlcera a partir de extratos e frações de raízes dessa espécie. Optou-se então por continuar a trabalhar com a pariparoba, dando andamento ao desenvolvimento de uma formulação que ainda não havia sido testada para gastroproteção.

1.4. Úlcera gástrica

Optou-se por escrever um resumo sobre úlcera gástrica para auxiliar na leitura deste trabalho. Na dissertação de mestrado de Hernandes (2010) encontra-se disponível uma revisão mais aprofundada sobre úlcera gástrica e mecanismos envolvidos. Úlceras pépticas são lesões crônicas. Embora possam ocorrer em qualquer porção do trato gastrintestinal, a grande maioria se localiza no duodeno e estômago. Diferenciam-se das gastrites, que são de forma genérica, inflamações na mucosa gástrica, podendo ser acompanhadas por hemorragias e erosão da mucosa, uma destruição dos tecidos que não chega a atingir a camada muscular (KUMAR *et al*, 2010). A principal diferença entre uma úlcera e a erosão da mucosa, é que a úlcera penetra nas camadas musculares, enquanto que a erosão causada por gastrite, não (TARNAWSKI *et al*, 2013).

Úlceras são geradas por um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa da

mucosa gástrica e forças lesivas, particularmente a secreção ácida e a pepsina. Entretanto, hiperacidez não é um requisito, já que apenas uma minoria dos pacientes com úlcera gástrica apresenta essa característica (embora quando presente é um fator fortemente ulcerogênico). Preferencialmente, as úlceras ocorrem quando as defesas da mucosa colapsam, quando o fluxo sanguíneo da mucosa se reduz, quando o esvaziamento gástrico é retardado ou a restituição epitelial está debilitada (KUMAR *et al*, 2010).

A infecção por *H. pylori* é um fator preponderante na patogênese de úlcera péptica. Está presente em praticamente todos os pacientes com úlcera duodenal e em aproximadamente 70% daqueles com úlcera gástrica. Outros fatores como anti-inflamatórios não esteroidais, ou AINEs (impedem a produção de prostaglandinas), cigarro (compromete o fluxo sanguíneo e cicatrização) e estresse psicológico também contribuem para a formação de úlceras (KUMAR *et al*, 2010). Segundo estudos epidemiológicos, as duas principais causas de úlcera são a infecção por *H. pylori* e o uso de AINEs (CHOUDHARY e SINGH, 2014). Além desses fatores, as espécies reativas de oxigênio também apresentam participação na patogênese da úlcera gástrica. Quando há o aumento de ânions superóxido, radicais hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica, há a indução de estresse oxidativo intracelular levando à formação de lesões (REPETTO e LLESUY, 2002).

1.5. Formulações de nanocápsulas e extratos vegetais

Com a nanotecnologia, novas possibilidades têm surgido no horizonte do desenvolvimento de formulações. Através desses avanços, espera-se adquirir um maior controle e melhora nas propriedades das formas farmacêuticas, ao alterar parâmetros de solubilidade, biodisponibilidade e direcionamento do fármaco aos seus alvos biológicos (SARAF, 2010).

Quando se trabalha com extratos vegetais, adicionam-se desafios relacionados à diversidade da composição química. É mais difícil padronizar formulações que contêm várias espécies químicas com diferenças em suas propriedades. Mesmo incorporar ou dispersar a dose correta na forma farmacêutica pode se tornar complicado. Nesse sentido, a nanotecnologia torna-se útil também ao uso de extratos vegetais, ao permitir a presença de partículas menores, ainda que em suspensão,

auxiliando na padronização e até na vida útil de formulações que utilizam esses princípios ativos. Juntamente com a observação das alterações na performance do fármaco em questão, são aspectos indispensáveis para garantir a eficácia e segurança da formulação (YADAV *et al*, 2014).

Muitos compostos ativos como flavonoides, taninos e outros na forma de glicosídeos podem apresentar boa solubilidade em água, mas muitas vezes apresentam baixa absorção, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia. Outros podem apresentar baixa solubilidade e também problemas em sua absorção. Sistemas nanoestruturados têm o potencial de controlar a liberação, reduzir a quantidade necessária de ativo para atingir a eficácia. Podem ainda direcionar a molécula para o sítio de ação desejado (BONIFÁCIO *et al*, 2014).

Dentre as diversas formas de utilizar a nanotecnologia, estão as nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona), polímero biocompatível e biodegradável - propriedades que favorecem sua utilização na indústria farmacêutica. As nanocápsulas constituídas por esse composto apresentam núcleo lipofílico e podem alterar as propriedades farmacotécnicas e farmacológicas, ao prolongar a liberação e melhorar a estabilidade dos fármacos (POHLMANN, 2013).

2. Objetivos

Utilizando técnicas de fitoquímica pretende-se obter um perfil cromatográfico das espécies *Jacaranda decurrens* e *Jacaranda caroba* com a finalidade de colaborar para futura padronização e controle de qualidade dos extratos e formulações provenientes das mesmas.

Através de experimentos *in vivo* e *in vitro*, deseja-se obter uma avaliação da atividade antiúlcera das espécies. Paralelamente espera-se obter informações sobre a toxicidade e a citotoxicidade do extrato de *J. caroba*.

Com o desenvolvimento de uma suspensão de nanocápsulas contendo extratos e frações de *Piper umbellatum*, visa-se à obtenção de parâmetros farmacotécnicos, além de uma comparação frente ao extrato e frações quanto à ação antiúlcera.

PARTE I

**Farmacologia e fitoquímica de *Jacaranda decurrens* Cham.
e *Jacaranda caroba* (Vell.) DC.**

3. Metodologia

3.0. Obtenção do material vegetal

Folhas de espécimes de *J. decurrens* foram fornecidas pela Universidade Federal de Dourados (MS), coletadas sob coordenadas 22° 02' 49.1" S 055° 08' 11.4" W, foi depositada exsicata no herbário DDMS/UFGD sob o nº 2322. Folhas de *J. caroba* foram coletadas em São Paulo (SP), na Cidade Universitária, sob coordenadas 23°33'54.7"S 46°43'54.6"W. Em seguida, foram obtidas folhas de *J. caroba* provenientes de Araxá (MG), cuja exsicata encontra-se em fase de registro no Herbário do Instituto de Biociências da USP, depositadas no dia 09/05/2013 e coletadas em 02/05/2013 por Pereira. Adicionalmente, foram coletadas folhas de *J. caroba* em Pirassununga (SP). Todas as amostras de *J. caroba* foram identificadas pela Profa. Dra. Lúcia Garcez Lohmann (IB/USP). O material vegetal foi seco em estufa com ventilação forçada, sob temperatura máxima de 40° C.

3.1. Preparo do extrato bruto liofilizado e frações

As folhas foram pulverizadas em moinho de facas e martelos de marca Thomas®, passando por tamis de tamanho apropriado (1 mm). O extrato bruto liofilizado foi elaborado através de percolação com etanol 70%, segundo a Farm. Bras. 2.ed. (1959), método A, de forma adaptada, já que o extrato foi recolhido uma única vez. Posteriormente o etanol foi retirado em evaporador rotatório IKA RV 10 à temperatura de 40° C e pressão reduzida. A água residual foi removida por liofilização (liofilizador Edwards®, modelo LK4).

Para o fracionamento, para cada grama do EB foram adicionados 10 mL de clorofórmio. A mistura foi mantida em agitador magnético por 30 min, à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada. O filtrado (fração clorofórmica) foi concentrado em evaporador rotatório. Ao resíduo do papel de filtro foram adicionados 10 mL (por grama de extrato) de acetato de etila e mantidos em agitador magnético por mais 30 min, repetindo o procedimento anterior para a obtenção da fração concentrada. Foram realizadas ainda extrações com etanol e etanol 50% em água, sendo o último extrato concentrado e a água retirada por liofilização. Nas frações

concentradas, o solvente foi removido inicialmente por evaporação à temperatura ambiente (em capela) por 48 h e em seguida com auxílio de nitrogênio comprimido por 2 h.

3.2. Caracterização fitoquímica

A caracterização fitoquímica dos extratos e frações utilizados para o desenvolvimento do trabalho foi realizada através de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas detalhadas a seguir:

3.2.1. Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada com os extratos brutos liofilizados de *J. caroba*, e *J. decurrens*. Os métodos empregados foram descritos por Costa (1994). Foram realizados ensaios para a detecção de: alcaloides, antraderivados, flavonoides, taninos, saponinas e óleo essencial.

3.2.2. Quantificação de flavonoides e determinação de fenólicos totais

Para a quantificação de flavonoides, o experimento foi realizado segundo método de Noriega *et al* (2012). Para a curva de calibração, foram preparadas soluções mãe de quercetina a 200 µg/mL, diluídas para obter concentrações de 150, 125, 100, 75, 50 e 30 µg/mL. Para o extrato de *J. decurrens*, foram preparadas soluções mãe a 10 mg/mL e para *J. caroba*, 4 mg/mL. Em placas de 96 poços, foram adicionadas as soluções da curva, rendendo concentrações finais de 2,4; 4; 6; 8; 10 e 12 µg/mL. De maneira análoga, o extrato de *J. decurrens* foi diluído para 0,8 mg/mL e o de *J. caroba* para 0,32 mg/mL. Foi utilizado o complexante AlCl₃ (2% m/v) com 30 minutos de tempo de reação. Todas as soluções foram preparadas com etanol 60%, em triplicata. A leitura foi realizada a 427 nm em espectrofotômetro Biotek Microplate reader Synergy HT®, conforme esquema disposto na **Tabela 3.1**, a seguir:

Tabela 3.1 - Esquema de preparo da placa para quantificação de flavonoides em extratos de *J. decurrens* e *J. caroba*.

	Curva de calibração (μL)	Amostra do extrato (μL)	Branco do extrato (μL)	Branco (μL)
quercetina	20	-	-	-
extrato <i>J. caroba</i>	-	20	20	-
etanol 60%	210	210	230	230
AlCl_3	20	20	-	20

As substâncias foram adicionadas na ordem em que estão dispostas na tabela, de cima para baixo.

Para a determinação de fenólicos totais, o protocolo foi realizado de maneira semelhante (AINSWORTH & GILLESPIE, 2007), porém com soluções dos extratos e curva de calibração preparados com etanol a 10%. As soluções mãe de *J. decurrens* foram preparadas a 250 $\mu\text{g/mL}$, com concentração final na placa de 25 $\mu\text{g/mL}$ e *J. caroba*, 625 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A curva de calibração foi construída com soluções mãe de ácido gálico a 100 $\mu\text{g/mL}$, diluídas para concentrações de 85, 75, 65, 55, 45, 35 e 25 $\mu\text{g/mL}$, e na placa para 8,5; 7,5; 6,5; 5,5; 4,5; 3,5; e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Para a colorimetria foi utilizado o reagente de Folin-Denis (Sigma-Aldrich®) seguido de solução saturada de Na_2CO_3 em água, com tempo de reação de 2 h, e a leitura foi realizada a 760 nm, conforme descrito na **Tabela 3.2**:

Tabela 3.2 - Esquema de preparo da placa para determinação de fenólicos totais em extratos de *J. decurrens* e *J. caroba*.

	Curva de calibração (μL)	Amostra do extrato (μL)	Branco do extrato (μL)	Branco (μL)
ácido gálico	20	-	-	-
extrato	-	20	20	-
água	30	30	180	50
Folin-Denis	50	50	-	50
Na_2CO_3	100	100	-	100

As substâncias foram adicionadas na ordem em que estão dispostas na tabela, de cima para baixo.

3.2.3 Cromatografia em Camada Delgada

Foi determinado o perfil cromatográfico em camada delgada dos extratos e frações de *J. decurrens* e *J. caroba*. Através dos sistemas utilizados, descritos por Wagner e Bladt (1996), delineou-se o perfil e a presença de substâncias de interesse através de comparação com padrões. As melhores separações entre as condições testadas foram obtidas com os sistemas a seguir:

Placa para CCD: Sílica Gel 60 F254 Merck.

Saturação da cuba: total.

Percurso: 12 cm.

Sentido: ascendente.

Identificação de alcaloides:

Padrão: extrato de quina, preparado segundo método de Costa, 1994, para a identificação de alcaloides.

Fase móvel: tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10).

Revelador: reagente de Dragendorff.

Visualização: luz visível.

Identificação de glicosídeos cardiotônicos:

Padrão: extrato de espirradeira, preparado segundo método de Costa, 1994, para a identificação de glicosídeos cardiotônicos.

Fase móvel: acetato de etila: metanol: dietilamina: água (81:11:8).

Revelador: reativo de Kedde, seguido de NaOH a 2 mol/L.

Visualização: luz visível.

Identificação de flavonoides:

Padrões: rutina e quercetina.

Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26).

Revelador: difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (NP).

Visualização: luz visível e UV a 366 nm.

3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A partir dos resultados obtidos com a CCD, os extratos e frações de *J. caroba* e *J. decurrens* também foram analisados por CLAE, utilizando equipamento Shimadzu® com bombas LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m.

