UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Avaliação da Atividade Antiúlcera de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers (Crassulaceae)

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Flávia Carvalho Sobreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

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

Sobreira, Flávia Carvalho
S677a Avaliação da atividade antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.)
Pers (Crassulaceae) / Flávia Carvalho Sobreira. -- São Paulo,
2013.
106p.

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

1. Farmacognosia 2. Flavonoide : Produtos naturais 3. Fitoquímica
I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.321 CDD

Flávia Carvalho Sobreira

Avaliação da Atividade Antiúlcera de
Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Manoel Luis e Helenice,
pelo apoio incondicional.*

Agradecimentos

A Deus por iluminar o meu caminho e confortar nos momentos difíceis.

À profa. Doutora Elfriede Marianne Bacchi pelo acolhimento em seu laboratório e ter depositado em mim a sua confiança para a realização deste trabalho. Além disso, pela amizade, pela orientação, pelas soluções das dúvidas e contribuição para o meu desenvolvimento intelectual.

Aos professores Doutores Edna Tomiko Myiake Kato, Dominique Hermine Fischer e Paulo Chanel Deodato de Freitas pela amizade.

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

À professora Doutora Ingrid Elida Collantes Díaz pela atenção e elucidação de substâncias isoladas neste trabalho.

À professora Doutora Maria Lucia Zaidan Dagli (FMVZ/USP) pelo auxílio na análise histológica.

À professora Doutora Silvia Berlanga de Moraes Barros e aos seus alunos por ceder equipamento de seu laboratório para a realização de análises de quantificação.

Ao meu noivo Cleber pelo carinho, por estar sempre me apoiando em meus ideais, por me aconselhar em momentos difíceis, compartilhar momentos de alegria e também pelo auxílio gráfico em algumas ilustrações deste trabalho.

Ao meu querido irmão Guilherme pela força e pelos momentos de descontração em nossos encontros em Assis.

À toda minha família pelo incentivo.

As minhas queridas amigas-irmãs (Gi, Line e Mê) pelo harmonioso convívio durante estes anos, pelas nossas conversas, alegrias e consolos em momentos complicados.

Aos amigos e colegas de laboratório Leandro, Alberto, Brunno, Harry Leo, Thiago, Angela, Peki, Caio, Bruno, Jéssica, Marc, Natália, Jocimar, pela amizade e contribuição durante o trabalho, principalmente, ao amigo Leandro pela ajuda nas análises fitoquímicas.

À minha amiga Cíntia pela companhia, desabafos, risadas em inúmeros almoços no bandeijão.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório pela amizade e prontidão durante os experimentos.

À técnica Marguite (FMVZ/USP) pela preparação das lâminas histológicas.

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

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação David e Bete pelos esclarecimentos de dúvidas.

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

À Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais tempo realizando que sonhando,
fazendo que planejando,
vivendo que esperando porque,
quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu.”*
Luís Fernando Veríssimo

Resumo

SOBREIRA, F.C. **Avaliação da Atividade Antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae).** 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Plantas medicinais são utilizadas tradicionalmente pela população para a prevenção e tratamento da úlcera gástrica. A úlcera gástrica é uma patologia heterogênea de etiologia multifatorial. É uma doença que acomete pessoas em todo mundo tendo como consequência a elaboração de fármacos com a finalidade de amenizar os sintomas e possibilitar a cura. Entretanto, o tratamento prolongado com os recursos terapêuticos disponíveis pode ocasionar vários efeitos colaterais. Extrato de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) é utilizado pela população para o tratamento de problemas gástricos. Esta espécie está incluída na Relação Nacional de Plantas com Interesse ao SUS (RENISUS). Com a finalidade de investigar a atividade antiúlcera foram ensaiados dois modelos de lesões gástricas em animais. No modelo de indução por etanol acidificado, o extrato bruto de *K. pinnata* apresentou diminuição das lesões gástricas em 74% na dose de 200 mg/kg ($p < 0.05$) e de 98% ($p < 0.01$) na dose de 400 mg/kg. A fração acetato de etila, quando experimentada nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg, exibiu significativa redução nas lesões gástricas ($p < 0.001$), em 77%, 95% e 96%, respectivamente. O ensaio com a fração aquosa também mostrou gastroproteção visualizada pela diminuição das úlceras gástricas em 69% e 91% nas doses de 200 mg/kg ($p < 0.05$) e 400 mg/kg ($p < 0.01$), respectivamente. Em modelo de indução por ácido acético não houve diferença estatística na redução da lesão gástrica nas doses (100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg) analisadas de extrato bruto de *K. pinnata*, após 7 dias de tratamento. No entanto, foi observado uma tendência na redução da lesão gástrica nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg. Células polimorfonucleares, células mononucleares, fibroblastos e matriz extracelular foram quantificadas pela técnica de estimativa de volume celular, para verificação do processo de cicatrização. Foi constatado que nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg ocorreu uma redução da fração de volume ocupada por leucócitos polimorfonucleares, favorecendo a promoção do reparo da mucosa gástrica. Paralelamente aos estudos farmacológicos, foi efetuada a padronização do extrato e frações, a obtenção do perfil cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato bruto e frações (clorofórmica, acetato de etila e aquosa) e também por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das frações acetato de etila e aquosa. O cromatograma resultante da fração acetato de etila evidenciou dois picos de maior intensidade e o perfil cromatográfico da fração aquosa apresentou um composto majoritário. Os compostos majoritários foram isolados e caracterizados como pertencentes à classe dos flavonoides. Quercitrina foi isolada da fração acetato de etila e quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo foi isolada em ambas as frações. Os resultados da quantificação de flavonoides, da quantificação de substâncias fenólicas e da atividade antioxidante estão em consonância com os resultados biológicos apresentados, sugerindo uma possível relação dos flavonoides presentes no extrato com a atividade gastroprotetora e com a facilitação da cicatrização de úlceras gástricas.

Palavras-chave: *Kalanchoe pinnata*. Úlcera gástrica. Perfil cromatográfico. Quercitrina. Quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo.

Abstract

SOBREIRA, F.C. **Antiulcer Activity from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae).** 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Traditionally medicinal plants have been used to prevent and to treat gastric ulcer. Gastric ulcer is a heterogeneous disease of multifactorial etiology. This illness affects a considerable number of people in the world. The clinical importance about this pathology resulted in the development of pharmaceutical products. However, these pharmaceutical products are not completely effective and produce many adverse effects. Extract of leaves of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) is often used for treating gastric ulcer by the population. *K. pinnata* is included in RENISUS. So, two distinct ulcer models in rats were performed. For this were realized two distinct ulcer models in rats. In acidified ethanol model, the crude extract from leaves of *K. pinnata* showed a protection of about 74% ($p < 0.05$) at the dose of 200 mg/kg and 98% ($p < 0.01$) at the dose of 400 mg/kg. Significant inhibition ($p < 0.001$) of gastric ulcer by 77%, 95% and 96% was observed in pretreatment with ethyl acetate fraction at all the doses (100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg), respectively. The aqueous fraction reduced gastric lesions about 69% ($p < 0.05$) and 91% ($p < 0.01$) at the doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg ($p < 0.01$), respectively. In acid acetic model a statistic difference in reduction of gastric ulcer for all doses of the crude extract, after 7 days of treatment, wasn't observed. Nevertheless, the tendency about healing ulcer was verified for doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg. Polymorphonuclear cells, mononuclear cells, fibroblasts and extracellular matrix were quantified by the technique of volume estimation to detect healing effects on gastric ulcer. These doses of 200 mg/kg and 400 mg/kg reduced the volume fraction occupied by polymorphonuclear cells. This fact contributes to healing of gastric ulcer. In parallel with the pharmacological studies, the standardization of the extract and fractions was made. The chemical analysis was performed through TLC (thin layer chromatography) and HPLC (high-performance liquid chromatography). The HPLC assay showed the presence of two major components in ethyl acetate fraction and one major presence of a component in aqueous fraction. These compounds were isolated and identified as flavonoids. Quercitrin was isolated from ethyl acetate fraction and quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside was identified in the both fractions. The results of flavonoid quantification, phenolic quantification and antioxidant activity are probably correlated with the pharmacologic activity presented. These results suggest that the flavonoids present in the extract can promote gastroprotection and facilitate the healing of gastric ulcer.

Keywords: *Kalanchoe pinnata*. Gastric ulcer. Chromatographic profile. Quercitrin. Quercetin 3-O- α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) α -L-rhamnopyranoside.

Lista de Figuras

Figura 1. Folhas (1,2) e flores (3) de <i>Kalanchoe pinnata</i>	23
Figura 2. Divisões anatômicas do estômago.....	34
Figura 3. Glândulas gástricas.....	35
Figura 4. Fotomicrografia de úlcera gástrica, apresentando suas duas grandes estruturas.....	37
Figura 5. Preparação do extrato bruto e fracionamento.....	45
Figura 6. Esquema do ensaio de atividade antiúlcera aguda do extrato bruto e de frações de <i>Kalanchoe pinnata</i>	46
Figura 7. Esquema do ensaio de atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i>	47
Figura 8. Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio.....	49
Figura 9. Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	50
Figura 10. Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; *p<0.05,** p<0.01 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.....	57
Figura 11. Atividade antiúlcera aguda comparativa do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>Kalanchoe pinnata</i> na dosagem de 200 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; ** p<0.01 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.....	58
Figura 12. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; *** p<0.001 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.....	59
Figura 13. Atividade antiúlcera aguda da fração aquosa de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; * p<0.05; ** p<0.01 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.....	60

Figura 14. Atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes doses em modelo de indução por ácido acético 30%; n=6 para o grupo água; n=6 para o grupo cimetidina; n=4 para o grupo 100 mg/kg; n=5 para o grupo 200 mg/kg e n=4 para o grupo 400 mg/kg. Dose de cimetidina (controle positivo): 100 mg/kg.....	61
Figura 15. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo 100 mg/kg corada pela técnica de hematoxilina-eosina.....	62
Figura 16. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo 200 mg/kg corada pela técnica de hematoxilina-eosina.....	62
Figura 17. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo 400 mg/kg corada pela técnica de hematoxilina-eosina.....	62
Figura 18. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo cimetidina (100 mg/kg).....	63
Figura 19. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo água corada pela técnica de hematoxilina-eosina.....	63
Figura 20. Fração de volume (%) ocupada por células polimorfonucleares, células mononucleares, fibroblastos e matriz extracelular na região da serosa de estômago de ratos Wistar, submetidos a indução de úlcera subaguda por ácido acético após 7 dias com diferentes tratamentos (água n= 5, 100 mg/kg n= 3, 200 mg/kg n=3, 400 mg/kg n=3 e cimetidina n= 4).....	64
Figura 21. Curva de calibração utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos no extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>Kalanchoe pinnata</i>	65
Figura 22. Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>Kalanchoe pinnata</i>	66
Figura 23. Curva de calibração do Trolox utilizado como padrão externo para a determinação da capacidade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>Kalanchoe pinnata</i>	67
Figura 24. Curva de calibração da porcentagem da redução do DPPH radical referente à concentração do padrão externo Trolox.....	67
Figura 25. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i>	67
Figura 26. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração acetato de etila de <i>Kalanchoe pinnata</i>	68
Figura 27. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à	

concentração da fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*..... 68

Figura 28. Cromatoplaça do extrato bruto e frações de folhas de *Kalanchoe pinnata*. 1. Rutina; 2. Quercetina; 3. Extrato bruto; 4. Fração acetato de etila; 5. Fração aquosa; 6. Fração clorofórmica. Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm..... 69

Figura 29. Cromatoplaça comparativa dos extratos brutos das folhas coletadas em abril de 2010 (A1) e em fevereiro de 2011 (F1) e das frações das folhas de *Kalanchoe pinnata* realizadas em datas diferentes (D1) e (D2). 1. Extrato bruto (A1); 2. Extrato bruto (F1); 3. Fração clorofórmica (D1); 4. Fração clorofórmica (D2); 5. Fração acetato de etila (D1); 6. Fração acetato de etila (D2); 7. Fração aquosa (D1); 8. Fração aquosa (D2). Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm..... 69

Figura 30. Cromatoplaça comparativa dos extratos brutos das folhas de *Kalanchoe pinnata* coletadas em abril de 2010 (1) , em fevereiro de 2011 (2) e junho de 2011 (3). Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm..... 70

Figura 31. Cromatograma da fração acetato de etila (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 µL, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H₂O + TFA a 0.1%, 5-100% em 60 min..... 71

Figura 32. Cromatograma da fração acetato de etila (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 µL, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 25% em água acidificada com TFA 0,1%. Os picos numerados são os de maior intensidade..... 71

Figura 33. Espectros UV-Vis pertencentes aos picos majoritários, 1 e 2, da fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*. À esquerda está o cromatograma dos picos em diferentes comprimentos de onda. À direita está o espectro UV-Vis (unidades de absorbância x comprimento de onda)..... 72

Figura 34. Cromatograma da fração acetato de etila (50mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. 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 ACN 25% em água acidificada com TFA 0.1%. Os picos numerados foram isolados..... 72

Figura 35. Cromatografia da fração aquosa (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Gradiente de ACN em H₂O + TFA a 0.1%, 5- 100% em 60 min..... 73

Figura 36. Cromatograma da fração aquosa (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel ACN 25% em água acidificada com TFA 0.1%. O pico numerado é o de maior intensidade..... 73

Figura 37. Espectros UV-Vis pertencentes ao pico majoritário (3) da fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*. À esquerda está o cromatograma do pico em diferentes comprimentos de onda. À direita está o espectro UV-Vis (unidades de absorbância x comprimento de onda)..... 74

Figura 38. Cromatograma da fração aquosa (50mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. 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 ACN 25% em água acidificada com TFA 0.1%. O pico numerado foi isolado..... 74

Figura 39. Espectro de RMN ¹H em solução de CD₃OD (300 MHz) do composto majoritário, número 1, pertencente à fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*..... 75

Figura 40. Espectro de RMN ¹³C em solução de CD₃OD (75 MHz) do composto majoritário, número 1, pertencente à fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*..... 75

Figura 41. Espectro de RMN ¹H em solução de CD₃OD (300 MHz) do composto majoritário, número 2, pertencente à fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*..... 76

Figura 42. Espectro de RMN ¹H em solução de CD₃OD (300 MHz) do composto majoritário, número 3, pertencente à fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*..... 77

Figura 43. Espectro de RMN ¹³C em solução de CD₃OD (75 MHz) do

composto majoritário, número 3, pertencente à fração aquosa de <i>Kalanchoe pinnata</i>	77
Figura 44. Estrutura proposta do composto isolado de <i>Kalanchoe pinnata</i> , quercitrina.....	85
Figura 45. Estrutura proposta do composto isolado de <i>Kalanchoe pinnata</i> , quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classes de compostos descritas para <i>Kalanchoe pinnata</i>	24
Tabela 2. Flavonoides isolados de <i>Kalanchoe pinnata</i>	25
Tabela 3. Rendimento do extrato bruto de folhas de <i>Kalanchoe pinnata</i> em diferentes épocas de coleta.....	55
Tabela 4. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 20 g de extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i>	55
Tabela 5. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 60 g de extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i>	56
Tabela 6. Quantificação de flavonoides totais de <i>Kalanchoe pinnata</i> utilizando AlCl_3 como agente complexante. Os resultados de flavonoides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão.....	65
Tabela 7. Quantificação de substâncias fenólicas de <i>Kalanchoe pinnata</i> utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do seu erro padrão.....	66
Tabela 8. Concentração efetiva (CE_{50}) do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>Kalanchoe pinnata</i> no ensaio de determinação de atividade antioxidante.....	68
Tabela 9. Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) de quercitrina, composto isolado de <i>Kalanchoe pinnata</i>	76
Tabela 10. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C (300 e 75 MHz) de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ranopiranosídeo, composto isolado de <i>Kalanchoe pinnata</i>	78

Lista de Abreviaturas

ACN: Acetonitrila
CCD: Cromatografia em camada delgada
CD₃OD: metanol deuterado
CEUA: Comissão de ética no uso de animais
CE₅₀: Concentração efetiva 50%
CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitocina
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
COX-2: Ciclooxygenase-2
DL₅₀: Dose letal 50%
DPPH: 2,2'-difenil-1-picril-hidrazila
EP: Erro padrão
EGF: fatores de crescimento epidérmico
FM: Fase móvel
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos
IL-1: Interleucina 1
MEC: Matriz extracelular
NP: difenilboriloxietilamina a 1% em metanol
Rf: Fator de retenção
RMN: Ressonância magnética nuclear
s: singleto; d: dubleto; dd: duplo dubleto; m: multipletto
PDA: Arranjo de fotodiodos
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
SUS: Sistema Único de Saúde
TFA: Ácido trifluoracético
TGF-β: Fator de crescimento transformante beta
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
TRPV-1: Potencial transiente vanilóides do tipo 1
UV: Ultravioleta
UV-Vis: Ultravioleta-visível
VEGF: Fator de crescimento vascular-endotelial

Sumário

1. Introdução e Justificativa.....	19
2. Revisão Bibliográfica.....	22
2.1 <i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers. (Crassulaceae).....	23
2.1.1 Composição química.....	24
2.1.1.2 Flavonoides.....	25
2.1.2 Principais investigações farmacológicas e <i>in vitro</i>	26
2.2 Estômago.....	34
2.2.1 Regulação da secreção gástrica.....	35
2.2.2 Úlceras pépticas.....	36
2.2.3 O processo de cicatrização.....	38
2.2.4 Terapêutica da úlcera péptica.....	39
3. Objetivos.....	41
4. Material e Métodos.....	43
4.1 Coleta do material vegetal.....	44
4.2 Elaboração do extrato bruto e fracionamento.....	44
4.3 Ensaio biológicos.....	45
4.3.1 Animais.....	45
4.3.2 Atividade antiúlcera aguda- Modelo de indução por etanol e ácido clorídrico.....	45
4.3.3 Atividade antiúlcera subaguda- Modelo de indução por ácido acético.....	47
4.3.4 Análise histológica.....	48
4.4 Quantificação de flavonoides.....	48
4.5 Quantificação de substâncias fenólicas.....	49
4.6 Determinação da capacidade antioxidante.....	50
4.7 Determinação do perfil cromatográfico do extrato bruto e frações de <i>K. pinnata</i>	51
4.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	51

4.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
4.7.3 Identificação de compostos.....	52
4.8. Forma de análise dos resultados.....	53
5. Resultados.....	54
5.1 Preparo do extrato bruto e das frações.....	55
5.1.1 <i>Kalanchoe pinnata</i>	55
5.2 Atividade antiúlcera.....	56
5.2.1 Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto de <i>K. pinnata</i>	57
5.2.2 Atividade antiúlcera aguda comparativa do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de <i>K. pinnata</i>	58
5.2.3 Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de <i>K. pinnata</i>	59
5.2.4 Atividade antiúlcera aguda da fração aquosa de <i>K. pinnata</i>	60
5.2.5 Atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de <i>K. pinnata</i>	61
5.2.6 Análise histológica.....	61
5.3 Quantificação de flavonoides.....	64
5.4 Quantificação de substâncias fenólicas.....	65
5.5 Determinação da capacidade antioxidante.....	66
5.6 Determinação do perfil cromatográfico.....	69
5.6.1 Cromatografia em camada delgada.....	69
5.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE.....	70
5.6.3 Identificação de compostos.....	74
6. Discussão.....	79
7. Conclusão.....	90
Referências Bibliográficas.....	92
Anexos.....	105

INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

1. Introdução e Justificativa

O uso das plantas medicinais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, faz parte da história do homem, que data em 6000 mil anos atrás (GOSSELL-WILLIAMS; SIMON; WEST, 2006; MUTHU et al., 2006). No Brasil, o surgimento de uma medicina popular com uso das plantas deve-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus (REZENDE; COCCO, 2002).

Atualmente, as plantas medicinais são amplamente utilizadas em diversos países. Segundo o trabalho realizado por Robinson e Zhang, (2011), cerca de 70% a 95% da população que vive em países em desenvolvimento especialmente na Ásia, África, America Latina e Oriente Médio utiliza a medicina tradicional (na maioria preparações à base de plantas medicinais) para a manutenção da saúde e também para algum aspecto de cuidados básicos primários. Em alguns países industrializados, por exemplo, Canadá, França, Alemanha e Itália o uso de tal prática é igualmente significativa, pois entre 70% a 90% da população a utiliza com o título de “complementar”, “alternativo” ou “não-convencional”.

A úlcera péptica é uma patologia que denota um problema médico-social, que possui uma importância econômica global devido à sua alta incidência, ampla distribuição geográfica e alta morbidade (BUCCIARELLI et al., 2010; MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, et al.; 2009). A sua prevenção e cura são um dos mais importantes desafios da medicina, pois é uma doença de ocorrência mundial (CALAM; BARON, 2001; SUNG; KUIPERS; EL-SERAG, 2009). É estimado que na população americana de 6% a 14% dos homens e 2% a 6% das mulheres possuem úlcera péptica (KUMAR et al., 2008). De acordo com Lin et al. (2011), no período de 1980-2009 a taxa de incidência, na população mundial, de úlceras pépticas sem complicações é de aproximadamente 1 caso para 1000 pessoas-ano. Já para úlceras que apresentam complicações, tais como sangramento e perfurações é de 0.7 caso em relação a 1000 pessoas-ano.