Para as análises iniciais foi utilizado sistema gradiente, 5-100% B (ACN em H₂O + TFA 0,1%) em 60 minutos. O detalhamento da composição foi direcionado para a amostra mais ativa contra *Helicobacter pylori* (Item 4.3.4), a fração hidroetanólica do extrato de *J. caroba*.

Como o sistema de CLAE semipreparativo possui apenas uma bomba, foi desenvolvida uma eluição isocrática para a separação dos compostos, com melhor separação em 35% metanol em água com TFA a 0,1% e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m.

O sistema de CLAE semipreparativo é composto por equipamento Shimadzu®, com bomba LC-6AD, loop de 1.000 μ L, detector UV-Vis SPD-20A, fluxo de 10 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack PREP-ODS de 250 mm x 20 mm, tamanho de partícula de 5 μ m.

Para o sistema analítico, as amostras foram diluídas a 1 mg/mL, para o semipreparativo, 50 mg/mL. Todas dissolveram em metanol, exceto a fração hidroetanólica de *J. caroba* de Araxá (metanol : água, 1:1). As análises foram monitoradas a 254 nm.

3.3. Farmacologia direcionada à atividade antiúlcera

Para a determinação da atividade antiúlcera foram utilizados modelo de gastroproteção *in vivo* juntamente com ensaio *in vitro* antimicrobiano anti *Helicobacter pylori*. Os métodos estão detalhados a seguir.

3.3.0. Animais

Para os experimentos relativos à atividade antiúlcera e à toxicologia aguda,

foram utilizadas fêmeas - *Rattus norvegicus* (albino) - da linhagem Wistar Hannover (HanTac, FCFIQ/USP: WH), de 6 a 8 semanas de idade e pesando entre 150 e 180 g. Para o ensaio de toxicologia subaguda, foram utilizados machos e fêmeas da mesma espécie supracitada. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura (22 ± 2)° C e umidade controlada. Para adaptação, os animais permaneceram no local do experimento durante os 7 dias anteriores ao ensaio. Na véspera dos ensaios, foram submetidos a jejum suficiente para promover esvaziamento gástrico. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF-USP, em 05 de novembro de 2012, sob Protocolo CEUA n° 384, Ofício CEUA n° 112/2012.

3.3.1. Atividade gastroprotetora

A partir do modelo proposto por Mizui e Doteuchi (1983), foram ensaiados grupos com 7 animais cada, sendo um para controle negativo (água), um controle positivo (lansoprazol a 30mg/kg, cimetidina a 100 mg/kg ou cloprostenol a 150 µg/kg) e grupos para doses de extrato de *J. decurrens* e *J. caroba* proveniente de três regiões (50, 100, 200 ou 400 mg/kg). A administração aos ratos Wistar foi feita por via oral. O extrato foi ressuspenso em água destilada, com volume administrado de 10 mL/kg. Após 30 minutos, ácido clorídrico a 0,3 mol/L em etanol 60% foi administrado oralmente, com o mesmo volume da gavagem anterior. Uma hora após a administração do indutor, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, prensados entre placas de vidro e copiados por *scanner* para o computador. A área das ulcerações foi medida através do software *Image-Pro Plus*®.

3.3.2. Concentração Inibitória Mínima do crescimento de *Helicobacter pylori*

Esse experimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Microbiologia da FCFar/UNESP em Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Taís Maria Bauab. Foi utilizada técnica de microdiluição para determinar valores de CIM com cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504. *Helicobacter pylori* foi inoculado em placas de ágar

Mueller-Hinton contendo 5% de sangue bovino e incubadas a 36 °C por 72 h, em atmosfera de CO₂ a 10%. Inóculos foram preparados no mesmo meio com densidade ajustada para padrão de McFarland igual a 2.0. A suspensão para o micro-organismo foi diluída em 1:10 e um volume de 100 µL foi adicionado a cada poço da microplaca, em seguida foram adicionados mais 100 µL de caldo Mueller-Hinton suplementado com soro bovino fetal a 10%. As soluções para cada extrato ou fração foram preparadas em DMSO 20%. Concentrações de 0,5 a 1000 µg/mL foram obtidas por 100 µL da fração transferidos para o primeiro poço de cada coluna e diluídos serialmente. Amoxicilina foi utilizada como controle e as CIMs foram obtidas após incubação das microplacas a 36 °C por 72 h em atmosfera de CO₂ a 10%. As CIMs foram determinadas como a menor concentração onde não foi observado crescimento. A leitura é facilitada pela adição de 20 µL de solução de resazurina (100 µg/mL) em cada poço, com incubação por 2 h. A coloração rosa indica crescimento e o azul indica que não houve crescimento bacteriano (SILVA *et al*, 2015).

3.4. Avaliação toxicológica do extrato de *Jacaranda caroba*

As técnicas descritas abaixo foram selecionadas para fornecer parâmetros que possam auxiliar na determinação da segurança de uso dessa e de outras possíveis formulações que porventura utilizem essa espécie.

3.4.1. Toxicidade aguda por administração oral de dose única

Utilizou-se o procedimento descrito na Guideline 425 da OCDE (2008), que consiste em administração oral de dose única. Foi escolhido o teste limite, por se tratar de planta tradicionalmente consumida e sem relatos de toxicidade associados. O primeiro animal recebeu uma única vez o extrato de *J. caroba* por gavagem na dose de 5.000 mg/kg, sendo observado por um período de 48 horas. Como o animal sobreviveu, a mesma dose foi administrada para um próximo animal também seguido de observação. Caso houvesse morte, a dose seria reduzida. Sucessivamente, a mesma dose foi administrada a mais três animais (completando um grupo de cinco). Este procedimento é realizado dessa maneira visando a utilização do menor número de animais possível. Cada componente do grupo foi observado por 14 dias para

sintomas de toxicidade e morte e, ao final deste prazo, eutanasiado por punção na aorta abdominal sob anestesia, tendo seus órgãos (coração fígado, rins e pulmões) coletados. O grupo controle foi composto por 5 animais, que receberam água, via gavagem. Foi registrado o consumo de água e alimento por grupo, além de variações no peso dos animais e alterações no coração, pulmão, rins, fígado e baço. Foram observadas as seguintes alterações: na pele e pelagem, olhos e membranas mucosas, respiratórias, circulatórias, sistema nervoso autônomo e central, atividade somatomotora e padrão de comportamento. Em especial: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma.

3.4.2. Toxicidade subaguda por administração oral de doses repetidas

Os animais receberam por gavagem extrato de *J. caroba* nas doses de 400, 800 e 1.200 mg/kg ou água (grupo controle), durante 28 dias. Cada animal foi observado duas vezes ao dia quanto a ocorrência de sintomas toxicológicos. Ao final do ensaio, sob anestesia, o sangue dos animais foi coletado por punção na aorta abdominal (com consequente eutanásia) para ser submetido a testes hematológicos. Os principais órgãos foram removidos e analisados macroscopicamente. Foram registrados o consumo de água e alimento dos grupos, bem como alterações no peso dos animais e no coração, pulmão, rins, fígado e baço. Foram observadas as seguintes alterações: na pele e pelagem, olhos e membranas mucosas, respiratórias, circulatórias, sistema nervoso autônomo e central, atividade somatomotora e padrão de comportamento. Em especial: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma (Guideline 407 de 2008 da OCDE).

3.4.3. Avaliação da mutagenicidade

A avaliação da mutagenicidade foi realizada em parceria com o Laboratório de Mutagênese da FCFar/UNESP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda e supervisão da Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende. Foi efetuado ensaio de Salmonella/Microsomo, utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA97a e TA102, gentilmente cedidas pelo Dr. B. N. Ames (Berkeley, CA,

USA), com (+S9) e sem (-S9) metabolização pelo método de pré-incubação. As cepas de culturas congeladas foram incubadas por 12-14 h em Caldo Nutriente Oxoid nº 2. A mistura de ativação metabólica (S9) foi preparada imediatamente antes de cada teste. O extrato de *Jacaranda caroba* foi diluído a 150 mg/mL em DMSO. A alta concentração foi escolhida devido à ausência de sintomas tóxicos nos ensaios *in vivo*. Nas placas foram utilizadas concentrações variando de 1,9 a 15,0 mg/placa. Às diferentes concentrações foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato a 0,2 M, ou 0,5 mL da mistura S9 a 4% S9, com 0,1 mL de cultura bacteriana e incubados a 37 °C por 20 - 30 min. Em seguida, 2 mL de ágar de superfície foram adicionados e a mistura foi colocada em uma placa contendo ágar mínimo. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e as colônias revertentes foram contadas visualmente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados com a ferramenta estatística Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, version 1.0, from Research Triangle Institute, RTP, NC, USA). Os dados (revertentes/ placa) foram analisados através de ANOVA, seguida de regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado para cada concentração testada, representando a média de revertentes por placa do extrato dividida pela média de revertentes por placa no controle negativo. Uma amostra é considerada mutagênica quando se observa uma relação dose resposta e duplicação no número de revertentes ($IM \geq 2$) ocorre em pelo menos uma concentração. Os agentes mutagênicos utilizados como controle positivo nos experimentos sem S9 foram nitro-o-fenilenodiamino (10 µg/placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para TA102. Nos experimentos com ativação S9, foram utilizados 2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/placa) para TA102. DMSO (50 µL/placa) foi utilizado como controle negativo (RESENDE *et al*, 2012).

3.4.4. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade do extrato de *Jacaranda caroba* também foi avaliada em parceria com o Laboratório de Mutagênese da FCFar/UNESP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda e supervisão da Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende.

A citotoxicidade do extrato de *J. caroba* foi medida em células Hep G2. As células foram incubadas a 37 °C com CO₂ a 5% em placas com superfície de 12.50 cm² em 10 mL de DMEM (Gibco/BRL) suplementados com FBS (Gibco/BRL) a 10% (v/v), 100 µg mL⁻¹ de penicilina e 10 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Gibco/BRL).

Esta técnica consiste em coletar as células utilizando uma solução tripsina-EDTA (Gibco/BRL), centrifugar (212 G por 5 min), contar o número de células em câmara de Neubauer e ajustar a concentração para 7.5×10^4 células/mL em DMEM. A seguir, 200 µL da suspensão foram depositados em cada poço de uma microplaca de 96 poços, obtendo uma concentração celular de 1.5×10^4 células/poço e incubados a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5% por 24 horas para permitir a adesão das células à placa. Diluições das amostras foram preparadas para obter concentrações de 39,06 a 10.000 µg/mL. As diluições foram adicionadas às células após a remoção do meio e células não aderidas e incubadas novamente por 24 e 48 horas. A citotoxicidade foi determinada pela adição de 50 µL de resazurina e lidas após incubação por 2 horas. A viabilidade celular pode ser indicada pela respiração celular, detectada pela redução de resazurina a resorufina, cuja cor rosa indica viabilidade celular. A cor azul persistente de resazurina é sinal de morte celular (AHMED *et al*, 1994). A leitura foi realizada em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®) utilizando filtros de excitação e emissão de 530 e 590 nm, respectivamente. A viabilidade celular foi calculada pela porcentagem de redução da resazurina, utilizando a seguinte equação: Redução da resazurina (%) = [(valor experimental - valor do Controle negativo) / (valor de 100% de redução do controle positivo - valor do controle negativo)] x 100. O controle negativo é o próprio meio de cultura, o positivo é DMSO 30%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. Análise estatística

Os resultados dos experimentos antiúlcera, mutagenicidade e toxicidade subaguda foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, com intervalo de confiança de 0,05%, seguidos pelo teste de Tukey. Os resultados do experimento de toxicidade aguda foram analisados pelo teste t de Student.

4. Resultados

4.1. Preparo do extrato bruto e frações

Nas **Tabelas 4.1 e 4.2** foram organizados os dados referentes à quantidade obtida e rendimento dos extratos e frações de *J. decurrens* e *J. caroba* proveniente de Araxá. Os extratos das amostras de *J. caroba* provenientes de outras regiões foram preparados em menor quantidade e não tiveram seus rendimentos medidos. Após liofilizado o extrato de *J. decurrens* se apresentou na forma de pó, de cor castanho-avermelhada, com odor aromático. Os extratos de *J. caroba* apresentaram-se também na forma de pó com odor aromático, porém com granulação mais fina. A amostra proveniente de Araxá apresentou coloração dourada e a proveniente de Pirassununga, castanha. Por fim, a amostra de São Paulo apresentou cor verde.

Tabela 4.1 - Rendimento dos extratos brutos preparados a partir de folhas de *J. decurrens* e *J. caroba*.

Material	Massa de droga vegetal (kg)	Quantidade de solvente empregada (L)	Quantidade de liofilizado (kg)	Rendimento (%)
folhas <i>J. decurrens</i>	2,725	28	0,920	33,8
folhas <i>J. caroba</i>	0,881	10	0,230	26,1

Tabela 4.2 - Rendimento das frações preparadas com 35 g de extrato de folhas de *J. caroba* e 350 mL de cada solvente.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
clorofórmica	4,4862	12,8
acetato de etila	1,4082	4,0
etanólica	13,6368	39,1
hidroetanólica (50%)	11,2890	32,2
Total	30.8202	88,0

4.2. Caracterização fitoquímica

Foram obtidas diferentes informações fitoquímicas para os extratos e frações preparados, cujos resultados estão dispostos a seguir.