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae) é uma espécie muito utilizada na medicina tradicional no Brasil e em outras partes do mundo, especialmente Índia, África e China (KAMBOJ; SALUJA, 2009). No Brasil está incluída na Relação Nacional de Plantas com Interesse ao SUS (BRASIL, 2010). Sendo assim, este estudo visou contribuir para o encontro de uma nova terapêutica mais efetiva e segura para o tratamento de úlceras gástricas, através da investigação da espécie

vegetal *K. pinnata*. Para isso, foram avaliadas a atividade antiúlcera aguda e subaguda bem como o isolamento e identificação de compostos sugerindo uma possível relação destes com a referida atividade farmacológica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae)

A espécie *Kalanchoe pinnata* pertence à família Crassulaceae. O gênero *Kalanchoe* compreende aproximadamente 125 espécies muitas delas nativas da África (COSTA, et al., 2008). *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon, também denominada *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, *Bryophyllum calycinum* Salisb, *Cotyledon pinnata* (Lam.) ou *Verea pinnata* (Lam.) Spreng (TROPICOS) é popularmente utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias, úlceras gástricas, queimaduras, diarreia, vômito, picadas de insetos, dores no corpo e como agente antifúngico e antibacteriano (ALMEIDA et al., 2000; KAMBOJ; SALUJA, 2009; OKWU; JOSIAH, 2006). O suco de folhas frescas é usado como terapia efetiva para o tratamento de icterícia na região de Bundelkhand, na Índia. Nas Guianas, as folhas de *K. pinnata* são utilizadas pela tribo Patamona como anti-inflamatórias e antissépticas para o tratamento de tosse e feridas (EL ABDELLAOUI et al., 2010).

SOBREIRA, 2012

<http://www.tropicos.org/>

<http://www.tropicos.org/>

Figura 1. Folhas (1,2) e flores (3) de *Kalanchoe pinnata*.

É denominada pela população de folha-da-fortuna, coirama, courama, courama-vermelha ou saião roxo. É uma planta herbácea ou sublenhosa, pouco ramificada, que atinge de 1 a 1,5 metro de altura, especialmente durante a floração. Desenvolve-se em lugares quentes e úmidos. Suas folhas são opostas, suculentas, ovaladas e de margem crenada com 10 a 20 cm de comprimento. As folhas inferiores são geralmente simples, enquanto as superiores são constituídas por 3 a 7 folíolos, longo-pecioladas. Suas flores medem 5 cm de comprimento, são violáceas,

pendentes e em cachos. Os frutos são membranáceos e as sementes elipsóides (KAMBOJ; SALUJA, 2009; LORENZI; MATOS, 2008).

2.1.1 Composição química

Nas análises fitoquímicas realizadas foram identificadas diversas classes de substâncias listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Classes de compostos descritas para *Kalanchoe pinnata*.

Classe química	Autores
Ácidos Orgânicos	PURCHER, 1942; MARRIAGE; WILSON, 1971
Alcaloides	OKWU; JOSIAH, 2006; BISWAS et al., 2011
Ácidos graxos	ALMEIDA et al., 2000
Bufadienolídeos	KAMBOJ; SALUJA, 2009; SUPRATMAN et al., 2001; YAMAGISHI et al., 1989
Esteróides	KAMBOJ; SALUJA, 2010; BISWAS et al., 2011; AFZAL et al., 2012
Flavonoides	GAIND; GUPTA, 1971; MUZITANO et al., 2006a;b;c
Gomas, Carboidratos e Mucilagens	BISWAS et al., 2011; KAMBOJ; SALUJA, 2010; MORTON, 1990
Saponinas	OKWU; JOSIAH, 2006; BISWAS et al., 2011
Taninos	CHATURVEDI; JOSHI; DUBEY, 2012; OKWU; JOSIAH, 2006;
Terpenos	SIDDIQUI et al., 1989; KAMBOJ; SALUJA, 2010

2.1.1.2 Flavonoides

Os flavonoides representam uma classe de substâncias relevante para o gênero *Kalanchoe*, assim como para a espécie *K. pinnata*, já que vários compostos flavonoídicos foram isolados (COSTA et al. 2008; MUZITANO et al., 2006a). Os flavonoides isolados e identificados para a espécie *K. pinnata* estão descritos na Tabela 2.

Estes metabólitos secundários estão distribuídos no reino vegetal. São largamente consumidos pelos humanos em sua dieta (GONZÁLEZ et al., 2011; MOTA et al., 2009; SIMÕES et al., 2007; PROENÇA DA CUNHA, 2005). São caracterizados por possuírem a estrutura 2-fenil-benzopirona (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997). Estão presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos. Ocorrem na forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos) (SIMÕES et al., 2007). Possuem atividade antioxidante (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), atividade leishmanicida (MUZITANO et al., 2006b;c; 2008), atividade anti-inflamatória (GONZÁLEZ et al., 2011), atividade antiúlcera (KWAK et al., 2012), atuam na prevenção de doenças cardiovasculares (VAN DAM; NAIDOO; LANDBERG, 2013) entre outras.

Apesar de os flavonoides serem largamente utilizados e vários estudos sugerirem promissoras atividades farmacológicas, os mecanismos de absorção digestiva e de biodisponibilidade não estão completamente explicados (ERLUND et al., 2000; PROENÇA DA CUNHA, 2005). Sabe-se que os flavonoides são absorvidos por via oral e transportados pela albumina plasmática. Sofrem metabolismo de primeira passagem, reduzindo assim a sua biodisponibilidade. Enzimas bacterianas podem também quebrar as moléculas dos flavonoides influenciando sua absorção (GONZÁLEZ et al., 2011; PROENÇA-CUNHA, 2005).

Tabela 2. Flavonoides isolados de *Kalanchoe pinnata*

Flavonoides isolados	Referências
Quercetina 3-O-ramnopiranosil-(1→6) glicopiranosídeo (Rutina)	EL ABDELLAOUI et al., 2010
Quercetina 3-O-diarabinosídeo	GAIND e GUPTA, 1971

Flavonoides isolados	Referências
Quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Quercitrina)	MUZITANO et al. 2006b
Quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo	ICHIKAWA, 1986
Kaempferol 3-O-glicosídeo	GAIND e GUPTA, 1971
Kaempferol 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo	MUZITANO et al., 2006c
Kaempferol-3-O- α -ramnopiranosídeo (afzelina)	MUZITANO et al., 2006a
Kaempferol 3-O- α -L-(2-acetil) ramnopiranosídeo-7-O- α -L- ramnopiranosídeo	TATSIMO et al., 2012
Kaempferol 3-O- α -L-(3-acetil) ramnopiranosídeo-7-O- α -L- ramnopiranosídeo	TATSIMO et al., 2012
Kaempferol 3-O- α -L-(4-acetil) ramnopiranosídeo-7-O- α -L- ramnopiranosídeo	TATSIMO et al., 2012
Kaempferol 3-O- α -D- glicopiranosídeo- 7-O- α -L-ramnopiranosídeo	TATSIMO et al., 2012
Kaempferitrina	TATSIMO et al., 2012
4',5-di-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7- O- β -D-glicopiranosídeo	MUZITANO et al., 2006c
α -ramnoisorobina	TATSIMO et al., 2012

2.1.2 Principais investigações farmacológicas e *in vitro*

Nesta seção serão reportadas as principais atividades farmacológicas e *in vitro* encontradas na literatura.

Atividade Antiúlcera

Poucos e incompletos estudos utilizando *Kalanchoe sp* e *K. pinnata* foram realizados para a verificação da atividade antiúlcera. A administração do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe ssp* resultou em uma redução nas lesões gástricas induzidas por indometacina (PEREZ; CORREA; BORGES, 1999). Adesanwo et al. (2007) também verificaram que o extrato metanólico de *K. pinnata* exerceu uma ação gastroprotetora, quando a mucosa gástrica foi exposta ao mesmo agente lesivo, citado acima. Em outro estudo, a administração da fração metanólica, por via intraperitoneal, das folhas de *K. pinnata* inibiu o desenvolvimento de úlcera gástrica aguda em ratos induzida por diversos modelos experimentais, tais como: ácido acetilsalicílico, indometacina, serotonina, reserpina, estresse, etanol 50%. No referido trabalho também foi observada significativa redução das lesões gástricas ocasionadas por aspirina na ligadura do piloro em ratos, redução de úlceras duodenais induzidas por histamina em cobaias e uma significativa cicatrização em lesões gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos (PAL; CHAUDHURI, 1991).

Atividade Anti-inflamatória

Vários trabalhos foram publicados demonstrando a atividade anti-inflamatória de *K. pinnata* (OJEWOLE, 2005; SOUSA et al., 2005; AFZAL et al., 2012).

Em 2005, Ojewole verificou que extrato aquoso das folhas de *K. pinnata*, nas doses de 50-800 mg/kg administrados por via intraperitoneal, produziram um significativo efeito antinociceptivo contra agente indutor térmico (chapa quente) e químico (ácido acético). No mesmo trabalho também foi observado que na dose de 400 mg/kg de extrato aquoso, via oral, houve redução da atividade anti-inflamatória aguda verificada pela diminuição do edema em pata traseira de ratos. O edema foi induzido por injeção subplantar de albumina. No mesmo ano, também foi publicado um trabalho realizado por Sousa et al. (2005), no qual foi constatada a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* no edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana. A dose oral de 500mg/kg do extrato inibiu de maneira significativa o edema de pata induzido por dextrana ($p < 0.05$) nos tempos de 60 e 90 minutos. Em contrapartida, somente a dose oral de 1 g/kg de extrato inibiu o

edema de pata induzido por carragenina. Os resultados indicaram efeito antiedematogênico da amostra sugerindo maior especificidade de ação do extrato sobre o edema induzido por dextrana.

Em um trabalho recente AFZAL et al. (2012) verificaram que o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata*, na dose de 400 mg/kg, via oral, e o composto estigmast-4, 20 (21), 23-trien-3-ona, isolado do extrato aquoso, na dose de 300 mg/kg v.o, reduziram inflamação induzida por carragenina em ratos Wistar. A porcentagem de inibição da atividade inflamatória foi de 87,29% para o extrato aquoso e 84,45% para o composto isolado. Além disso, foi observado que este composto esteroidal, na dose de 300 mg/kg administrado por via intraperitoneal, possui significativa atividade analgésica quando comparado com a fármaco padrão (diclofenaco) e o extrato aquoso. Dessa maneira, os autores sugerem que ambas as atividades verificadas para o extrato aquoso estão relacionadas principalmente com a presença deste composto esteroidal.