4.2.1. Triagem Fitoquímica

A maioria dos testes executados durante a triagem fitoquímica teve resultado positivo para ambas as espécies de *Jacaranda*, como pode ser visto na **Tabela 4.3**. Os testes foram negativos para a presença de alcaloides e óleo volátil. A diferença se nota na presença de antraquinonas em *J. decurrens* e ausência em *J. caroba*.

Tabela 4.3 - Resultados da triagem fitoquímica do extrato bruto de *J. caroba* e *J. decurrens*.

Grupo	Reação	<i>J. decurrens</i>	<i>J. caroba</i>
saponinas	espuma	positivo	positivo
antraquinonas	Bornträger	positivo	negativo
flavonoides	cloreto de alumínio	positivo	positivo
	hidróxidos alcalinos	positivo	positivo
	Shinoda	positivo	positivo
taninos	acetato de chumbo	positivo	positivo
	acetato de cobre	positivo	positivo
	cloreto férrico	positivo	positivo
	alcaloides	positivo	positivo
	gelatina	positivo	positivo
alcaloides	Dragendorff	negativo	negativo
	Bouchardat	negativo	negativo
	Bertrand	negativo	negativo
	Mayer	negativo	negativo
glicosídeos cardiotônicos	Liebermann-Buchard	positivo	positivo
	Kedde	positivo	positivo
	Keller-Kiliani	positivo	positivo
óleo volátil	microdestilação	negativo	negativo

4.2.2 Quantificação de flavonoides e determinação de fenólicos totais

Os dados obtidos no preparo da curva de calibração para a quantificação de flavonoides estão representados na **Figura 4.1** para *J. decurrens* e na **Figura 4.2** para *J. caroba*. Após cálculo pela equação da reta foi obtido o valor de $(8,57 \pm 0,03)$ mg.g⁻¹ equivalentes de quercetina, para o extrato bruto de *J. decurrens*. Para *J. caroba* foi obtido o valor de $(2,5 \pm 0,1) \times 10^1$ mg.g⁻¹ equivalentes de quercetina.

Figura 4.1 - Curva de calibração para a quantificação de flavonoides no extrato de *J. decurrens*.

No eixo x estão representadas as concentrações de quercetina e no y estão representadas as absorbâncias médias.

Figura 4.2 - Curva de calibração para a quantificação de flavonoides no extrato de *J. caroba*.

No eixo x estão representadas as concentrações de quercetina e no y estão representadas as absorbâncias médias.

Para a curva de calibração da determinação de fenólicos totais, os dados estão apresentados na **Figura 4.3**, e após cálculo pela equação da reta foi obtido o valor de $(1,95 \pm 0,02) \times 10^2 \text{ mg.g}^{-1}$ equivalentes de ácido gálico, para o extrato bruto de *J. decurrens*. Para *J. caroba*, foram obtidos $(9,4 \pm 0,1) \times 10^1 \text{ mg.g}^{-1}$ equivalentes de ácido gálico, conforme curva representada na **Figura 4.4**.

Figura 4.3 - Curva de calibração para a determinação de fenólicos totais no extrato de *J. decurrens*.

No eixo x estão representadas as concentrações de ácido gálico e no y estão representadas as absorbâncias médias.

Figura 4.4 - Curva de calibração para a determinação de fenólicos totais no extrato de *J. caroba*.

No eixo x estão representadas as concentrações de ácido gálico e no y estão representadas as absorbâncias médias.

4.2.3. Cromatografia em Camada Delgada

As melhores separações obtidas com os sistemas cromatográficos utilizados para a análise do extrato de *J. decurrens* são as representadas pela **Figura 4.5**.

Figura 4.5 - Cromatografia em camada delgada do extrato bruto de *J. decurrens*.

Placa para CCD Sílica Gel 60 F254 Merck. Saturação da cuba: total. Percurso: 12 cm, sentido: ascendente. **A** - Identificação de alcaloides. Padrão - extrato de quina (Q). Fase móvel: tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10). Revelador: reagente de Dragendorff. Visualização: olho nu. **B** - Identificação de glicosídeos cardiotônicos. Padrão: extrato de espirradeira. Fase móvel: acetato de etila: metanol: dietilamina: água (81:11:8). Revelador: reagente de Kedde, em seguida NaOH 2M. **C** e **D** - Identificação de flavonoides. Extrato bruto de *J. decurrens* (JD). Padrões: rutina (R) e quercetina (QC). Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26). Revelador: difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (NP). Visualização: luz visível (**C**) e UV a 366 nm (**D**).

Na **Figura 4.6** estão representadas as cromatografias para flavonoides correspondentes aos diferentes extratos de *J. caroba*, em comparação ao extrato de *J. decurrens* e às frações do extrato de *J. caroba*.

Figura 4.6 - Cromatografia em camada delgada dos extratos de *J. decurrens*, *J. caroba* e frações.

A e B – Extrato bruto de *J. decurrens* (JD) e de *J. caroba* proveniente de Araxá (AX), São Paulo (SP) e Pirassununga (PI) para a separação de flavonoides. **C e D** – Extrato bruto de *J. caroba* proveniente de Araxá (AX) e suas frações clorofórmica (CL), acetato de etila (AE), etanólica (ET) e hidroetanólica (HE), para a identificação de flavonoides. Placa para CCD Sílica Gel 60 F254 Merck. Saturação da cuba: total. Percurso: 12 cm, sentido: ascendente. Padrões: rutina (R) e quercetina (QC). Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26). Revelador: difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (NP). Visualização: luz visível (**A e C**) e UV a 366 nm (**B e D**).

4.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Através de análise por CLAE, foram obtidos cromatogramas de características qualitativas, com informações sobre as substâncias presentes nos extratos de *J. decurrens* e os diferentes extratos de *J. caroba* e suas frações. Por ter apresentado maior atividade anti *H. pylori* (**Item 4.3.4**), a fração hidroetanólica foi selecionada para ter suas substâncias identificadas. Os cromatogramas estão dispostos a seguir, da **Figura 4.7 à 4.14**. Os resultados da separação realizada em equipamento de CLAE semipreparativo, encontram-se disponíveis no **APÊNDICE A**.

Figura 4.7 - Cromatograma do extrato de *J. decurrens* (1 mg/mL em metanol), com destaque para a área com maior número de picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos.

Figura 4.8 - Cromatograma do extrato de *J. caroba* proveniente de São Paulo - SP (1 mg/mL em metanol), com destaque para a área com maior número de picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos.

Figura 4.9 - Cromatograma do extrato de *J. caroba* proveniente de Pirassununga - SP (1 mg/mL em metanol), com destaque para a área com maior número de picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos.

Figura 4.10 - Cromatograma do extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá - MG (1 mg/mL em metanol), com destaque para a área com maior número de picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos.

Figura 4.11 - Cromatograma da fração etanólica (1 mg/mL em metanol) obtida a partir do extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá - MG, com destaque para a área com maior número de picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos.

Figura 4.12. Cromatograma da fração hidroetanólica (1 mg/mL em metanol : água 1:1) obtida a partir do extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá - MG, com destaque para a área com maior número de picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos.

Figura 4.13. Cromatograma da fração hidroetanólica (1 mg/mL em metanol : água 1:1) obtida a partir do extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá - MG picos.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Eluição isocrática com MeOH em H₂O+TFA 0,1%, 35% B em 45 minutos. A marcação 1 e 2 corresponde aos picos que obtiveram melhor separação.

Figura 4.14a. Cromatograma da fração hidroetanólica (1 mg/mL em metanol : água 1:1) obtida a partir do extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá - MG, após otimização com troca de coluna.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Eluição isocrática com MeOH em H₂O+TFA 0,1%, 35% B em 45 minutos. A marcação 1 e 2 corresponde aos picos que obtiveram melhor separação.

Figura 4.14b. Análise dos picos com melhor separação a partir do cromatograma da fração hidroetanólica do extrato de *J. caroba*.

Acima, cromatograma dos picos em múltiplos comprimentos de onda simultâneos para auxiliar na avaliação da pureza. Abaixo, espectro UV-Vis (unidades de absorvância x comprimento de onda). A marcação 1 e 2 corresponde aos picos que obtiveram melhor separação pela análise do detector de arranjo de diodos.

4.3. Farmacologia direcionada à atividade antiúlcera

Os resultados obtidos na avaliação farmacológica dos extratos e frações de *Jacaranda* estão dispostos nos itens a seguir. Para facilitar a leitura, é conveniente frisar que o controle negativo se refere à ausência de tratamento (água). O controle positivo é o fármaco referência empregado.

4.3.1. Atividade gastroprotetora do extrato de *Jacaranda decurrens*

O extrato de *J. decurrens* não demonstrou atividade antiúlcera nas doses testadas através do modelo empregado, como pode ser visto na **Tabela 4.4** e na **Figura 4.15**. Nenhum grupo apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 4.4. Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de extrato de *Jacaranda decurrens*, em modelo de indução por etanol acidificado.

Grupo	ARL (%)
50 mg/kg	8 ± 2
100 mg/kg (n = 5)	7,4 ± 0,5
200 mg/kg	11 ± 4
água (n = 6)	7 ± 1
cimetidina	10 ± 3

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). A ANOVA seguida de Tukey não demonstrou diferença significativa entre os grupos, P < 0,05.

Figura 4.15. Gráfico representativo da Área Relativa de Lesão (em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda decurrens*, em modelo de indução por etanol acidificado.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). A ANOVA seguida de Tukey não demonstrou diferença significativa entre os grupos, P < 0,05.

4.3.2. Atividade gastroprotetora do extrato de *Jacaranda caroba* (São Paulo - SP)

O extrato de *J. caroba* proveniente de São Paulo não demonstrou atividade antiúlcera através desse modelo, como pode ser visto na **Tabela 4.5** e na **Figura 4.16**. Apenas o grupo de 100 mg/kg apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, com aumento da área de lesão .

Tabela 4.5. Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda caroba*, amostra de São Paulo, em modelo de indução por etanol acidificado.

Grupo	ARL (%)
50 mg/kg (n = 5)	14 ± 2
100 mg/kg (n = 5) ***	25,0 ± 0,9
200 mg/kg	15 ± 3
água (n = 6)	9 ± 3
cloprostenol (n=6)	0,5 ± 0,2

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo, *** P < 0,001.

Figura 4.16. Gráfico representativo da Área Relativa de Lesão (em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda caroba*, amostra de São Paulo, em modelo de indução por etanol acidificado.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo, *** P < 0,001.

4.3.3. Atividade gastroprotetora do extrato de *Jacaranda caroba* (Araxá - MG)

O extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá não demonstrou atividade antiúlcera através desse modelo, como pode ser visto na **Tabela 4.6** e na **Figura 4.17**. Apenas o controle positivo apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 4.6. Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda caroba*, amostra de Araxá, em modelo de indução por etanol acidificado.

Grupo	ARL (%)
50 mg/kg (n = 6)	14 ± 4
100 mg/kg	23 ± 6
200 mg/kg	15 ± 5
água (n = 5)	23 ± 3
cloprostenol *	0,8 ± 0,3

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo ** P < 0,01.

Figura 4.17. Gráfico representativo da Área Relativa de Lesão (em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda caroba*, amostra de Araxá, em modelo de indução por etanol acidificado.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo ** P < 0,01.

4.3.4. Atividade gastroprotetora de *Jacaranda caroba* (Pirassununga - SP)

O extrato de *J. caroba* proveniente de Pirassununga não demonstrou atividade antiúlcera através desse modelo, como pode ser visto na **Tabela 4.7** e na **Figura 4.18**. Apenas o controle positivo apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 4.7. Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda caroba*, amostra de Pirassununga, em modelo de indução por etanol acidificado.

Grupo	ARL (%)
50 mg/kg	9 ± 2
100 mg/kg	4,1 ± 0,8
200 mg/kg	8 ± 1
400 mg/kg	8 ± 2
água (n = 7)	11 ± 3
cloprostenol (n = 7) *	0,05 ± 0,03

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 8). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo ** P < 0,01.

Figura 4.18. Gráfico representativo da Área Relativa de Lesão (em %) de avaliação gastroprotetora de *Jacaranda caroba*, amostra de Pirassununga, em modelo de indução por etanol acidificado.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 8). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo ** P < 0,01.

4.3.4. Atividade anti *Helicobacter pylori*

Os dados referentes à análise da CIM contra *H. pylori* dos extratos e frações de *Jacaranda* encontram-se organizados na **Tabela 4.8**, a seguir. Apenas o extrato de *J. decurrens* e a fração clorofórmica do extrato de *J. caroba* não se mostraram ativos. O extrato de *J. caroba* de Araxá foi testado em outro experimento, em dias diferentes e consequentemente está separado na tabela com outro valor para o controle (amoxicilina).

Tabela 4.8. Determinação da atividade anti-*Helicobacter pylori* de extratos e frações de *J. decurrens* e *J. caroba*.

Tratamento	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>J. decurrens</i>	> 1000
<i>J. caroba</i> (São Paulo - SP)	1000
<i>J. caroba</i> (Pirassununga - SP)	250
<i>J. caroba</i> fração clorofórmica (Araxá - MG)	> 1000
<i>J. caroba</i> fração acetato de etila (Araxá - MG)	250
<i>J. caroba</i> fração etanólica (Araxá - MG)	125
<i>J. caroba</i> fração hidroetanólica (Araxá - MG)	125
amoxicilina (controle)	31,25
Tratamento	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>J. caroba</i> (Araxá - MG)	500
amoxicilina (controle)	15,0

Ensaio realizado em triplicata. Cepa *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Valores de Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g/mL}$.

4.4. Avaliação toxicológica do extrato de *Jacaranda caroba*

Os resultados da avaliação toxicológica do extrato de *Jacaranda caroba* estão dispostos nos itens a seguir.

4.4.1. Toxicidade aguda por administração oral de dose única

Durante os 14 dias de observação dos animais, não foi observado aparecimento de sintomas tóxicos em nenhum grupo, assim foi determinada $DL_{50} > 5.000 \text{ mg/kg}$. O

consumo de água também não demonstrou diferença entre os grupos, como explícito na **Figura 4.19**.

Figura 4.19. Consumo de água médio estimado em avaliação da toxicologia aguda de extrato de *J. caroba*.

Os valores (em mililitros) estão representados pelo consumo por gaiola, dividido pelo número de animais ($n = 5$).

O consumo de ração apresentou comportamento semelhante entre os grupos, conforme explícito na **Figura 4.20**.

Figura 4.20. Consumo de ração médio estimado em avaliação da toxicologia aguda de extrato de *J. caroba*.

Os valores (em gramas) estão representados pelo consumo por gaiola, dividido pelo número de animais ($n = 5$).

Na **Tabela 4.9** e **Figura 4.21** estão organizados os pesos relativos dos órgãos dos animais, que também não apresentaram diferença entre os grupos (teste t de Student, $P < 0,05$).

Tabela 4.9. Peso relativo dos órgãos (em % de massa corporal) em avaliação de toxicologia aguda de extrato de *Jacaranda caroba*, dose de 5.000 mg/kg.

Órgão	água	<i>J. caroba</i>
baço	0,27 ± 0,07	0,24 ± 0,01
coração e pulmões	1,00 ± 0,07	1,2 ± 0,1
fígado	5,2 ± 0,2	5,1 ± 0,1
rins	0,84 ± 0,03	0,87 ± 0,04

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 5). Teste t de Student não apresentou diferença entre os grupos, $P < 0,05$.

Figura 4.21. Gráfico representativo do peso relativo dos órgãos (em % de massa corporal) em avaliação de toxicologia aguda de extrato de *Jacaranda caroba*, dose de 5.000 mg/kg.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 5). Teste t de Student não apresentou diferença entre os grupos, $P < 0,05$.

4.4.2. Toxicidade subaguda por administração oral de doses repetidas

Durante os 28 dias de observação dos animais, não foi verificada a ocorrência de sintomas tóxicos nos grupos. Através das **Figuras 4.22a e 22b** observa-se que consumo de água foi aparentemente reduzido para os grupos que receberam doses do extrato, tanto em machos como fêmeas na segunda metade do experimento.

Figura 4.22a. Consumo de água médio estimado em avaliação da toxicologia subaguda de extrato de *J. caroba* em fêmeas de ratos Wistar.

Os valores (em mililitros) estão representados pelo consumo por gaiola, dividido pelo número de animais (n = 5).

Figura 4.22b. Consumo de água médio estimado em avaliação da toxicologia subaguda de extrato de *J. caroba* em machos de ratos Wistar.

Os valores (em mililitros) estão representados pelo consumo por gaiola, dividido pelo número de animais (n = 5).

Como demonstrado nas **Figuras 4.23a e 4.23b**, as fêmeas não mostraram alteração no padrão de alimentação em relação ao controle. Já os machos aparentemente reduziram o consumo de ração a partir da segunda metade do experimento, quando comparados ao controle.

Figura 4.23a. Consumo de ração médio estimado em avaliação da toxicologia subaguda de extrato de *J. caroba* em fêmeas de ratos Wistar.

Os valores (em gramas) estão representados pelo consumo por gaiola, dividido pelo número de animais ($n = 5$).

Figura 4.23b. Consumo de ração médio estimado em avaliação da toxicologia subaguda de extrato de *J. caroba* em machos de ratos Wistar.

Os valores (em gramas) estão representados pelo consumo por gaiola, dividido pelo número de animais ($n = 5$).

Nas **Tabelas 4.10a e 4.10b** e nas **Figuras 4.24a e 4.24b** estão organizados os pesos relativos dos órgãos dos animais.

Tabela 4.10a. Peso relativo dos órgãos (em % de massa corporal) em avaliação de toxicologia subaguda de extrato de *Jacaranda caroba* em fêmeas de ratos Wistar, doses de 400, 800 e 1200 mg/kg.

Órgão	400 mg/kg	800 mg/kg	1200 mg/kg	água
baço	0,305 ± 0,004	0,30 ± 0,02	0,302 ± 0,005	0,29 ± 0,01
coração e pulmões	1,05 ± 0,02 **	1,17 ± 0,05	1,18 ± 0,01	1,28 ± 0,02
fígado	4,75 ± 0,08 *	4,9 ± 0,2 *	4,09 ± 0,08	3,99 ± 0,07
rins	0,91 ± 0,02	0,87 ± 0,05	0,73 ± 0,01	0,79 ± 0,01

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 5). ANOVA: diferença em relação ao controle negativo * P < 0,05, ** P < 0,01.

Figura 4.24a Gráfico representativo do peso relativo dos órgãos (em % de massa corporal) em avaliação de toxicologia aguda de extrato de *Jacaranda caroba* em fêmeas de ratos Wistar, doses de 400, 800 e 1200 mg/kg.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 5). ANOVA: diferença em relação ao controle negativo * P < 0,05, ** P < 0,01.

Tabela 4.10b. Peso relativo dos órgãos (em % de massa corporal) em avaliação de toxicologia subaguda de extrato de *Jacaranda caroba* em machos de ratos Wistar, doses de 400, 800 e 1200 mg/kg.

Órgão	400 mg/kg	800 mg/kg	1200 mg/kg	água
baço	0,26 ± 0,01	0,260 ± 0,003	0,24 ± 0,01	0,233 ± 0,003
coração e pulmões	0,97 ± 0,01	0,97 ± 0,03	0,90 ± 0,01	1,039 ± 0,005
fígado	4,09 ± 0,05	4,14 ± 0,04	3,63 ± 0,04 **	4,21 ± 0,06
rins	0,84 ± 0,02	0,90 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,80 ± 0,01

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 5). ANOVA: diferença em relação ao controle negativo ** P < 0,01.

Figura 4.24b. Gráfico representativo do peso relativo dos órgãos (em % de massa corporal) em avaliação de toxicologia aguda de extrato de *Jacaranda caroba* em machos de ratos Wistar, doses de 400, 800 e 1200 mg/kg.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 5). ANOVA: diferença em relação ao controle negativo ** P < 0,01.

4.4.3. Avaliação da mutagenicidade

Os dados referentes à avaliação da mutagenicidade estão organizados na **Tabela 4.11**, a seguir.

Tabela 4.11. Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com extrato de *Jacaranda caroba*, em diferentes concentrações, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamentos		Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM			
		TA 98		TA 100	
mg/placa		- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0 ^a		26 ± 3	32 ± 3	111 ± 9	96 ± 8
1,9		27 ± 6 (1,0)	42 ± 3 (1,3)	124 ± 14 (1,1)	113 ± 22 (1,2)
3,7		28 ± 1 (1,1)	47 ± 4 (1,5)	135 ± 21 (1,2)	116 ± 12 (1,2)
7,5		27 ± 3 (1,0)	54 ± 6* (1,7)	126 ± 18 (1,1)	149 ± 20 (1,6)
11,2		29 ± 5 (1,1)	65 ± 4** (2,0)	154 ± 17 (1,4)	155 ± 18 (1,6)
15,0		35 ± 7 (1,4)	70 ± 1** (2,2)	159 ± 20 (1,4)	153 ± 13 (1,6)
C +		1321 ± 171 ^b	1761 ± 138 ^e	1181 ± 153 ^c	999 ± 110 ^e
		TA 102		TA 97a	
mg/placa		- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0 ^a		283 ± 51	336 ± 28	132 ± 19	153 ± 12
1,9		281 ± 28 (1,0)	379 ± 30 (1,1)	186 ± 14 (1,4)	213 ± 27 (1,4)
3,7		322 ± 37 (1,1)	359 ± 44 (1,1)	171 ± 28 (1,3)	190 ± 26 (1,2)
7,5		322 ± 33 (1,1)	363 ± 35 (1,1)	209 ± 39 (1,6)	253 ± 31 (1,6)
11,2		334 ± 24 (1,2)	335 ± 22 (1,0)	196 ± 26 (1,5)	207 ± 23 (1,4)
15,0		275 ± 31 (1,0)	372 ± 21 (1,1)	203 ± 21 (1,5)	169 ± 37 (1,1)
C +		1692 ± 184 ^d	1963 ± 206 ^f	1693 ± 179 ^b	2419 ± 154 ^e

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; ^acontrole negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 100 µL/placa; controle positivo (C+): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD – 10,0 µg/ placa – TA98); ^cazida sódica (AZS - 1,25 µg/placa – TA100); ^dmitomicina C (MMC - 0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/ placa – TA98, TA100); ^f2-aminofluoreno (2-AF - 10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

4.4.4. Avaliação da citotoxicidade

Os dados obtidos na avaliação da citotoxicidade estão organizados na **Figura 4.25**. Experimentalmente, a IC_{50} tem valor estimado entre 0,31 e 0,62 mg/mL, que foram os valores que promoveram viabilidade de 40% e 73%, respectivamente.

Figura 4.25. Gráfico referente à avaliação da citotoxicidade do extrato de *J. caroba* em células Hep G2.

5. Discussão

Os diferentes extratos de *J. caroba* e *J. decurrens* desde o início sugerem alguma variação em sua composição química por apresentarem colorações bem diferentes entre si. Os espécimes coletados na Cidade Universitária, em São Paulo, eram mais jovens, fato que explica as folhas mais verdes, assim como seu extrato.

A triagem fitoquímica evidencia algumas dessas diferenças, apesar de não ter sido feita para cada amostra. As amostras de *J. decurrens* testaram positivo para antraquinonas através da reação de Bornträger, diferente da amostra de *J. caroba*.

Os testes realizados na triagem fitoquímica revelaram a presença de estruturas de glicosídeos cardiotônicos em ambas as amostras, no entanto, ao realizar a cromatografia em camada delgada, não foram revelados esses tipos de compostos em comparação com extrato de espirradeira. Esse fato se explica através da característica do teste (COSTA, 1994), já que as reações da triagem são específicas para cada parte da molécula (núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, anel lactônico pentagonal insaturado e desoxioses), sugerindo que no extrato há compostos com estruturas semelhantes às partes das moléculas de glicosídeos cardiotônicos, mas provavelmente de maneira individual ou constituindo outras estruturas.

Guimarães *et al* (2008) avaliaram a presença de terpenoides em CCD de *Jacaranda caroba*, para posterior análise por CG. Com os extratos testados não houve a busca por esse tipo de substâncias. Ferreres *et al* (2013) também constataram a presença de compostos fenólicos.

A quantificação de flavonoides e compostos fenólicos totais apresentou valores próximos aos encontrados na literatura para outras espécies do mesmo gênero e família. Zatta (2009) relatou o valor de 0.535% de flavonoides nas folhas de *J. decurrens*. Rana *et al* (2013) encontraram valores entre 4 e 55 mg.g⁻¹ equivalentes de quercetina para flavonoides totais e 58 e 180 mg.g⁻¹ equivalentes de ácido gálico para fenólicos totais em folhas de *Jacaranda mimosifolia*, dependendo do solvente utilizado para a extração; sendo que os valores mais altos foram obtidos com butanol. Os outros solventes utilizados foram clorofórmio e água. Nagaraja *et al* (2011) realizaram quantificação de flavonoides e fenólicos totais em caule de *Millingtonia hortensis*, outro exemplar da família Bignoniaceae, também utilizando diferentes solventes.

Encontraram valores entre 4,98 e 64,92mg.g⁻¹ equivalentes de rutina para flavonoides totais e 7,42 e 144 mg.g⁻¹ equivalentes de ácido gálico para fenólicos totais, sendo que os valores mais altos foram os obtidos com extração por metanol. Abaixo, na **Tabela 5.1**, encontram-se os valores obtidos em comparação com experimento realizado de maneira semelhante.

Tabela 5.1. Comparação entre valores obtidos com dados da literatura para a quantificação de flavonoides e fenólicos totais em espécies do gênero *Jacaranda*.