Atividade Antioxidante

Alguns estudos foram realizados com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante de *K. pinnata* utilizando o método *in vitro* estabelecido pela medida de capacidade sequestrante de radicais livres através do DPPH (2,2'-difenil-1-picril-hidrazila) (GUPTA et al., 2009; MAJAZ et al.; 2011; TATSIMO et al.2012).

Dois trabalhos publicados avaliaram a atividade antioxidante de diversos extratos de *K. pinnata*. Em ambos os estudos o extrato metanólico obteve a melhor capacidade sequestrante de radicais livres. No trabalho realizado por Gupta et al. (2009), o extrato metanólico das folhas de *K. pinnata* apresentou atividade sequestrante de radicais livres em 63.97% quando comparada com o padrão BHT. Já no estudo conduzido por Majaz et al. (2012), o extrato metanólico das raízes produziu uma atividade de 73.37%, quando comparada com o ácido ascórbico.

Em um estudo recente, TATSIMO et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico, fração acetato de etila e fração hexânica da planta inteira *K. pinnata*. Esta atividade também foi verificada em 6 compostos isolados da fração acetato de etila. Ácido ascórbico foi utilizado como substância referência. De acordo com o estudo o extrato metanólico apresentou melhor atividade (CE_{50} = 52.48 μ g/mL) em comparação com fração acetato de etila (CE_{50} =

78.11 µg/mL) e fração hexânica (CE_{50} =90.04 µg/mL). Em relação aos compostos isolados, todos identificados como pertencentes ao grupo dos flavonoides, apresentaram atividade. O composto identificado como α -ramnoisorobina (CE_{50} =0.71 µg/mL) obteve resultado mais satisfatório que o ácido ascórbico (CE_{50} =0.96 µg/mL). Os autores sugerem que são os flavonoides responsáveis pela atividade antioxidante do extrato metanólico e que o fracionamento deste não aumentou tal atividade nas frações.

Atividade Cicatrizante

A atividade cicatrizante do extrato etanólico de folhas de *K. pinnata* foi avaliada em modelo animal através de incisão no dorso. Animais tratados durante 11 dias com o extrato, na dose de 100 mg/kg via tópica, apresentaram inibição da lesão em 86.33%, comparando ao grupo controle negativo, óleo de petróleo (69.36%) e com o grupo tratado com a substância-padrão, muciprocina (85.49%). Análises histológicas exibiram uma significativa cicatrização. Segundo os pesquisadores, a atividade cicatrizante exercida pelo extrato pode ser devido à atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Os autores ressaltam também que mais investigações devem ser realizadas em relação aos bufadienolídeos, uma classe de metabólitos encontrada em espécie de *K. pinnata*, para a verificação de uma possível relação com a atividade biológica observada (NAYAK; MARSALL; ISITOR, 2010).

Atividade Antimicrobiana e Citotóxica

O desenvolvimento de resistência à maioria de agentes microbianos e o alto custo do tratamento consequente desta resistência trouxe a necessidade da pesquisa de novos compostos ativos, seguros, eficazes e eficientes no controle de infecções (OKWU; NNAMDI, 2009).

Vários estudos utilizando folhas de *K. pinnata* foram realizados para a verificação da atividade antimicrobiana (AKINPELU, 2000; BISWAS et al., 2011; EL ABDELLAOUI et al., 2010).

Em um trabalho recente realizado por El Abdellaoui et al. (2010) foi observada uma significativa inibição do crescimento dos micro-organismos (*Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida*

albicans), com a dose de 500 µg/mL do extrato metanólico das folhas de *K. pinnata*. Akinpelu (2000) também observou tal atividade, no entanto, não verificou a inibição para as bactérias *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, assim como, para o fungo *Candida albicans*. Biswas et al. (2011) verificaram atividade antimicrobiana do extrato etanólico de folhas *K. pinnata*. A maior zona de inibição que o extrato promoveu foi contra *E. coli* e este resultado justifica o uso desta espécie na medicina tradicional contra diarreia, disenteria e outros distúrbios gastrointestinais.

As frações de *K. pinnata* foram avaliadas quanto a sua ação em bactérias responsáveis por ocasionar infecções no trato respiratório. A fração n-hexânica mostrou uma atividade significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*. A fração acetato de etila apresentou atividade moderada contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi* (MUDI; IBRAHIM, 2008). Em outro trabalho, Tatsimi et al. (2012) verificaram que a fração acetato de etila é mais ativa contra micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*) quando comparada com extrato metanólico e com a fração hexânica. Já que os principais ativos supostamente estão em maior concentração na fração acetato de etila, os autores isolaram e identificaram sete compostos flavonoídicos desta fração. Os compostos isolados foram testados e o flavonoide α -ramnoisorobina apresentou atividade antimicrobiana mais eficiente e semelhante aos antibióticos ciprofloxacino e nistatina.

Okwu e Nnamdi (2011) isolaram e identificaram um alcalóide fenantrênico (etanamino-7-Hex-1-in-5-ona fenantreno) do extrato etanólico das folhas de *K. pinnata*. Este composto bioativo promoveu a inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Os autores concluíram que este composto possui atividade contra bactérias gram-negativas e gram-positivas bem como ação contra fungos.

Quanto à citotoxicidade, foram realizados alguns estudos (BISWAS et al., 2011; EL ABDELLAOUI et al., 2010; GREER et al., 2010). El Abdellaoui et al. (2010) verificaram que uma das frações do extrato metanólico, além de ser eficaz contra os micro-organismos também apresentou baixa atividade citotóxica. Greer et al. (2010) observaram que o extrato acetônico de raízes de *K. pinnata* apresentou citotoxicidade pouco expressiva em células Vero C1008, além de também apresentar atividade antiviral, contra o vírus da herpes HSV1 e HSV2.

Outras Atividades

Vários estudos farmacológicos e *in vitro* foram realizados utilizando a espécie vegetal *K. pinnata*. Assim diversas atividades foram descritas, tais como: antialérgica, antidiabética (OJEWOLE, 2005), nefroprotetora (HARLALKA; PATIL; PATIL, 2007), anti-hipertensiva (OJEWOLE, 2002), hepatoprotetora (YADAV; DIXIT, 2003), leishmanicida, tocolítica, antitumoral e imunossupressora.

Cruz et al. (2008) relataram efeito protetor em 100% de camundongos no experimento contra o choque anafilático, com a administração do extrato aquoso de folhas de *K. pinnata*. Verificaram também que a quercitrina, isolada do extrato aquoso, apresentou resultados positivos, protegendo 75% dos animais contra essa reação alérgica fatal. Os autores sugerem que a quercitrina, mesmo não oferecendo proteção máxima, é um componente fundamental contra a reação alérgica exacerbada. Em 2012, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que o extrato aquoso de *K. pinnata* e a quercetina inibiram de maneira efetiva a degranulação de mastócitos e produção de citocinas, *in vitro*. Em consonância com este resultado, a administração de extrato aquoso de *K. pinnata* e de quercetina em camundongos revelaram uma redução da hiper-responsividade e inflamação das vias aéreas, quadro clínico característico da asma. Estes resultados não foram observados para a quercitrina, substância também avaliada neste estudo (CRUZ et al., 2012).

Vários trabalhos foram realizados para a demonstração de atividade leishmanicida (Da Silva et al., 1995, Muzitano et al., 2006b;c; 2008). Da Silva et al. (1995) avaliaram o efeito do extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*. No tratamento por via oral com o extrato, houve a diminuição do crescimento das lesões acompanhada pela diminuição dos números de parasitas viáveis.

Em estudo posterior realizado por Muzitano et al. (2006b) foi isolado do extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* um flavonoide glicosilado identificado como quercitrina e verificada, *in vitro*, sua atividade leishmanicida. Observou-se que a quercitrina em uma concentração de 100 µg/mL, inibiu 93.9% do crescimento de *Leishmania amazonensis* nas formas amastigotas e também apresentou baixa citotoxicidade. Esse foi o primeiro estudo relatando a atividade antileishmania de um flavonoide glicosilado. No mesmo ano, Muzitano et al. (2006c) isolaram e identificaram mais três constituintes: kaempferol 3-O-α-L-arabinopiranosil (1→2) α-L-

ramnopiranosídeo, quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo e 4',5-di-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glicopiranosídeo do extrato aquoso das folhas de *K. pinnata*, sendo que a importância farmacológica dos flavonoides para a referida atividade foi constatada em trabalho anterior (MUZITANO et al., 2006b). Estes flavonoides foram testados separadamente, *in vitro*, contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*. Quercitrina novamente foi testada neste trabalho. O flavonóide citado apresentou melhor atividade ($IC_{50} \cong 8\mu\text{g/mL}$), seguido do composto quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo ($IC_{50}= 45\mu\text{g/mL}$). Kaempferol 3-O-a-L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo e 4',5-di-hidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glicopiranosídeo não mostraram atividade satisfatória. Os autores sugerem que a aglicona, quercetina, possui importância para a atividade leishmanicida.

Com o objetivo de confirmar atividade *in vitro* anteriormente descrita, Muzitano et al. (2008) testaram os flavonoides (quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo e quercitrina) isolados do extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* em testes *in vivo* (modelo de leishmaniose cutânea). Verificaram diminuição da lesão em animais infectados por *Leishmania amazonensis*. Gomes et al., (2010) também investigaram, *in vivo*, a eficácia do extrato aquoso de *K. pinnata* em camundongos infectados com *Leishmania chagasi*. Ao final do tratamento, os autores verificaram uma significativa redução de carga parasitária nos animais infectados.

Em uma pesquisa realizada em 2003, foi relatado o tratamento oral, durante 14 dias, com o extrato aquoso de *K. pinnata* na dose de 215 mg/kg em um homem com 36 anos de idade com leishmaniose cutânea. Durante o tratamento houve regressão da lesão. Não foram observados reações adversas e sinais de toxicidade (TORRES-SANTOS et al., 2003). Os autores constataram que *K. pinnata* contém substâncias ativas e seguras para o tratamento oral em humanos contra leishmaniose cutânea.

Plangger et al. (2006) verificaram que a administração intravenosa do extrato aquoso de *K. pinnata* acarretou o prolongamento da gravidez, com redução de contrações uterinas durante o trabalho de parto precoce, observado em 67 mulheres grávidas com 25 a 35 semanas de gestação. Os autores relataram também que o tratamento com *K. pinnata* resultou em maior tolerabilidade em relação aos efeitos adversos em comparação com beta-agonistas, atualmente utilizados na clínica para

o retardo do parto. De acordo com os autores, mais estudos precisam ser realizados para elucidar a ação destes compostos nas células uterinas. Em um estudo recente, Simões-Wüst et al. (2010) investigaram a influência do suco de folhas frescas de *K. pinnata* em células de miométrio humano em resposta a estimulação de ocitocina, um hormônio envolvido na estimulação de contrações uterinas. De acordo com a pesquisa realizada, o suco de *K. pinnata* em uma concentração de 2% impediu a indução de ocitocina em 80%. Essas evidências podem colaborar para o seu uso como agente tocolítico.

Também foi relatada a atividade antitumoral de *K. pinnata*. Supratman et al. (2000) isolaram três compostos da classe dos bufadienolídeos de folhas frescas de *K. pinnata* e foram identificados como briofilina A, briofilina C e bersaldegenina-3-acetato. Em estudo posterior, os compostos ensaiados apresentaram atividade inibitória. Os autores sugerem que estes bufadienolídeos possuem um alto potencial para a quimioprevenção contra o câncer (SUPRATMAN et al., 2001).

Rossi-Bergmann et al. (1994) relataram que o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* ocasionou uma significativa inibição de células mediadoras e da resposta imune humoral em ratos, evidenciando assim, atividade imunossupressora. Almeida et al. (2000) observaram que uma subfração mais apolar da fração aquosa do extrato etanólico de folhas de *K. pinnata* foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos humanos e de murinos *in vitro*. Essa atividade foi atribuída aos ácidos graxos presentes na subfração.

O extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* possui ação depressora sobre o sistema nervoso central (SALAHDEEN et al., 2006). Joseph et al. (2011), em seu trabalho de revisão, relataram que a administração do extrato de folhas de *Kalanchoe sp* provocou ação sedativa e depressora do sistema nervoso central em estudos com animais.

Ensaio Toxicológicos

A toxicidade do extrato aquoso das folhas de *K. pinnata* foi avaliada durante o tratamento, via oral por 30 dias, em camundongos infectados com *L. amazonensis* tratados com 16 mg do extrato. Análises mostraram que níveis de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), uréia, fosfatase alcalina permaneceram nos níveis aceitáveis durante o tratamento crônico, evidenciando a

ausência de toxicidade crônica para o fígado, coração e rins (TORRES-SANTOS *et al.*, 2003).

Sousa *et al.* (2005), com o objetivo de determinar a toxicidade aguda através da DL_{50} do extrato aquoso de folhas de *K. pinnata*, administraram doses de 0.1 a 8 g/kg, por via oral, de extrato em camundongos. Não houve óbito em nenhum dos animais estudados, não sendo possível determinar a DL_{50} .

2.2 Estômago

O estômago possui três funções gerais: armazenamento, digestão e proteção (SILVERTHORN, 2010). No estômago são identificadas quatro regiões: cárdia, fundo, corpo e piloro ou antro. As regiões do fundo e corpo possuem estrutura microscópica idêntica e, portanto, apenas três regiões são histologicamente consideradas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 2. Divisões anatômicas do estômago. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008.

O estômago secreta cerca de 2.5 litros de suco gástrico por dia (RANG *et al.*, 2007). Também secreta grande quantidade de muco e bicarbonato, importante na proteção da mucosa gástrica (KOEPPEN; STANTON, 2009).

A mucosa gástrica possui dois tipos importantes de glândulas tubulares: as glândulas oxínticas e as glândulas pilóricas, além das células secretoras de muco que revestem toda a superfície do estômago. As glândulas oxínticas são compostas por células parietais (que secretam o ácido clorídrico), células do tipo enterocromafins (que secretam a histamina), células pépticas ou principais (que secretam pepsinogênio), células D (que secretam somatostatina), células mucosas

(que secretam o muco). Já, as glândulas pilóricas possuem células G (responsáveis por liberar o hormônio gastrina), células D e células mucosas (que secretam muco para proteção da mucosa pilórica). As glândulas oxínticas localizam-se nas superfícies internas do corpo e do fundo do estômago. As glândulas pilóricas localizam-se na porção antral do estômago (GUYTON, 1997; SCHUBERT; PEURA, 2008).

Figura 3. Glândulas gástricas. Adaptado: SCHUBERT; PEURA, 2008.

2.2.1 Regulação da secreção gástrica

A acetilcolina (neurotransmissor parassimpático vagal), a gastrina (hormônio sintetizado e secretado pela célula G do antro gástrico) e a histamina (autacoide sintetizado a partir da histidina, pelas células enterocromafins) estimulam diretamente a secreção do ácido gástrico. A acetilcolina estimula a secreção de pepsinogênio pelas células pépticas, de ácido clorídrico pelas células parietais e de muco pelas células mucosas. Já, a gastrina e a histamina estimulam acentuadamente a secreção de ácido pelas células parietais (GUYTON, 1997; AIRES, 2008).

A inervação parassimpática pelo nervo vago é o indutor mais forte da secreção gástrica de H^+ . A acetilcolina liberada pelos neurônios pós-ganglionares do nervo vago estimula a secreção ácida por ação direta na célula parietal pela ativação

dos receptores muscarínicos do tipo M_3 . Além disso, este neurotransmissor estimula a secreção de histamina pelas células enterocromafins e as células G a liberarem gastrina. Este hormônio ativa receptores de colecistocinina tipo 2 (CCK_2), localizados na célula parietal, estimulando-as a secretarem H^+ , desencadeando na formação de ácido (KOEPPEN; STANTON, 2009; LEVY; KOEPPEN, STANTON, 2006).

A gastrina também promove a liberação de histamina pela estimulação das células enterocromafins, com consequente liberação de ácido. A histamina difunde-se para seus alvos, as células parietais, ocasionando a secreção ácida pela ativação dos receptores histaminérgicos (H_2) presentes nessas células (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2010).

A inibição da secreção gástrica é controlada, principalmente, pela somatostatina (presente nas células D da glândula oxíntica e pilórica) que age diretamente nas células parietais e indiretamente por inibir a secreção de histamina e gastrina. Os fatores de crescimento epidérmico (EGF) e as prostaglandinas, principalmente a E_2 e I_2 , que estimulam os receptores EP_3 e IP também estão envolvidos na regulação da secreção ácida (RANG et al., 2007; AIRES, 2008).

2.2.2 Úlceras pépticas

A úlcera péptica representa uma das mais importantes doenças do sistema digestório (BUCCIARELLI et al., 2010). São lesões que podem se localizar na mucosa gástrica ou duodenal. Apresenta-se como descontinuidade da mucosa do trato alimentar que se estende através da muscular da mucosa em direção à submucosa ou mais profundamente. São lesões crônicas, geralmente, solitárias com menos de 4 cm de diâmetro (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A úlcera gástrica ocorre mais comumente em pacientes com mais de 40 anos de idade. Já a idade predominante na qual a úlcera duodenal ocorre é entre 20 e 50 anos. A incidência da doença gastroduodenal é de aproximadamente 1 a 2 por 1.000 habitantes por ano. Dois terços dos pacientes com úlceras são homens e esta patologia é mais comum em fumantes. O risco de recorrência da úlcera péptica é alto (KUIPERS; BLASER, 2009). Segundo a Federação Brasileira de Gastroenterologia (2012) não há uma estatística precisa em relação ao número de potenciais portadores de úlcera péptica no Brasil.

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

Figura 4: Fotomicrografia de úlcera gástrica, apresentando suas duas grandes estruturas. A representa a região da margem da úlcera; B representa a região da base da úlcera. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 3.2 x. SOBREIRA, 2012.

A patogênese das úlceras pépticas vem sendo estudada por muitos anos. A sua fisiopatologia resulta do desequilíbrio de fatores protetores (prostaglandinas, muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, NO, dentre outros) e lesivos (pepsina, ácido clorídrico e radicais livres) resultando, assim, em inflamação aguda na mucosa gastroduodenal (KAWANO; TSUJI, 2000; KUMAR et al.; 2008; MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL et al., 2009).

A infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* é um fator que pode desencadear o aparecimento dessas lesões. Estudos epidemiológicos revelaram a forte associação entre a infecção por *Helicobacter pylori* com úlceras gástricas e duodenais. Mais de 50% da população mundial tem infecção crônica por *H. pylori* na mucosa gástrica e de 5-10% dos infectados desenvolvem úlceras (MALFERTHEINER; CHAN; McCOLL, 2009).

O uso regular de AINE (anti-inflamatórios não esteroidais), estresse, o consumo excessivo de álcool, fumo e uso de corticosteróides em altas doses podem desencadear e agravar estas lesões (KUMAR et al.; 2008).

2.2.3 O processo de cicatrização

O processo de cicatrização inicia após um trauma ou uma patologia. Durante este processo há substituição de um tecido lesado por tecido conjuntivo vascularizado. Tal evento é dividido em três fases, que são: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de maturação ou de remodelamento. Estas fases se sobrepõem, mas não se excluem e tem a finalidade de restabelecer o tecido após injúria (HATANAKA, CURI, 2007; PORTH, MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008).

A fase inflamatória ocorre na maioria das formas de lesão a que os organismos vivos estão sujeitos. Esta fase inicia no momento da injúria e tem a função de preparar o ambiente da ferida para a cura. Tem duração de 48 a 72 horas e é evidenciada pelos seus sinais clássicos como dor, rubor, calor e edema. Suas características principais são alterações vasculares (vasodilatação e permeabilidade aumentada) e a migração de leucócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos, predominantemente neutrófilos (PORTH; MATFIN, 2010).

Os neutrófilos são as células mais abundantes do sangue e alcançam a área inflamada em poucos minutos. Estas células produzem uma grande variedade de proteinases e espécies reativas de oxigênio com a finalidade de formar uma barreira contra a invasão de microrganismos na área lesada e realizar fagocitose dos produtos resultantes da lise tecidual. Além disso, estão relacionados com a formação de tecidos devido a produção de fatores de crescimento e citocinas, como por exemplo a IL-1. Os macrófagos são células teciduais derivados de monócitos. São as células dominantes na inflamação crônica. Auxiliam na fagocitose de material estranho e removem neutrófilos senis. Quando ativados produzem citocinas (TNF- α e IL-1) e fatores de crescimento cruciais na maturação da reação inflamatória e no início do processo de cura (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; HATANAKA, CURI, 2007; PORTH; MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008).

A fase proliferativa também denominada fase fibroblástica e de deposição da matriz extracelular começa dentro de 2 a 3 dias de injúria e pode durar cerca de 3 semanas. Muitos fatores de crescimento estão envolvidos neste processo, incluindo o TGF- β , PDGF, VEGF e o FGF intensificando a migração e ativação de fibroblastos para a produção de colágeno no local. Além disso, há indução de angiogênese e a proliferação e migração de células endoteliais. Assim, a matriz celular começa a ser

substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico (PORTH; MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008) .