Reação	<i>J. decurrens</i>	<i>J. caroba</i>	<i>J. mimosifolia</i> (RANA <i>et al</i> , 2013)
flavonoides (mg.g ⁻¹ equivalentes de quercetina)	8,56 ± 0,03	(2,5 ± 0,1) x 10 ¹	4 a 55
fenólicos (mg.g ⁻¹ equivalentes de ácido gálico)	(1,93 ± 0,02) x 10 ²	(9,3 ± 0,1) x 10 ¹	58 a 180

Em nossos cromatogramas em camada delgada foi constatada a presença de diversas bandas relativas a flavonoides, inclusive com Rf semelhantes aos padrões rutina (0,45) e quercetina (0,95), sugerindo a presença de substâncias com estrutura e polaridade semelhantes nos extratos. De maneira análoga, sugere-se que caso haja presença de alcaloides ou glicosídeos cardiotônicos estes estariam presentes em concentrações muito baixas, já que também não foram detectados durante a triagem fitoquímica.

A cromatografia em camada delgada confirma as diferenças observadas quanto ao aspecto mais verde do extrato de *J. caroba* coletado no Butantã, em São Paulo. Na região onde se concentram os compostos mais apolares, como a clorofila, aparecem manchas vermelhas mais intensas que as observadas nas outras amostras. E enquanto as outras duas amostras de *J. caroba* e a amostra de *J. decurrens* apresentam duas bandas intensas (sendo que a banda superior se divide em duas cores) ao centro da placa (Rf = 0,45 e 0,55), a amostra constituída por plantas mais jovens apresenta uma banda intensa adicional entre essas duas (Rf = 0,50), enquanto que a banda superior aparece menos destacada.

Através da análise por CCD, na **Figura 4.6**, evidencia-se a eficiência do fracionamento do extrato de *J. caroba*. É possível observar um gradiente de intensidade das bandas da região mais apolar (ao alto da placa) para a mais polar, conforme as amostras aumentam de polaridade, proporcional ao rendimento obtido

com o fracionamento, conforme consta na **Tabela 4.2**. A fração etanólica é a que mais se aproxima do extrato em composição, porem revela mais bandas, já que as bandas mais intensas também foram extraídas na fração anterior, diminuindo sua proporção nessa fração. A proximidade entre a composição, deve-se ao fato que o extrato foi preparado com etanol 70%, logo apresenta boa solubilidade em etanol. Pelo mesmo motivo, essa foi a fração que obteve melhor rendimento.

Os resultados obtidos através da análise por CLAE confirmam as informações fornecidas pela CCD e as complementam. Na **Tabela 5.2**, encontra-se um resumo dos tempos de retenção e área dos principais picos que apareceram nos cromatogramas. As amostras de *J. caroba* de Pirassununga e de Araxá apresentam perfil cromatográfico muito parecido, com os dois picos mais intensos em 254 nm apresentando praticamente a mesma proporção de área entre si. O extrato da amostra de Pirassununga apresenta picos mais intensos na região das moléculas mais polares. A amostra de São Paulo forneceu o cromatograma com mais picos, sugerindo uma composição mais complexa, ou com proporções mais equilibradas entre os compostos presentes. Em concordância com a CCD, aparecem três picos intensos ao invés dos dois característicos das outras amostras. Através de seu cromatograma, o extrato de *J. decurrens* demonstra certa similaridade com os extratos de *J. caroba*, assim como observado na CCD.

As frações etanólica e hidroetanólica apresentaram perfis semelhantes, porém a fração etanólica tem os picos mais apolares mais intensos. A fração hidroetanólica foi escolhida para ter seus compostos identificados, e foi obtida boa separação em eluição isocrática a 35% de metanol para dois de seus picos. No entanto, quando foi realizado o procedimento no CLAE semipreparativo, não houve reprodução do método. As causas serão investigadas e nova separação será feita em breve. O resultado obtido no CLAE semipreparativo encontra-se no **ANEXO I**. Observa-se no espectro UV-Vis, obtido através da análise multiespectral que tais picos podem apresentar flavonoides em sua composição, dado as características bandas I e II presentes em seu espectro de absorção (BOHM *et al*, 1998).

Tabela 5.2. Resumo dos principais picos em cromatogramas de extratos e frações de *J. caroba* e *J. decurrens*.

<i>J. decurrens</i>								
tempos de retenção (min)		22,916	23,659					
Área (UA)		558642	1770086					
<i>J. caroba</i> (São Paulo - SP)								
tempos de retenção (min)	21,378	22,921	23,669	23,816	24,051	26,013	27,188	31,026
Área (UA)	197464	1607353	634727	406428	1039612	215578	299509	317399
<i>J. caroba</i> (Pirassununga - SP)								
tempos de retenção (min)	21,400	22,934	23,685	23,822				
Área (UA)	539108	182667	1983416	1834643				
<i>J. caroba</i> (Araxá - MG)								
tempos de retenção (min)		22,864 *	23,682	23,815				
Área (UA)		2424088	2441794	1621304				
fração etanólica <i>J. caroba</i> (Araxá - MG)								
tempos de retenção (min)		22,903	23,682	23,822				
Área (UA)		3735737	3066820	1949058				
fração hidroetanólica <i>J. caroba</i> (Araxá - MG)								
tempos de retenção (min)		22,880	23,640	23,778				
Área (UA)		862093	560783	364415				

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 - 100% B em 60 minutos

Ferreres *et al* (2013) através de análise por LC-MS constataram a presença de derivados do radical dicafeoilá e glicosídeos de quercetina, canferol e isoramnetina. Em extratos aquosos e hidrometanólicos relataram a presença predominante de isoramnetina-3-*O*-ramnosídeo-7,4'-di-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-(2-pentosil)-hexosídeo. Os derivados do radical dicafeoilá foram identificados em maior quantidade no extrato aquoso.

O extrato de *J. decurrens* não demonstrou efeito gastroprotetor no modelo testado. A indicação da presença de antraquinonas em sua composição pode colaborar para esse fato, visto que tais compostos possuem atividade irritante sobre as mucosas. O controle positivo utilizado (cimetidina) não se mostrou adequado para esse modelo, apesar de tal uso ser relatado na literatura (GOULART *et al*, 2005; XIE *et al*, 2013). As úlceras causadas por etanol são formadas por diversos mecanismos, entre eles podemos citar o aumento de fatores lesivos como isquemia, permeabilidade vascular, formação de radicais livres, liberação de histamina e redução do fluxo sanguíneo e a secreção de muco, que seriam fatores de proteção. (GLAVIN & SZABO, 1992). A endotelina-1 e o óxido nítrico participam da regulação do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica. O etanol estimula a liberação de endotelina-1, que ao interagir com receptores ET_A, promove vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo na mucosa, colaborando para a formação de lesões (KAWANO & TSUJI, 2000).

As amostras de *J. caroba* também não apresentaram atividade antiúlcera. A amostra de São Paulo inclusive mostrou ação ulcerogênica na dose de 100 mg/kg. Todas as doses testadas tiveram áreas de ulceração maiores que o controle negativo. Devido à alta variabilidade entre os grupos não se observou diferença significativa entre os controles, porém a área de lesão nos animais tratados com cloprostenol é notavelmente menor. Inclusive, dentre as moléculas mais relatadas na literatura para uso como controle positivo, os agonistas de receptores de prostaglandinas foram os únicos que apresentam resultados realmente reprodutíveis. Ensaios realizados com inibidores de bomba de próton e antagonistas do receptor H₂ necessitam de repetições para demonstrar diferença estatística em relação ao controle.

O lansoprazol é utilizado como referência neste modelo de atividade antiúlcera, mostrando proteção significativa contra úlceras causadas por etanol (SATO *et al*. 1989; INATOMI *et al*. 1991). O lansoprazol, além de sua atividade sobre a bomba de

prótons, poderia também atuar em outros mecanismos citoprotetores, como a redução na secreção estimulada por histamina, aumento no fluxo sanguíneo e produção de NO, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, entre outros. No entanto, essa molécula apresenta instabilidade em pH ácido, e é comercializada em especialidades gastrorresistentes. Ao administrar o fármaco diretamente por via oral em um modelo agudo, onde a molécula estará em contato com o ácido do estômago e do indutor de lesão, é possível parte da dose seja degradada, resultando em uma proteção que não é sempre reprodutível.

O uso de cloprostenol (agonista de receptores EP₃) como agente antiúlcera foi relatado por Neugebauer em 1991. Análogos de prostaglandinas também atuam de maneira inespecífica, no entanto, apresentam pronunciado efeito sobre a secreção de muco, bicarbonato e aumento no fluxo sanguíneo da mucosa, resultando em potente atividade citoprotetora contra lesões causadas por etanol (MÜLLER, 1983). Não são amplamente utilizados porque embora sejam potentes citoprotetores, apresentam efeitos colaterais severos, como o aborto (TANG *et al*, 2007), sendo assim sujeitos à maior regulação para evitar uso indevido.

As amostras de Araxá e de Pirassununga apresentaram resultados semelhantes, porém não é possível observar efeito ulcerogênico. Essa diferença entre a amostra de São Paulo e as outras pode ser explicada, entre vários fatores, pela idade da planta. Como mencionado anteriormente, esse extrato apresenta composição diferente em relação aos outros, provavelmente contendo mais substâncias irritantes ou menos substâncias que contribuam para a atividade antiúlcera.

Esses resultados contrariam os obtidos entre 1998 e 1999 no mesmo laboratório. Em resumos publicados naquela época eram relatadas as ações gastroprotetoras do extrato (400 mg/kg) e da fração clorofórmica (100 mg/kg) como altamente promissoras, oferecendo 100% de proteção nessas doses mencionadas. (DIAS e BACCHI, 1998; BACCHI *et al*, 1999). Tais resultados foram responsáveis pela insistência na busca de uma amostra que demonstrasse ação antiúlcera. No entanto, agora acredita-se que apenas as amostras que cresciam na região de Leme - SP possuíam tal atividade. Como foram coletadas amostras de diferentes locais, especula-se que tal fato ocorra devido a alguma diferença genética ou de solo entre essas amostras. No entanto, não se sabe se será possível encontrar novamente as

amostras de Leme, devido ao desmatamento no local.

Os ensaios anti *H. pylori* apresentaram resultados mais promissores. Referências apontam que extratos com CIMs abaixo de 1000 µg/mL são promissores para o isolamento de substâncias com atividade anti *H. pylori* (WEBSTER *et al*, 2008). Com exceção das amostras de *J. decurrens* e da fração clorofórmica de *J. caroba*, todas as outras apresentaram alguma atividade na inibição do crescimento da bactéria. A fração hidroetanólica foi escolhida para ter seus compostos identificados, pois obteve o melhor valor de atividade antimicrobiana (juntamente com a fração etanólica). A semelhança fitoquímica entre essas duas frações é justamente na porção que apresenta os picos mais intensos, sugerindo que os compostos presentes nessas bandas podem apresentar maior atividade antimicrobiana após a remoção dos compostos mais apolares presentes nas frações anteriores.

Durante o experimento de toxicidade aguda, não foram observados sintomas tóxicos e nem alterações nos padrões de alimentação dos animais. Foi escolhido realizar o teste limite, com a dose mais alta sugerida pela Guideline nº 425 da OECD (2008), por se tratar de um extrato amplamente utilizado e sem relatos de ocorrências tóxicas associadas a seu uso. Através dos parâmetros avaliados, não se observou toxicidade aguda, posicionando a DL₅₀ em um valor maior que 5.000 mg/kg, mesmo valor reportado em um resumo de 2005 por Veiga e Bacchi, quando testada em camundongos.

Quando foram administradas as doses repetidas, em ensaio subagudo, observaram-se mudanças em relação ao consumo de água e alimento. A partir da segunda metade do experimento, os grupos que receberam extrato passaram a consumir menos água, comportamento observado em ambos os sexos. Os machos que receberam extrato também passaram a se alimentar menos. As fêmeas não tiveram a alimentação alterada. Avaliando-se o peso relativo dos órgãos das fêmeas através de ANOVA seguida de Tukey, observou-se que houve diferença na massa de coração, pulmões e fígado, reduzidos na dose mais baixa de extrato que foi administrada. Esse grupo foi também o que mais reduziu seu consumo de água em relação ao controle, o que pode explicar essa diferença. Entre os machos, o grupo que recebeu a maior dose, foi também o que menos consumiu água, e também teve o tamanho do fígado menor quando comparado ao controle. Testes adicionais

relativos a alterações bioquímicas e hematológicas devem ser realizados para oferecer informações mais precisas sobre a segurança do extrato.

No teste de Ames, utilizado para avaliar a mutagenicidade, foi ensaiada a concentração mais alta capaz de se solubilizar em veículo adequado ao teste (DMSO 20%, também usado como controle), correspondente a 15 mg de extrato/placa. Para as linhagens celulares de *S. typhimurium* TA 97a, TA 100 e TA 102 o extrato não apresentou indícios de mutagenicidade. Na linhagem TA 98, as duas concentrações mais altas indicaram uma possível atividade mutagênica após ativação metabólica. Observando as doses mais baixas, é possível estabelecer uma relação dose resposta. Tais sinais configuram a indicação de mutagenicidade para os metabólitos de *J. caroba*, segundo critérios encontrados na literatura (RESENDE *et al*, 2012) A linhagem TA98 auxilia a identificar mutações no DNA do tipo deslocamento no quadro de leitura, mais especificamente sobre o gene da enzima histidinol desidrogenase (hisD3052), em uma sequência -G-C-G-C-G-C-G-C- próxima ao sítio deste gene (ISONO & YOURNO, 1974).

Quanto ao resultado obtido pelo teste de citotoxicidade em células HepG2, quando comparada a outros exemplares da família Bignoniaceae, o extrato de *J. caroba* se mostrou mais citotóxico. A espécie *Catalpa bignonioides* apresentou valor de $IC_{50} = 23,6$ mg/mL para extrato aquoso de suas folhas (MUÑOZ-MINGARRO *et al*, 2003). Porém quando comparada ao fármaco controle utilizado no ensaio anti *H. pylori* (amoxicilina), o extrato de *J. caroba* se mostra menos citotóxico. Burkard *et al*. (2012) relatam que o valor de IC_{50} para a amoxicilina é de 274 μ mol/L, correspondente a aproximadamente 0,1 mg/mL, enquanto que o encontrado para *J. caroba* seria no mínimo 3 vezes maior.

Para o futuro, caso sejam encontradas amostras de *J. caroba* em Leme, estas devem ser replicadas e cultivadas em parceria com um instituto agrônomo, para verificar se ainda é possível encontrar a referenciada atividade e encontrar os motivos para a diferença entre essa amostra e as outras da mesma espécie. Com as amostras atuais, é possível investigar de maneira mais aprofundada a atividade antimicrobiana, já que esses extratos podem apresentar moléculas promissoras em sua composição.

Ao fim da discussão dos resultados obtidos com o projeto, é importante deixar para reflexão algo fora do escopo deste trabalho, porém totalmente pertinente. As

amostras de *Jacaranda caroba* que no passado apresentavam atividade antiúlcera, não foram mais encontradas devido à substituição da cobertura vegetal na região de Leme por culturas para a produção de alimentos e para outras finalidades, como algodão. Em visita à região, observam-se grandes áreas voltadas à cultura de cana-de-açúcar para a produção de biocombustíveis.

Em 2011, Gurgel fez um estudo sobre os impactos dos estímulos americanos à agricultura nos EUA, relacionados ao crescimento da demanda no Brasil por biocombustíveis e prevendo as mudanças no uso da terra no Brasil. Utilizando modelo econômico global capaz de representar os mercados agropecuários e de energia o autor sugere que caso os EUA reduzam as barreiras comerciais para a importação de etanol, o Brasil poderá ter uma especialização na produção de cana-de-açúcar e etanol em detrimento de outros produtos agropecuários. A área cultivada com cana-de-açúcar aumentaria de 5 milhões para 15 a 20 milhões de hectares em 2020, substituindo áreas de pastagens, de outras culturas e de silvicultura. Cerca de 2,5 milhões de hectares de Cerrado seriam convertidos para agricultura e a floresta tropical teria impactos consideráveis.

Ao final de dezembro de 2011, os EUA não renovaram tais barreiras econômicas (COSTA, 2011), o que pode ter contribuído para a aceleração da degradação das matas do interior de São Paulo nos últimos anos.

Brandão *et al* (2013) afirmam que as plantas continuam sendo uma importante fonte de substâncias bioativas, e que o Brasil é um dos países megadiversos, contendo cerca de 20% de todas as espécies de plantas encontradas no mundo. Entretanto, a destruição desses sistemas tem contribuído para uma gradual perda de espécies medicinais nativas.

Constata-se que o Brasil troca milhões de hectares de matas com valor incalculável de recursos para a química fina e que poderiam servir para a produção de medicamentos ainda não descobertos por cultivo de cana-de-açúcar, para vender um produto barato em grandes volumes. Deve-se considerar essa questão antes de afirmar que os biocombustíveis contribuem para as “políticas verdes” tão divulgadas. Com o surgimento de novas tecnologias como baterias metálicas mais eficazes, carros movidos a hidrogênio e energia solar, o país investe alto em uma tecnologia que pode se tornar obsoleta e levar consigo o patrimônio genético das matas locais.

PARTE II

Desenvolvimento de formulação para otimizar as propriedades farmacêuticas de extratos de *Piper umbellatum* L.

6. Metodologia

6.1. Preparo de nanocápsulas com extratos de *Piper umbellatum* L.

6.1.1. Obtenção do material vegetal

Raízes de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae) foram fornecidas pelo Grupo Centroflora (empresa situada em Botucatu - SP). Exsicata foi depositada pelo fornecedor em herbário próprio, sob número SP373331. O material vegetal foi seco em estufa com ventilação forçada, sob temperatura máxima de 40° C.

6.1.2. Preparo do extrato bruto liofilizado e fração clorofórmica

O extrato bruto e a fração clorofórmica foram preparados conforme descrito no **Item 3.1.**

6.1.3. Preparo da formulação de nanocápsulas

Para a obtenção das nanocápsulas foi utilizado o método de precipitação de polímero pré-formado. Inicialmente foi preparada uma fase orgânica (agitação por 30 min a 40° C) e outra aquosa (apenas homogeneizada). Em seguida, sob agitação (por 10 minutos em agitador magnético), a fase orgânica foi vertida sobre a fase aquosa. O detalhamento das composições está descrito na **Tabela 6.1**. A eliminação do solvente e parte da água foi efetuada empregando evaporador rotatório a 37° C e o volume da suspensão (10 mL) foi ajustado em balão volumétrico (BECK, 2004).

Tabela 6.1. Composição das fases orgânica e aquosa para preparo de suspensão de nanocápsulas contendo fração clorofórmica de *P. umbellatum*.

Componentes	Quantidade
Fase orgânica	
poli (ϵ -caprolactona) 60.000 Daltons	0,1 g
monoestearato de sorbitan (span 60)	0,077 g
triésteres de glicerol dos ácidos cáprico e caprílico (Miglyol [®])	0,333 g
acetona	27,0 mL
fração clorofórmica	0,200 g
Fase aquosa	
polissorbato 80	0,077 g
água purificada	53,0 mL

6.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas

A caracterização físico-química das suspensões foi realizada conforme descrito por Schaffazick *et al* (2003):

6.2.1. Microscopia eletrônica

A análise morfológica (superfície e forma) das micropartículas foi realizada empregando Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1010 na FM/USP. Para a análise por MET a suspensão de nanocápsulas foi depositada sobre tela de cobre, e analisada após alguns minutos quando se constatou a evaporação do meio. Também foi realizada análise com Microscópio Eletrônico de Varredura Phenon ProX, disponibilizado pela empresa Anacom Científica. Na análise por MEV, a amostra foi seca sobre lâmina de vidro e posteriormente posicionada sobre o amostrador de alumínio (“stub”). As porções de vidro e do amostrador não recobertas pela amostra receberam camada de tinta de carbono para redução de carga.

6.2.2. Distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta

O diâmetro das partículas em suspensão foi determinado por método de espalhamento de luz dinâmica, empregando equipamento ZetaSizer Nanoseries (Nano ZS ZEN3600, Malvern Instruments®). As amostras foram diluídas (20 μ L de suspensão de nanocápsulas para 2,0 mL de água purificada) e filtradas empregando membrana éster de celulose tamanho de poro 0,22 μ m. A luz espalhada é medida em ângulo de 90 °C. O equipamento realiza 3 medições, cuja média compõe o resultado. O potencial zeta foi medido empregando o mesmo equipamento (LOPES, 2000).

6.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação dos extratos de *P. umbellatum*

A caracterização do extrato e fração ligados ao sistema nanoparticulado foi avaliada por meio da transferência de 200 μ L da suspensão para ultrafiltro Microcon Ultracel YM-10 (Regenerated Cellulose 10.000 MWCO) Millipore® e centrifugação empregando equipamento Eppendorf®, Centrifuge 5804 R a 8000 rpm durante 30 minutos. A alíquota obtida do filtrado (teor do extrato não ligado à partícula) foi analisada empregando sistema de CLAE Shimadzu® com bombas LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1 mL/min e coluna Thermo Scientific® C18 ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m.

Em uma eluição foi injetado o filtrado, em outra, uma mistura contendo 400 μ L de acetonitrila e 200 μ L da suspensão com extrato, para promover a lise das nanocápsulas e então comparar o perfil do extrato não-ligado com o perfil do filtrado (LOPES, 2000).

6.3. Atividade gastroprotetora da formulação de nanocápsulas

Para a avaliação da atividade gastroprotetora, também foi empregado o modelo de indução de úlcera por etanol acidificado, desenvolvido por Mizui e Doteuchi em 1983. O experimento foi realizado como descrito no Item 3.4.1. Foi testado o extrato de raízes de *Piper umbellatum* na dose de 200 mg/kg e a fração clorofórmica desse extrato, nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg. As mesmas doses de extrato e frações foram incorporadas às formulações de nanocápsulas. Um grupo controle adicional

recebeu a formulação contendo apenas os excipientes. Os resultados dos experimentos *in vivo* foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, com intervalo de confiança de 0,05%, seguidos pelo teste de Tukey. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF-USP, em 10 de março de 2008, sob Protocolo CEEA n° 172, Ofício CEEA n° 11/2008.

7. Resultados

7.1. Preparo do extrato bruto liofilizado e fração clorofórmica

Nas **Tabelas 7.1 e 7.2** foram organizados os dados referentes à quantidade obtida e rendimento dos extratos e frações de raízes de *P. umbellatum*. O extrato liofilizado apresentou na forma de pó, de cor castanho-avermelhada, com odor aromático. A fração clorofórmica tem cor marrom escuro e apresenta-se com aspecto amorfo e resinoso.

Tabela 7.1. Rendimento do extrato de raízes de *Piper umbellatum*.

Massa de droga vegetal (kg)	Quantidade de solvente empregada (L)	Quantidade de liofilizado (g)	Rendimento (%)
1,3	15	45,4227	3,49

Tabela 7.2. Rendimento da fração clorofórmica preparada a partir do extrato de *P. umbellatum*

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
clorofórmio	4,3633	21,7

Massa de 20,0972 g de extrato bruto e 200 mL de clorofórmio.

7.2. Caracterização físico-química das nanocápsulas

Os resultados obtidos para a caracterização físico-química das nanocápsulas contendo a fração clorofórmica do extrato de raízes de *P. umbellatum* estão representados nos itens a seguir. A formulação contendo apenas extrato de raízes de *P. umbellatum* tem sua caracterização relatada na dissertação de mestrado de Hernandez (2010).

7.2.1 Microscopia eletrônica

As **Figuras 7.1** e **7.2**, a seguir, mostram os resultados obtidos nas análises por microscopia eletrônica das formulações de nanocápsulas.

Figura 7.1. Imagens obtidas empregando Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1010, para análise de formulação de nanocápsulas poliméricas sem extrato vegetal.

A - Aumento de 50.000 x. **B**- Aumento de 120.000 x.

Figura 7.2. Imagens obtidas empregando Microscópio Eletrônico de Varredura Phenon ProX, para análise de formulação de nanocápsulas poliméricas (**A** e **B**) e contendo fração clorofórmica (**C** e **D**).

A e **C** - Aumento de 6.000 x. **B**- Aumento de 21.500 x. **D** - Aumento de 22.000 x.

7.2.2. Distribuição do tamanho de partícula e potencial zeta

As **Figuras 7.3 e 7.4**, a seguir, mostram os resultados obtidos através das análises da distribuição do tamanho de partícula e do potencial zeta das formulações de nanocápsulas. O diâmetro das partículas apresentou distribuição unimodal. O valor obtido foi de $181,6 \pm 0,9$ nm (média de 3 medições $\pm$ erro padrão). O potencial zeta observado foi de -31 ± 4 mV, para $n = 12$ medições.

Figura 7.3. Gráfico referente à distribuição do diâmetro de partícula das nanocápsulas contendo fração clorofórmica do extrato de *P. umbellatum*, utilizando método de espalhamento de luz dinâmica.

Figura 7.4. Gráfico referente ao potencial zeta da formulação de nanocápsulas contendo fração clorofórmica do extrato de *P. umbellatum*.

7.2.3. Determinação da eficiência de encapsulação da fração clorofórmica de *Piper umbellatum* L.

A seguir, estão representados os cromatogramas referentes à análise da eficiência de encapsulação da fração clorofórmica de *P. umbellatum*. Tais resultados permitem uma análise qualitativa sobre a polaridade dos compostos que se incorporam à formulação. A **Figura 7.5** mostra o cromatograma da fração clorofórmica. A **Figura 7.6** mostra o ultrafiltrado da formulação (fase líquida sem as nanocápsulas). A **Figura 7.7** mostra a formulação após lise das nanocápsulas com acetonitrila.

Figura 7.5. Cromatograma da fração clorofórmica (1 mg/mL em metanol) obtida a partir do extrato de raízes de *P. umbellatum*.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 min a 5%, de 5 a 50 min 5 - 50% B, 50 a 65 min - 50 - 100% B.

Figura 7.6. Cromatograma do ultrafiltrado da formulação de nanocápsulas contendo fração clorofórmica obtida a partir do extrato de raízes de *P. Umbellatum*

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 min a 5%, de 5 a 50 min 5 - 50% B, 50 a 65 min - 50 - 100% B.