Por último, ocorre a fase de remodelamento do tecido que pode se prolongar por 6 meses ou mais, dependendo da extensão da lesão. O processo de remodelação envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. Nesta fase, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (HATANAKA, CURI, 2007; PORTH; MATFIN, 2010; KUMAR et al., 2008).

2.2.4 Terapêutica da úlcera péptica

O tratamento farmacológico para úlceras gástricas está relacionado com a utilização de medicamentos que diminuem a secreção ácida e/ou a neutralização do ácido e/ou a potencialização dos mecanismos de proteção da mucosa (citoprotetores) (RANG et al., 2007).

Os inibidores da bomba de prótons são utilizados mais comumente, seguidos dos antagonistas dos receptores H_2 (GOODMAN; GILMAN, 2007).

Os inibidores da bomba de prótons são os supressores mais potentes da secreção de ácido gástrico, já que inibem irreversivelmente a H^+/K^+ ATPase. São pró-fármacos que exigem ativação em meio ácido. Consistem em bases fracas lipofílicas e se acumulam no ambiente ácido dos canalículos da célula parietal estimulada, onde são ativados. A classe de inibidores da bomba de prótons é representada por omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol (RANG et al., 2007; JAIN et al., 2007). Os antagonistas dos receptores de H_2 , ranitidina, cimetidina, famotidina e nizatidina, inibem a secreção ácida, por competir com a histamina pelos receptores H_2 nas células parietais. São rapidamente absorvidos pelo intestino (KATZUNG, 2006; RANG et al., 2007).

Os sais de magnésio e de alumínio pertencem à classe dos antiácidos. Neutralizam o ácido gástrico e são considerados adjuvantes no tratamento das úlceras. Os citoprotetores protegem a mucosa gástrica ou proporcionam uma barreira física sobre a superfície da úlcera. São eles: quelato de bismuto, sulcrafato, carbenoxolona e misoprostol (RANG et al., 2007).

Quando a úlcera gástrica é decorrente da infecção pela bactéria *H. pylori* é necessário associar os antimicrobianos ao tratamento com antagonistas dos

receptores de H_2 ou inibidores da bomba de prótons. Geralmente utilizam-se associações de três fármacos, omeprazol/ amoxicilina/ metronidazol, omeprazol/ claritromicina/ amoxicilina ou tetraciclina, ranitidina/ metronidazol/ tetraciclina, tetraciclina/ metronidazol/ compostos de bismuto (MÖSSER; CACA, 2005).

O tratamento prolongado com fármacos antagonistas dos receptores de H_2 e inibidores da bomba de prótons ocasiona alguns efeitos indesejáveis como: diarreia, colite, tontura, ginecomastia, além de induzir hiperplasia nas células gástricas, que pode conduzir a reincidência da úlcera e indução de câncer gástrico (RANG et al., 2007; BABU et al., 2010; KESZTHELYI et al., 2010). Dessa maneira, uma alternativa para o tratamento com fármacos sintéticos seria a utilização de derivados de drogas vegetais. Diversas substâncias de origem vegetal, entre elas flavonoides têm apresentado atividade antiúlcera satisfatória (BORRELI; IZZO, 2000; SANNOMIYA et al., 2005; ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

OBJETIVOS

3. Objetivos

O presente estudo tem como objetivos o estudo farmacológico e fitoquímico das folhas de *Kalanchoe pinnata*, visando a atividade antiúlcera.

São objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antiúlcera aguda do extrato bruto e das frações;
- Avaliar a atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto;
- Avaliar a atividade antioxidante utilizando o método de DPPH;
- Determinar o perfil cromatográfico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato bruto e de suas frações;
- Determinar o perfil cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração acetato de etila e fração aquosa;
- Isolar e identificar compostos majoritários presentes na fração acetato de etila e fração aquosa;
- Quantificar flavonoides;
- Quantificar substâncias fenólicas.

MATERIAL e MÉTODOS

4. Material e Métodos

4.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal, folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) foi fornecido pelo Dr. Ílio Montanari Junior do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CQBA-UNICAMP). A coleta foi realizada em abril de 2010, fevereiro de 2011 e junho de 2011. Exsicata de *K. pinnata* foi depositada no herbário CPMA (Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas), localizado no CPQBA-UNICAMP, sob número 337. A espécie foi identificada pela botânica Kátia Calago.

4.2 Elaboração do extrato bruto e fracionamento

As folhas de *K. pinnata* (Lam.) Pers. (Crassulaceae) foram rasuradas e secas em estufa de circulação de ar, a uma temperatura de 40°C até completa secagem.

O extrato bruto foi elaborado por maceração. No processo por maceração as folhas rasuradas ficaram em contato com o solvente hidroetanólico 70% por 7 dias. O procedimento foi realizado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1959). O extrato hidroetanólico 70% foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura de 40°C, resultando no extrato bruto. A água remanescente do extrato bruto foi retirada pelo processo de liofilização.

O extrato bruto liofilizado de *K. pinnata* foi fracionado por partição líquido-líquido com clorofórmio, acetato de etila e água na proporção de 10g de extrato para 100 mL de solvente. Foram realizadas três extrações com cada solvente. Primeiramente, a amostra foi dissolvida em água destilada. Efetuada esta etapa, foi adicionado o solvente clorofórmio. Essa mistura foi transferida para um funil de separação e submetida à agitação. A fração clorofórmica foi recolhida, filtrada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida à temperatura de 40°C. Da mesma maneira ocorreu a extração com o solvente acetato de etila. A fração aquosa foi liofilizada (Figura 5).

Figura 5. Preparação do extrato bruto e fracionamento.

4.3 Ensaios biológicos

4.3.1 Animais

Os animais, ratos Wistar fêmeas (150 a 180g), utilizados nos ensaios foram provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Foram mantidos em gaiolas apropriadas, com ciclo de claro-escuro regulado para 12/12 horas, com umidade de, aproximadamente, 85%. O projeto foi aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da FCF-USP, (CEUA/FCF/ 284).

4.3.2 Atividade antiúlcera aguda – Modelo de indução por etanol e ácido clorídrico

Para a avaliação da atividade antiúlcera gástrica e da relação dose-efeito do extrato bruto e das frações de *K. pinnata* foi empregado o modelo de indução aguda por etanol acidificado (MIZUI; DOTEUCHI, 1983).

Ratos Wistar fêmeas foram mantidos em jejum de 12 horas antes de cada experimento, com livre acesso à água. Nos testes iniciais foram administradas aos animais, por via oral, as doses de 100, 200 e 400 mg/kg de extrato bruto de *K. pinnata*. Posterior a este teste inicial foram administradas as frações acetato de etila

e aquosa, nas mesmas doses citadas acima. A fração clorofórmica não foi testada, pois foi produzida com intuito de eliminar compostos pouco polares, como clorofila, das amostras. Para os animais do grupo controle negativo foi administrada, por via oral, água destilada (1mL/100g de animal) e para os animais do grupo controle positivo, lansoprazol comprimidos-EMS®, na dose de 30 mg/kg (TOMA et al., 2002).

Transcorridos trinta minutos da administração do extrato bruto ou das frações de *K. pinnata* e dos controles positivo e negativo, foi administrado, por via oral, 1mL/100g de solução 0,3M de ácido clorídrico em etanol a 60% a todos os animais. Após uma hora da administração do indutor, os animais foram mortos em câmara de CO₂. Os estômagos foram retirados, abertos pela curvatura maior, lavados com água corrente, prensados entre placas de vidro. A área das ulcerações foi medida através do programa *Image Pro-Plus®*. A Figura 6 esquematiza o experimento de atividade antiúlcera aguda.

Os resultados foram expressos em porcentagem de área relativa de lesão ulcerativa analisada através das medidas de área total da lesão ulcerativa, em mm², calculada pela somatória das áreas de lesão individual e área total do estômago.

Figura 6. Esquema do ensaio de atividade antiúlcera aguda do extrato bruto e de frações de *Kalanchoe pinnata*.

4.3.3 Atividade antiúlcera subaguda- Modelo de indução por ácido acético

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

Primeiramente, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Logo depois, foi realizada uma aplicação de 0,05 mL de ácido acético a 30% na região abaixo da serosa do estômago. Após isso, o abdômen do animal foi suturado e o corte tratado com álcool iodado. A partir do segundo dia após a cirurgia, o extrato bruto foi administrado, por via oral, diariamente nas doses 100, 200 e 400 mg/kg em suspensão aquosa, por 7 dias. Para os animais do grupo controle negativo foi administrada, por via oral, água destilada (1mL/100g de animal). O fármaco de referência utilizado foi a cimetidina Tagamet® (100 mg/kg), administrado ao grupo controle positivo.

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

Figura 7. Esquema do ensaio de atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata*.

4.3.4 Análise histológica

Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

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

Na análise histomorfométrica, com o auxílio de um retículo contendo 35 pontos, foi realizada a quantificação de células polimorfonucleares, células mononucleares, fibroblastos e matriz extracelular pela técnica de estimativa de volume celular, adaptada de Weibel (1979).

Para realizar tal quantificação foram examinados 5 campos aleatórios de cada lâmina, na qual a contagem foi realizada em cada cruzamento das linhas do grid. Esta análise foi realizada em aparelho Nikon Eclipse E 800 e a captação da imagem foi realizada pela câmera Media Cibernetics, modelo Cool Snap-Procf. Os resultados foram expressos em fração de volume celular (%), como descrito por Dagli et al., 1998.

4.4 Quantificação de flavonoides

Para a quantificação foi empregado o método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl_3) como agente complexante. Isso porque, o íon Al^{3+} se complexa com os oxigênios vicinais presentes nos flavonoides, ocorrendo um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda, possibilitando a determinação da quantidade de flavonoides (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Abaixo está a figura representativa dos sítios quelantes presentes nos flavonoides.

Figura 8: Reação de complexação de flavonoide com cloreto de alumínio (MABRY; MARKHAM, THOMAS, 1970).

A metodologia utilizada foi adaptada da Farmacopeia Francesa (POZZI, 2007). A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinada, após 30 minutos da adição do agente complexante (solução de AlCl_3 a 2% em etanol 60%), em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 430 nm. As amostras foram analisadas em triplicata.

Para a execução da técnica utilizou-se quercetina (Sigma Aldrich) em etanol 60% como padrão externo. A construção da curva de calibração foi preparada a partir da solução de quercetina nas seguintes concentrações: 200 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de flavonoides foi calculada de acordo com a equação da reta, obtida da curva de calibração.