Figura 7.7. Cromatograma da formulação de nanocápsulas contendo extrato de raízes de *P. umbellatum*, após lise com ACN.

Equipamento Shimadzu LC-20A, loop de 20 μ L, detector PDA (na figura, 254 nm), fluxo de 1 mL/min e coluna C18 Thermo Scientific ODS Hypersil™ de 250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O+TFA 0,1%, 5 min a 5%, de 5 a 50 min 5 - 50% B, 50 a 65 min - 50 - 100% B.

7.3. Atividade gastroprotetora da formulação de nanocápsulas

Nos próximos itens estão expostos os dados referentes aos experimentos *in vivo* utilizando as formulações de nanocápsulas preparadas com o extrato bruto e a fração clorofórmica de *P. umbellatum*.

7.3.1. Atividade gastroprotetora de nanocápsulas contendo extrato de *Piper umbellatum* L.

O resumo dos dados pode ser visto na **Tabela 7.7** e na **Figura 7.8**. Os grupos que receberam a formulação de nanocápsulas com e sem extrato, assim como o controle positivo apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 7.7. Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de nanocápsulas contendo *P. umbellatum*, em modelo de indução por etanol acidificado.

Grupo	ARL (%)
200 mg/kg	6 ± 1
nano + 200 mg/kg *	3 ± 1
nano (n = 6) **	0,5 ± 0,2
água	9 ± 2
lansoprazol (n = 6) *	2,4 ± 0,9

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo * P < 0,05, ** P < 0,005.

Figura 7.8. Gráfico representativo da Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de nanocápsulas contendo *P. umbellatum*, em modelo de indução por etanol acidificado.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo * P < 0,05, ** P < 0,005.

7.3.2. Atividade gastroprotetora de nanocápsulas contendo fração clorofórmica de *Piper umbellatum* L.

O resumo dos dados pode ser visto na **Tabela 7.8** e na **Figura 7.9**. Os grupos que receberam as doses da fração e as formulações de nanocápsulas com fração, assim como o controle positivo apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 7.8. Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de nanocápsulas contendo fração clorofórmica de *P. umbellatum*, em modelo de indução por etanol acidificado.

Grupo	ARL (%)
100 mg/kg *	3 ± 1
200 mg/kg (n = 6) **	0,5 ± 0,1
nano + 100 mg/kg **	1,7 ± 0,8
nano + 200 mg/kg **	1,1 ± 0,5
nano (n = 6)	4,2 ± 0,5
água	11 ± 3
cloprostenol **	0,05 ± 0,03

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo * P < 0,05, ** P < 0,001.

Figura 7.9. Gráfico representativo da Área Relativa de Lesão (ARL, em %) de avaliação gastroprotetora de nanocápsulas contendo fração clorofórmica de *P. umbellatum*, em modelo de indução por etanol acidificado.

Os valores estão representados pela média ± erro padrão (n = 7). ANOVA seguida de Tukey: diferença em relação ao controle negativo * P < 0,05, ** P < 0,001.

8. Discussão

A nanoencapsulação, uma ferramenta recente da farmacotécnica, oferece novas possibilidades para o direcionamento de fármacos ao seu alvo biológico. A poli- ϵ -caprolactona pode ser utilizada para preparar diferentes tipos de nanocápsulas, apresentando flexibilidade quanto à natureza química de diferentes tipos de materiais em seu interior. Além de controlar a liberação do ativo, melhora a estabilidade fotoquímica (POHLMANN, 2013)

A escolha da fração clorofórmica para a realização desta parte do trabalho se deu em ensaio prévio realizado pelo grupo (HERNANDES, 2010), onde se mostrou uma das mais ativas e obteve bom rendimento, além disso apresenta baixa solubilidade em solução aquosa, propriedade que é corrigida com a formulação de nanocápsulas.

As fotos obtidas por microscopia eletrônica não apresentaram qualidade suficiente para o detalhamento da superfície das nanocápsulas, embora consiga-se uma confirmação do tamanho das partículas formadas, principalmente através da MET. Fotos de qualidade semelhante foram encontradas na literatura, como mostrado na **Figura 8.1**.

Figura 8.1. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de formulação de nanocápsulas de PCL contendo melatonina.

As letras indicam diferentes aumentos na barra de escala: a = 1 μm ; b = 0,5 μm ; c = 0,2 μm (retirado de Schaffazick, 2006).

As fotos obtidas por MEV apresentaram ruído, mostrando algumas partículas que provavelmente correspondem às nanocápsulas, porém de difícil visualização. Atribui-se tal questão ao preparo da amostra, que deve ser feita empregando outras técnicas para avaliar como se obter melhores imagens a partir dessa formulação.

Exemplos de técnicas utilizadas são a fixação por tetróxido de ósmio e recobrimento em ouro (NAGVEKAR *et al*, 2009).

Outro critério importante a ser avaliado é o tamanho das nanocápsulas. Há na literatura diferentes faixas de valores ideais para esse tamanho, porém o resultado obtido encontra-se dentro desses parâmetros. Mayer *et al* (2005) relatam que o raio ótimo dessas partículas deve estar na faixa de 100 a 500 nm. Sinha *et al* (2004) consideram que os diâmetros podem variar entre 10 e 1000 nm.

Segundo Mora-Huertas *et al* (2010), não há um comportamento específico a ser observado quanto aos valores de potencial zeta, mas depende principalmente da natureza química do polímero, do agente estabilizante e do pH do meio. Na maioria dos casos são obtidos valores menores que -10 mV (geralmente entre -25 e -30 mV), que predizem uma boa estabilidade coloidal devido à barreira de alta energia entre as partículas. Esses mesmos autores afirmam que alguns estudos sugerem que o ativo, por estar dentro do núcleo das nanocápsulas, não interfere no potencial zeta.

Para as nanocápsulas com extratos vegetais, talvez essa afirmação não seja verdadeira, visto que são misturas complexas, com substâncias de diferentes polaridades. Sendo assim, parte das moléculas adere ao núcleo ou parede das nanocápsulas e parte fica dissolvida no meio, interferindo com a carga externa dessas partículas. Dada a natureza diversa das moléculas encontradas em um extrato vegetal, diversas podem ser as suas cargas que irão variar em função do pH e características do meio.

Os resultados obtidos com o experimento sobre a eficiência de encapsulação confirmam que apenas os resíduos mais polares da fração clorofórmica não foram incorporados ao núcleo ou estrutura polimérica das cápsulas, ficando dispersos no meio. Já a porção apolar, que compõe a maioria das substâncias dessa fração, aderiu. No cromatograma referente ao ultrafiltrado da suspensão de nanocápsulas, observa-se a ausência da maioria dos picos, presentes nas nanocápsulas da formulação.

Em relação à ação gastroprotetora, Awaad *et al* (2013) afirmam que os mecanismos envolvidos na ação profilática (ou citoprotetora) baseiam-se nos fatores defensivos da mucosa gástrica, como o estímulo na síntese de prostaglandinas, somatostatina e inibição na secreção ácida. Substâncias antioxidantes participam dos mecanismos que previnem os danos oxidativos causados à mucosa gástrica ao inibir

a peroxidação lipídica e atuar sobre as enzimas superóxido dismutase e catalase, que participam da eliminação de radicais livres. A enzima NO sintase também pode estar envolvida nesses mecanismos. Até mesmo a atividade anti-inflamatória pode participar da atividade gastroprotetora, dependendo de seu mecanismo.

O ensaio realizado com a formulação contendo extrato de *P. umbellatum* forneceu algumas informações a respeito das nanocápsulas. Esperava-se obter uma melhora na atividade do extrato de *P. umbellatum* através do uso da formulação. O que ocorreu é que a formulação sem extrato apresentou melhor atividade gastroprotetora que a formulação com extrato. Ao invés de promover uma ação sinérgica com a adição da formulação, o extrato reduziu a atividade dos excipientes. Acredita-se que os excipientes formem uma barreira física que protege o estômago da ação do agente indutor, como uma espécie de muco artificial. O fármaco referência utilizado, constituído por lansoprazol, apresentou diferença em relação ao controle negativo, fato que nem sempre ocorre nos experimentos realizados pelo grupo. Apesar dos inibidores de próton serem as moléculas mais comumente relatadas para uso como controle positivo nesse modelo, a sua conhecida instabilidade em meio ácido reflete em falta de padronização do modelo experimental.

No experimento que avaliou a gastroproteção da formulação contendo a fração clorofórmica de *P. umbellatum*, observou-se sinergia entre a formulação e a fração, visto que o valor encontrado para a atividade da formulação contendo a fração foi melhor que o obtido apenas com os excipientes. No entanto, a fração na dose de 200 mg/kg apresentou melhor atividade quando utilizada sem o veículo polimérico, apesar de ter protegido mais a mucosa que a dose menor. Acredita-se que isso talvez ocorra devido à cinética de liberação do extrato das nanocápsulas, que pode ser mais lento que o tempo empregado no experimento. Para confirmar essa suposição, serão realizados testes *in vitro* no futuro.

Pohlmann *et al* (2013) relatam entre as principais vantagens dos sistemas coloidais o aumento da janela terapêutica e a redução nos efeitos adversos; o aumento na solubilidade aparente em água (por suspensão) melhorando a biodisponibilidade e a melhora na estabilidade química em ambientes fisiológicos. Os autores afirmam que formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico protegem a mucosa gástrica quando associadas a AINEs, por promover uma liberação controlada.

Acredita-se que a atividade antioxidante amplamente relatada para extratos e frações de *P. umbellatum* (AGBOR *et al*, 2007; BARROS *et al*, 1996; DESMARCHELIER *et al*, 1997; TABOPDA *et al*, 2008; COSTA *et al*, 2011; LOPES *et al*, 2012 e FERNANDES *et al*, 2013) estejam envolvidos nos mecanismos de sua ação antiúlcera. Kwiecień *et al*. (2002) encontraram evidências que espécies reativas de oxigênio tem um papel relevante na formação de lesões induzidas por etanol, ao diminuir o fluxo sanguíneo na mucosa, aumentar fatores de inflamação (IL-1 β e TNF α). O etanol ainda estimularia a geração dessas espécies reativas e diminuiria a ação da enzima superóxido dismutase na mucosa gástrica promovendo peroxidação lipídica, estresse oxidativo e lesão tecidual.

No entanto, para confirmar essa relação entre a atividade antiúlcera e o mecanismo antioxidante, seria necessária a realização de um experimento *in vivo* direcionado para esse propósito.

9. Conclusão

Diferente dos resultados obtidos no passado, no mesmo laboratório, a espécie *Jacaranda caroba* não apresenta atividade antiúlcera quando testada em modelo agudo de indução por etanol acidificado. No entanto, compostos presentes no extrato e frações de *J. caroba* apresentam potencial atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*. O extrato de *J. decurrens* não apresentou atividade frente a nenhum desses modelos testados. A diferença na potência da atividade microbiana aliada aos resultados obtidos nos perfis cromatográficos reforça que a composição química da espécie *J. caroba* varia de acordo com a idade da planta e a região de onde provém. Os perfis cromatográficos obtidos servem como base para futuros análises fitoquímicas e de controle de qualidade de extratos dessas espécies.

O extrato de *J. caroba* não promoveu sinais de toxicidade quando testado *in vivo* em modelo de dose única e em doses repetidas, através dos parâmetros avaliados neste trabalho. Outros parâmetros (bioquímicos e hematológicos) devem ser avaliados futuramente para uma análise mais precisa. A citotoxicidade em células Hep G2 foi maior que de espécies da mesma família, porém menor que de fármacos utilizados como antibióticos.

Formulações poliméricas de nanocápsulas possivelmente protegem a mucosa gástrica através de barreira física. Podem atuar em sinergia quando encapsulam moléculas com atividade gastroprotetora, como no caso da fração clorofórmica de *Piper umbellatum*. O aumento na atividade também pode estar relacionado à melhora de solubilidade da fração, pouco polar.

Moléculas amplamente divulgadas na literatura como referência em modelo de ulceração aguda induzida por etanol acidificado não apresentam resultados constantes e reprodutíveis. Sugere-se a substituição de inibidores de bomba de próton e antagonistas do receptor H_2 pelo uso de agonistas do receptor EP_3 .

10. Referências Bibliográficas

AGBOR, G.A. *et al.* *In vitro* antioxidant activity of three *Piper* species. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 7, n. 2, p. 49-64, 2007.

AHMED, S.A. *et al.* A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, n. 170, p. 211-224, 1994.

AINSWORTH, E.A., GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.

ARENA, A.C. *et al.* Maternal exposure to aqueous extract of *Jacaranda decurrens*: Effects on reproductive system in male rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 195-200, 2012.

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.

BACCHI, E.M. Ação anti-úlceras e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 93-100, 1986.

BACCHI, E.M. ; RIOS, J.P.C. ; DIAS, T. . Fraction responsible for *Jacaranda caroba* DC. antiulcer action. In: 2nd IUPAC International Conference on Biodiversity, 1999, Belo Horizonte. **Programs and Abstracts of the 2nd IUPAC International Conference on Biodiversity**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p. 173, 1999.

BALBACH, A. **As Plantas Curam**. 28.ed. São Paulo: Editora MV, 1971.

BARROS, S.B.M. *et al.* Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, v. 48, n. 1/2, p.114-116, 1996.

BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, n. 5, p. 499-512, 2004.

BLATT, C.T.T; DOS SANTOS, M.D.; SALATINO, A. Flavonoids of Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 210, n. 3-4, p. 289-292, 1998.

BOHM, Bruce A. *et al.* **Introduction to flavonoids**. Harwood academic publishers, 1998.

BONIFÁCIO, B.V., *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1, 2014.

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

BOTION, L.M. *et al.* Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina[®] on lipid metabolism and intestinal tonus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 137-142, 2005.

BRAGA, F.C. *et al.* Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina[®]. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 28-31, 2003.

BRANDÃO, M.G.L. *et al.* Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 164, p. 369-377, 2010.

BRANDÃO, M.G.L. *et al.* Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 8, p. 7013-7023, 2013.

BURKARD, A. *et al.* Generation of proliferating human hepatocytes using upcyte[®] technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. **Xenobiotica**, v. 42, n. 10, p. 939-956, 2012.

CARVALHO, C.A. *et al.* Antioxidant activity of *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 592-598, 2009.

CASAGRANDE, J.C. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activity of hydroethanolic extract from *Jacaranda decurrens* leaves. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112748, 2014.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**, 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1994. 3v.

COSTA, F.S.O. *et al.* Impact of ultrasound-assisted extraction on quality and photostability of the *Pothomorphe umbellata* extracts. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 1002-1007, 2011.

COSTA, P. Etanol EUA: caem subsídios e barreira tarifária. Parte I. **Exame.com**, 2011. Disponível em: < <http://exame.abril.com.br/rede-de-blogs/bioagroenergia/2011/12/24/etanol-eua-caem-subsidios-e-barreira-tarifaria-parte-i/>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

CHOUDHARY, A; SINGH, A. Peptic ulcer: A review on epidemiology, molecular mechanism of pathogenesis and management. **International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 788-796, 2014.

DESMARCHELIER, C. *et al.* 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 561-563, 1997.

DIAS, T. G., BACCHI, E.M. Fração responsável pela ação antiúlcera de *Jacaranda caroba* DC. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1998, Águas de Lindóia. **Programa e Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. São Paulo, p. 212-212, 1998.

ENDRINGER, D.C. *et al.* Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 928-933, 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.

FERNANDES, K.S. *et al.* Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and α -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 780-788, 2013

FERRERES, F. *et al.* Phenolic compounds from *Jacaranda caroba* (Vell.) A. DC.: Approaches to neurodegenerative disorders. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 91-98, 2013.

GOULART, Y.C.F. *et al.* Evaluation of gastric anti-ulcer activity in a hydro-ethanolic extract from *Kielmeyera coriacea*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 211-216, 2005.

Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals, ARAC – NIH. Disponível em: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/ASP_Endpoints.pdf. Acesso em 20/09/2012.

Guidelines for the Euthanasia of Rodent Feti and Neonates e Guidelines for Euthanasia of Rodents Using Carbon Dioxide, ARAC – NIH. Disponível em: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Rodent_Euthanasia_Adult.pdf. Acesso em 20/09/2012.

Guidelines for Survival Bleeding of Mice and Rats, ARAC – NIH. A sangria por via retro orbital deve ser realizada com anestesia prévia e sua escolha justificada. Disponível em: http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Rodent_Bleeding.pdf. Acesso em 20/09/2012.

GUIMARÃES, E; DI STASI, L.C.; MAIMONI-RODELLA, R.C.S. Pollination biology of *Jacaranda oxyphylla* with an emphasis on staminode function. **Annals of Botany**. v. 102, n. 5, p. 699-711, 2008.

GURGEL, A.C. Impactos da política americana de estímulo aos biocombustíveis sobre a produção agropecuária e o uso da terra. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 1, p. 181-213, 2011.

HERNANDES, L.S. **Farmacologia e fitoquímica dos extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., direcionadas à atividade antiúlcera**. 2010. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-19012011-112744/>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

INATOMI, N. *et al.* Effects of a proton pump inhibitor, AG-1749 (lansoprazole), on reflux esophagitis and experimental ulcers in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 437-451, 1991.

IPNI. The International Plant Names Index. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acesso em 30 de janeiro de 2015.

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v. 122, n. 4, p. 291-294, 2002.

ISONO, K.; YOURNO, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, 1974.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. s.1, p. 1-6, 2000.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010.

KWIECIEN, S. *et al.* Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.

LEONTIADIS, G.I.; NYRÉN, O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, peptic ulcer disease and gastric cancer. **GI Epidemiology: Diseases and Clinical Methodology, Second Edition**, p. 135-157, 2014.

LOPES, E. *et al.* Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 55, n. 7, p. 527-530, 2000.

LOPES, A.P. *et al.* Antioxidant and cytotoxic effects of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from aerial parts of *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae). **BioMed Research International**, v. 2013, 2012.

LUQMAN, S. *et al.* Efficacy of herbal drugs in human diseases and disorders. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2014, 2014.

MAURO, C. *et al.* Anatomical study of species from savanna-like formation, *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. ex de Souza (catuaba), *Zeyheria montana* Mart.(bolsa-de-pastor) and *Jacaranda decurrens* Chamisso (caroba) - Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 262-265, 2007.

MAYER, C. Nanocapsules as drug delivery systems. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 28, n. 11, p. 1163-1171, 2005.

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

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MÜLLER, T.A. Protective effects of prostuglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. **American Journal of Physiology**. v. 245, n. 8, p. G601-G623, 1983.

MUÑOZ-MINGARRO, D. *et al.* Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt.(Bignoniaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2, p. 163-167, 2003.

NAGARAJA, M.S.; PAARAKH, P.M. Antioxidant activity of different extracts of stem bark of *Millingtonia hortensis* Linn. **Pharmacologyonline** v. 2, p. 643-649, 2011.

NAGVEKAR, A.A.; TRICKLER, W.J.; DASH, A.K. Current analytical methods used in the *in vitro* evaluation of nano-drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 4, p. 358-366, 2009.

NEUGHEBAUER, B.I. *et al.* Influence of cloprostenol in the experimentally induced ulcer in rats. **Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi**, v. 96, p. 10-12, 1991.

NORIEGA, P. *et al.* Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1119-1129, 2012.

OECD. (2008). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Disponível em:
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg407-2008.pdf>.
 Acesso em 20/09/2012.

OECD. (2008). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg425.pdf>. Acesso em 20/09/2012.

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

PERAZZO, F.F. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic properties of water–ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 215-220, 2005.

POHLMANN, A.R. *et al.* Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

POTRICH, F.B. *et al.* Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 85-92, 2010.

RANA, A.; BHANGALIA, S.; SINGH, H.P. A new phenylethanoid glucoside from *Jacaranda mimosifolia*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 13, p. 1167-1173, 2013.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

RESENDE, F.A. *et al.* Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemisinin C by the bacterial reverse mutation test. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2335-2350, 2012.

RIBEIRO, T.G. *et al.* Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 60-68, 2014.

SANTOS, J.A. *et al.* Anti-inflammatory effects and acute toxicity of hydroethanolic extract of *Jacaranda decurrens* roots in adult male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 802-805, 2012.

SANTOS, J.A. *et al.* Subacute and reproductive oral toxicity assessment of the hydroethanolic extract of *Jacaranda decurrens* roots in adult male rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

SARAF, A.S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations **Fitoterapia**, v. 81, p. 680-689, 2010.

SATOH, H. Discovery of lansoprazole and its unique pharmacological properties independent from anti-secretory activity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 1, p. 67-75, 2013.

SATOH, H. *et al.* Antisecretory and antiulcer activities of a novel proton pump inhibitor AG-1749 in dogs and rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 2, p. 806-815, 1989.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SILVA, L.P. *et al.* *Terminalia catappa* L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015.

SILVA, R.P. *et al.* Chronic toxicological study of Ierobina® in rabbits. **Current Topics in Toxicology**, v. 8, p. 13-18, 2012.

SINHA, V. R. *et al.* Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

SUNG, J.J.Y.; KUIPERS, E.J.; EL-SERAG, H.B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.29, p. 938-946, 2009.

TABOPDA, T.K. *et al.* Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum* **Phytochemistry**, v. 69, p. 1726-1731, 2008.

TANG, O.S.; GEMZELL-DANIELSON, K.; HO, P.C. Misoprostol: Pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 99, p. S160-S167, 2007.

TAGLIATI, C.A. *et al.* Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina®. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 676-682, 2008.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

THE PLANT LIST. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em 30 de janeiro de 2015.

VARANDA, E.M. *et al.* Effect of ursolic acid from epicular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 800-803, 1992.

VEIGA, R.S.; BACCHI, E.M. *Jacaranda caroba*: toxicidade aguda, principais grupos de princípios ativos e teor de taninos. In: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2005, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, v. 1. p. 180, 2005.

VYAWAHARE, N.S. *et al.* Plants with antiulcer activity. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 5, p. 108-115, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography Atlas**. 2.ed. Berlin, London: Sprienger-Verla, 1996.

WEBSTER, D. *et al.* Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

XIE, J.H. *et al.* Gastroprotective and anti-*Helicobacter pylori* potential of herbal formula HZJW: safety and efficacy assessment. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 119, 2013.

YADAV, M. *et al.* Novel techniques in herbal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 28, n. 2, p. 83-89, 2014.

ZATTA, D.T. *et al.* Antibacterial activity of the crude ethanol extract from *Jacaranda decurrens* leaves. **Latin America Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 293-297, 2009.

APÊNDICE A

Abaixo, na **Figura A.1**, encontra-se o cromatograma da fração hidroetanólica do extrato de *J. caroba*, obtido por análise em sistema de CLAE semi-preparativo.

Figura A.1. Cromatograma da fração hidroetanólica obtida a partir do extrato de *J. caroba* proveniente de Araxá.

Equipamento Shimadzu LC-6AD, loop de 1000 μL , detector UV-Vis em 254 nm, fluxo de 10 mL/min e coluna C18 Shim-Pack PREP-ODS de 250 mm x 20 mm, tamanho de partícula de 5 μm . Fase móvel MeOH 35% em água acidificada com TFA 0,1%.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/112/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Fitoquímica e atividade antiúlcera de 'Jacaranda caroba (Vell.) A. DC.'" (Protocolo CEUA/FCF/384), de responsabilidade do pesquisador **Leandro Santoro Hernandez**, sob a orientação da Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 05 de novembro de 2012.

São Paulo, 06 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Jollson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

02/09/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 4922472/2 - Leandro Santoro Hernandez

Email:	leandro.hernandes@usp.br
Data de Nascimento:	23/05/1985
Cédula de Identidade:	RG - 33.055.852-3 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	08/02/2011
Início da Contagem de Prazo:	08/02/2011
Data Limite para o Depósito:	09/02/2015
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elfriede Marianne Bacchi - 08/02/2011 até 26/03/2015. Email: elfriede@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 08/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 06/05/2013
Data do Depósito do Trabalho:	09/02/2015
Título do Trabalho:	"Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de <i>Jacaranda decurrens</i> Cham., <i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) DC. e <i>Piper umbellatum</i> L."
Data Máxima para Aprovação da Banca:	10/04/2015
Data de Aprovação da Banca:	11/03/2015
Data Máxima para Defesa:	09/06/2015
Data da Defesa:	26/03/2015
Resultado da Defesa:	Aprovado

Acesso à dissertação/tese: **'Banco de Teses da USP'**

A titulação é: Somente USP

Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 08/02/2011 Titulado em 26/03/2015
----------------------------------	--

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Titulado em 26/03/2015

Impresso em: 02/09/2015 10:47:35

02/09/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 4922472/2 - Leandro Santoro Hernandes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EAE5702-4/5	Microeconomia I (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	14/03/2011	01/07/2011	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5794-1/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	15/03/2011	23/05/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5800-1/1	Patentes em Fármaco e Medicamentos	04/10/2011	05/12/2011	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5765-4/1	Sistemas Biomiméticos	05/10/2011	13/12/2011	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBF5791-1/2	Tecnologia de Fitoterápicos	17/10/2011	27/11/2011	60	4	100	A	N	Concluída
QBQ5747-6/3	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	21/11/2011	30/11/2011	15	1	100	A	N	Concluída
HEP5800-3/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2012	10/05/2012	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BIB5762-6/2	Métodos de Análise de Metabólitos Secundários (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	23/05/2012	03/07/2012	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2012	05/09/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	80	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	27
Estágios:			
Total:	0	20	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Titulado em 26/03/2015

Impresso em: 02/09/2015 10:47:35

02/09/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 4922472/2 - Leandro Santoro Hernandes

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
69974	Elfriede Marianne Bacchi	FCF - USP	Presidente
823742	Ivana Barbosa Suffredini	UNIP - Externo	Membro
2807984	Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno	IQ - USP	Membro
3349189	Ingrit Elida Collantes Díaz	UNIP-Norte - Externo	Membro
3127038	Gabriel Lima Barros de Araujo	FCF - USP	Membro

Última ocorrência: Titulado em 26/03/2015

Impresso em: 02/09/2015 10:47:35