A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata*. Para isso preparou-se soluções em etanol 60 % com concentração de 2.5 mg/mL para o extrato bruto, 1 mg/mL para a fração acetato de etila e 5 mg/mL para a fração aquosa. Os valores foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

4.5 Quantificação de substâncias fenólicas

O método utilizado foi de Folin-Ciocalteu. A quantificação foi realizada em placas de 96 poços e as absorbâncias determinadas, após 2 horas de reação no escuro, em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek® em um comprimento de onda de 760 nm. As amostras foram analisadas em triplicata. Ácido gálico em etanol a 10% foi utilizado como padrão externo.

Para a realização da técnica foi empregado 50 μL de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), 20 μL de amostra ou padrão, 30 μL de água destilada e 100 μL de carbonato de sódio a 700mM. As amostras quantificadas foram: extrato bruto, fração

acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata*. Desta maneira, foram preparadas soluções em etanol a 10% a uma concentração de 500 µg/mL para o extrato bruto e fração aquosa e uma concentração de 100 µg/mL para a fração acetato de etila. Os valores foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste do ácido fosfotúngstico/fosfomolibdênico e quando reage com compostos fenólicos há transferência de elétrons formando um complexo de coloração azul e que pode ser espectrofotometricamente determinados. A reação ocorre em meio alcalino (AINSWORTH; GILLEPSIE, 2007).

4.6 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata* foi determinada pelo método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O DPPH (Figura 9) é um radical livre estável, o qual apresenta um máximo de absorção em 517 nm. Este radical é reduzido na presença de compostos que possuem um potencial antioxidante provocando um decaimento da absorbância. O decaimento da absorbância é devido à perda da coloração violácea que o DPPH radical possui (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MOLYNEUX, 2004).

Figura 9: Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (MOLYNEUX, 2004).

Neste experimento foi utilizado como substância referência o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®). Foram adicionados, em microplacas de 96 poços, 50 µL das amostras a serem testadas (extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata*) e do Trolox®, diluídos em metanol 80%. Nas

amostras e na substância padrão foram acrescentados 150 µL da solução de DPPH radical (175 µM). O DPPH radical foi primeiramente solubilizado em metanol e após a sua completa solubilização foi adicionada água destilada para realizar a proporção metanol 80%. A amostra controle foi preparada por 50 µL de metanol 80% e 150 µL de DPPH radical e para a amostra utilizada como branco foi adicionado 200 µL de metanol 80%. Após duas horas de reação na ausência de luz, a absorbância foi determinada em um comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek[®]. As amostras foram processadas em triplicatas.

O cálculo de redução percentual do DPPH radical foi efetuado da seguinte maneira:

$$\% \text{redução DPPH} = [(Abs_c - Abs_a) / Abs_c] \times 100$$

Onde:

Abs_{controle} = Absorbância controle;

Abs_{amostra} = Absorbância amostra e ou Trolox[®].

O cálculo da concentração efetiva (EC_{50}) (concentração da amostra e do Trolox[®] necessária para reduzir a concentração de DPPH radical em 50%) foi realizado a partir da concentração das amostras e do Trolox[®] e do percentual de capacidade antioxidante.

4.7 Determinação do perfil cromatográfico do extrato bruto e frações de *K. pinnata*

4.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato bruto de *K. pinnata* e suas frações (clorofórmio, acetato de etila, aquosa) foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) com a finalidade de indicar substâncias de interesse (provavelmente flavonoides) através de comparação com padrões. O sistema cromatográfico utilizado nesta pesquisa foi descrito por Wagner e Bladt (1996), direcionado para flavonoides. A fase estacionária empregada foi sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck sobre placa de vidro com espessura 0,2 mm. A fase móvel foi composta por acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água destilada (100:11:11:26). O revelador foi formulado por

difenilboriloxietilamina a 1% em metanol (NP). Os padrões utilizados foram rutina e quercetina solubilizados em etanol. Por último, a visualização das cromatoplasas foi realizada sob luz UV 366 nm.

Como foram feitas três coletas em datas diferentes de *K. pinnata*, houve a preocupação de realizar a cromatografia em camada delgada a fim de comparar o perfil cromatográfico dos extratos e frações coletados em épocas distintas e verificar se ocorreria reprodutibilidade, para assim, realizar a padronização das amostras.

4.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Objetivando isolar substâncias que possam estar relacionadas com a atividade antiúlcera, a fração acetato de etila e a fração aquosa de *K. pinnata* foram analisadas por CLAE analítico. Para tal análise foi utilizado o equipamento Shimadzu® com bombas LC-20^a, loop de 20 µL, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu® C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 µm.

Para análise inicial de ambas as frações foi realizada uma corrida gradiente de 60 min, utilizando a fase móvel (A: água Mili-Q com ácido trifluoracético 0.1%, B: acetonitrila-ACN), com as seguintes concentrações: 0-5 min em 5% em B e de 5-65 min 5 a 100% em B. Verificou-se que os picos majoritários das amostras estavam sendo eluídos em uma concentração de 25% em B. Com o intuito de buscar uma melhor separação desses picos, e como o CLAE semi-preparativo possui apenas uma bomba foi desenvolvida uma corrida isocrática a 25% em B.

Para separação dos picos majoritários de ambas as amostras foi utilizado o sistema CLAE semi-preparativo composto por equipamento Shimadzu®, com bomba LC-6AD, loop de 1000 µL, 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 µm.

4.7.3 Identificação de compostos

Para a identificação, as substâncias isoladas na separação por CLAE semi-preparativo foram solubilizadas em CD₃OD e submetidas à análises de Ressonância

Magnética Nuclear por ^1H , ^{13}C em equipamento Digital NMR – Avance DPX 300 (Bruker®).

4.8 Forma de análise dos resultados

Os resultados dos ensaios farmacológicos foram submetidos a tratamento estatístico, através da análise de variância *One-way* (ANOVA) seguida do teste de Dunnett, sendo o resultado considerado significativo para $p \leq 0.05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Preparo do extrato bruto e das frações

5.1.1 *Kalanchoe pinnata*

O extrato bruto foi preparado por três vezes, conforme as coletas foram realizadas. O processo extrativo utilizado foi a maceração. Os dados estão na tabela abaixo.

Tabela 3. Rendimento do extrato bruto de folhas de *Kalanchoe pinnata* em diferentes épocas de coleta.

Período de coleta	Droga vegetal (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento (%)
Abril (2010)	481.3	53.2	11.05
Fevereiro (2011)	380.1	34.4	9.04
Junho (2011)	248.9	20.4	8.18

O fracionamento foi executado em duas etapas. Na primeira etapa foram utilizados 20g de extrato bruto provenientes da coleta realizada em abril de 2010. Já na segunda etapa foram utilizados 60g de extrato bruto, sendo que 35g do material foi proveniente da coleta realizada em abril de 2010 e 25g do material proveniente da coleta realizada em fevereiro de 2011.

Tabela 4. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 20g de extrato bruto de *Kalanchoe pinnata*.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Clorofórmica	1.1	5.5
Acetato de etila	0.74	3.7
Aquosa	13.6	68
Total	15.4	77.2

Tabela 5. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 60g de extrato bruto de *Kalanchoe pinnata*.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Clorofórmica	3.4	5.6
Acetato de etila	2.4	4.0
Aquosa	41.6	69.3
Total	47.4	78.9

5.2 Atividade antiúlcera

Todos os ensaios foram realizados em datas diferentes, porém, na mesma sala de procedimentos do Biotério da FCF-USP.

Os resultados dos ensaios de atividade antiúlcera aguda com o extrato bruto e as frações acetato de etila e aquosa de *K. pinnata* estão apresentados nas Figuras 10, 11, 12 e 13. Já o ensaio de atividade antiúlcera subaguda está demonstrado na Figura 14. Os resultados estão expressos em média de área relativa de lesão (%) com seus respectivos erro padrão.

5.2.1 Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto de *K. pinnata*

Figura 10. Atividade antiúlcera aguda do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; *p<0.05, ** p<0.01 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.

5.2.2 Atividade antiúlcera aguda comparativa do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata*

Figura 11. Atividade antiúlcera aguda comparativa do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *Kalanchoe pinnata* na dosagem de 200 mg/kg em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; ** p<0.01 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.

5.2.3 Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *K. pinnata*

Figura 12. Atividade antiúlcera aguda da fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; *** p<0.001 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.

5.2.4 Atividade antiúlcera aguda da fração aquosa de *K. pinnata*

Figura 13. Atividade antiúlcera aguda da fração aquosa de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por etanol acidificado; n=7 para cada grupo; * p<0.05; ** p<0.01 em relação ao controle negativo (água). Dose de lansoprazol (controle positivo): 30mg/kg. Os estômagos ilustram cada grupo analisado.

5.2.5 Atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de *K. pinnata*

Figura 14. Atividade antiúlcera subaguda do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* em diferentes doses em modelo de indução por ácido acético 30%; n=6 para o grupo água; n=6 para o grupo cimetidina; n=4 para o grupo 100 mg/kg; n=5 para o grupo 200 mg/kg e n=4 para o grupo 400 mg/kg. Dose de cimetidina (controle positivo): 100 mg/kg.

5.2.6 Análise histológica

Os resultados das análises de quantificação histomorfométrica seguem abaixo. As estruturas quantificadas foram: células polimorfonucleares, células mononucleares, fibroblastos e matriz extracelular (MEC). Os resultados estão expressos como fração de volume celular (%). Neste experimento não foram analisados todos os cortes de estômago para cada grupo, pois alguns se mostraram inadequados para análise. Assim, foram avaliados cinco lâminas de estômago no grupo água, quatro lâminas de estômago no grupo cimetidina e três lâminas nos grupos 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg. As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 ilustram o método de contagem por pontos coincidentes, adaptada de Weibel, 1979.

Figura 15. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo 100 mg/kg, corada pela técnica de hematoxilina-eosina. As setas indicam: ➔ fibroblastos, ➔ célula polimorfonuclear e ➔ MEC. Aumento de 40x.

Figura 16. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo 200 mg/kg, corada pela técnica de hematoxilina-eosina. As setas indicam: ➔ MEC, ➔ célula mononuclear. Aumento de 40x.

Figura 17. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo 400 mg/kg, corada pela técnica de hematoxilina-eosina. As setas indicam: ➔ célula mononuclear e ➔ MEC. Aumento de 40x.

Figura 18. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo cimetidina (100 mg/kg), corada pela técnica de hematoxilina-eosina. As setas indicam: ➡ MEC e ➡ célula polimorfonuclear. Aumento de 40x.

Figura 19. Fotomicrografia de um dos campos de uma lâmina do grupo água, corada pela técnica de hematoxilina-eosina. As setas indicam: ➡ MEC e ➡ célula polimorfonuclear. Aumento de 40x.

Figura 20. Fração de volume (%) ocupada por células polimorfonucleares, células mononucleares, fibroblastos e matriz extracelular na região da serosa de estômago de ratos Wistar, submetidos a indução de úlcera subaguda por ácido acético após 7 dias com diferentes tratamentos (água n= 5, 100 mg/kg n= 3, 200 mg/kg n=3, 400 mg/kg n=3 e cimetidina n= 4).

5.3 Quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada para o extrato bruto, fração aquosa e acetato de etila de *K. pinnata*. Quercetina foi utilizada como padrão externo para a construção da curva de calibração. Foi escolhida por ser uma aglicona presente na maioria dos flavonoides identificados para espécie. Abaixo segue os resultados (Figura 21 e Tabela 6).

Figura 21. Curva de calibração utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos no extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*.

Tabela 6. Quantificação de flavonoides totais de *Kalanchoe pinnata* utilizando $AlCl_3$ como agente complexante. Os resultados de flavonoides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão.

Amostras	Quantidade total (g)	Flavonoides totais (g)	Porcentagem (%)
Extrato bruto	108.00	4.67 ± 0.51	3.69 ± 0.40
Fração acetato de etila	3.14	0.51 ± 0.02	16.42 ± 0.54
Fração aquosa	55.20	1.39 ± 0.10	2.52 ± 0.18

5.4 Quantificação de substâncias fenólicas

A quantificação de substâncias fenólicas foi realizada para o extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata*. O ácido gálico foi escolhido como padrão externo para a construção da curva de calibração (Figura 22 e Tabela 7).

Figura 22. Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas no extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*.

Tabela 7. Quantificação de substâncias fenólicas de *Kalanchoe pinnata* utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do seu erro padrão.

Amostras	Quantidade total (g)	Fenólicos totais (g)	Porcentagem (%)
Extrato bruto	108.00	16.16 ± 0.24	14.96±0.21
Fração acetato de etila	3.14	1.14 ± 0.02	36.33 ± 0.64
Fração aquosa	55.20	6.21 ± 0.05	11.25 ± 0.09

5.5 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH radical para o extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *K. pinnata*. Trolox foi utilizado como substância de referência.

Figura 23. Curva de calibração do Trolox utilizado como padrão externo para a determinação da capacidade antioxidante do extrato bruto e frações de *Kalanchoe pinnata*.

Figura 24. Curva de calibração da porcentagem da redução do DPPH radical referente à concentração do padrão externo Trolox.

Figura 25. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata*.

Figura 26. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*.

Figura 27. Porcentagem de redução do DPPH radical referente à concentração da fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*.

Tabela 8. Concentração efetiva (CE₅₀) do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa de *Kalanchoe pinnata* obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante.

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)
Trolox	33.38
Extrato bruto	72.63
Fração acetato de etila	41.91
Fração aquosa	110.02

5.6 Determinação do perfil cromatográfico

5.6.1 Cromatografia em camada delgada

O perfil cromatográfico obtido a partir da Cromatografia em Camada Delgada está ilustrado na Figura 28:

Figura 28. Cromatoplaça do extrato bruto e frações de folhas de *Kalanchoe pinnata*. 1. Rutina; 2. Quercetina; 3. Extrato bruto; 4. Fração acetato de etila; 5. Fração aquosa; 6. Fração clorofórmica. Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.

O perfil cromatográfico comparativo dos extratos brutos e frações de folhas de *K. pinnata* coletadas em datas diferentes estão ilustrados nas Figuras 29 e 30.

Figura 29. Cromatoplaça comparativa dos extratos brutos de folhas de *Kalanchoe pinnata* coletadas em abril de 2010 (A1) e em fevereiro de 2011 (F1) e das frações realizadas em datas diferentes (D1) e (D2). 1. Extrato bruto (A1); 2. Extrato bruto (F1); 3. Fração clorofórmica (D1); 4. Fração clorofórmica (D2); 5. Fração acetato de etila (D1); 6. Fração acetato de etila (D2); 7. Fração aquosa (D1); 8. Fração aquosa (D2). Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.

Figura 30. Cromatoplaça comparativa dos extratos brutos das folhas de *Kalanchoe pinnata* coletadas em abril de 2010 (1) e em fevereiro de 2011 (2) e junho de 2011 (3). Fase Móvel (FM): Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: H₂O (100:11:11:26). Revelação com NP. Distância percorrida pela FM 15 cm. Visualização sob luz UV 366 nm.

5.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE

Para análise em CLAE foi utilizada a fração acetato de etila e a fração aquosa. Pretende-se realizar esta análise com o extrato bruto.

O cromatograma inicial pertencente à fração acetato de etila está representado na Figura 31. Já, na Figura 32 observa-se uma corrida isocrática visando a melhor separação dos picos de maior intensidade. Estes picos estão numerados na figura para facilitar a sua identificação e seus respectivos espectros UV-Vis estão detalhados na Figura 33. O cromatograma referente à separação no sistema semi-preparativo está na Figura 34.

Figura 31. Cromatograma da fração acetato de etila (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O + TFA a 0.1%, 5-100% em 60 min.

Figura 32. Cromatograma da fração acetato de etila (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (*Photodiode Array*), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Fase móvel ACN 25% em água acidificada com TFA 0,1%. Os picos numerados são os de maior intensidade.

Figura 33. Espectros UV-Vis pertencentes aos picos majoritários, 1 e 2, da fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*. À esquerda está o cromatograma dos picos em diferentes comprimentos de onda. À direita está o espectro UV-Vis (unidades de absorvância x comprimento de onda).

Figura 34. Cromatograma da fração acetato de etila (50mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu LC-6AD, loop de 1000 μ L, 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 μ m. Fase móvel ACN 25% em água acidificada com TFA 0.1%. Os picos numerados foram isolados.

A Figura 35 representa o cromatograma inicial da fração aquosa. A corrida otimizada está ilustrada na Figura 36. O espectro UV-Vis do pico de maior intensidade (número 3) está na Figura 37. O cromatograma referente à separação no sistema semi-preparativo está na Figura 38.

Figura 35. Cromatografia da fração aquosa (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Gradiente de ACN em H₂O + TFA a 0.1%, 5- 100% em 60 min.

Figura 36. Cromatograma da fração aquosa (1mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu com bombas LC-20^a, loop de 20 μ L, detector PDA (Photodiode Array), fluxo de 1 mL/min e coluna Shimadzu[®] C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m. Fase móvel ACN 25% em água acidificada com TFA 0.1%. O pico numerado é o de maior intensidade.

Figura 37. Espectros UV-Vis pertencentes ao pico majoritário (3) da fração aquosa de *K. pinnata*. À esquerda está o cromatograma do pico em diferentes comprimentos de onda. À direita está o espectro UV-Vis (unidades de absorvância x comprimento de onda).

Figura 38. Cromatograma da fração aquosa (50mg/mL) obtida a partir do extrato bruto das folhas de *Kalanchoe pinnata*. Equipamento Shimadzu LC-6AD, loop de 1000 μ L, 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 μ m. Fase móvel ACN 25% em água acidificada com TFA 0.1%. O pico numerado foi isolado.

5.6.3 Identificação de compostos

Foram identificados três compostos, sendo que dois compostos foram isolados da fração acetato de etila (1 e 2) e um da fração aquosa (3). Os dados dos espectros RMN de ^1H (Figura 39, 41 e 42) e do RMN de ^{13}C (Figura 40 e 43) encontram-se na Tabela 9 para o composto 1 isolado da fração acetato de etila e Tabela 10 para o composto 3 isolado da fração aquosa. O composto 2 isolado da fração acetato de etila e o composto 3 isolado da fração aquosa são idênticos.

Fração acetato de etila

Composto 1

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (CD_3OD) seguem abaixo. Os dados de RMN ^{13}C (CD_3OD) estão resumidos na Tabela 9.

Figura 39. Espectro de RMN ^1H em solução de CD_3OD (300 MHz) do composto majoritário, número 1, pertencente à fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*.

Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C em solução de CD_3OD (75 MHz) do composto majoritário, número 1, pertencente à fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*.

Tabela 9- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz) de quercitrina, composto isolado de *Kalanchoe pinnata*.

Posição	Isolado	Quercitrina (HANAMURA et al., 2005)
	RMN ^{13}C CD ₃ OD (75 MHz)	RMN ^{13}C CD ₃ OD
1	-	-
2	159.37	159.3
3	136.32	136.2
4	179.68	179.6
5	163.18	163.2
6	99.95	99.8
7	165.82	165.9
8	94.88	94.7
9	158.52	158.5
10	106.01	105.9
1'	123.05	123.0
2'	116.51	116.4
3'	146.41	146.4
4'	149.79	149.8
5'	117.13	116.9
6'	123.10	122.9
1''	103.58	103.5
2''	72.24	72.1
3''	72.10	72.0
4''	73.39	73.2
5''	71.99	71.9
6''	17.77	17.7

Composto 2

Como esta molécula também foi isolada e identificada na fração aquosa, somente a análise do espectro de RMN ^1H foi realizado.

Figura 41. Espectro de RMN ^1H em solução de CD₃OD (300 MHz) do composto majoritário, número 2, pertencente à fração acetato de etila de *Kalanchoe pinnata*.

Fração aquosa

Composto 3

Como já foi dito anteriormente, esta molécula também foi identificada na fração acetato de etila. Os sinais dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e a tabela com dados resumidos estão abaixo.

Figura 42. Espectro de RMN ^1H em solução de CD_3OD (300 MHz) do composto majoritário, número 3, pertencente à fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*.

Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C em solução de CD_3OD (75 MHz) do composto majoritário, número 3, pertencente à fração aquosa de *Kalanchoe pinnata*.

Tabela 10- Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C (300 e 75 MHz) de quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo, composto isolado de *Kalanchoe pinnata*.

Posição	Isolado		MUZITANO <i>et al.</i> , 2006c		
	RMN ^1H (CD_3OD)	RMN ^{13}C (CD_3OD)	RMN ^1H (CD_3OD)	RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$)	RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$)
	δ mult., J (Hz)	δ	δ mult., J (Hz)	δ mult., J (Hz)	δ
Aglicona					
2	-	158.55	-	-	157
3	-	136.88	-	-	134.9
4	-	179.85	-	-	178.3
5	-	159.21	-	-	157.5
6	6.21 <i>d</i> J=2.1	99.88	6.19 <i>d</i> J=2	6.16 <i>s</i>	99.3
7	-	165.86	-	-	165
8	6.37 <i>d</i> J=2.1	94.81	6.37 <i>d</i> J=2	6.37 <i>s</i>	94.2
9	-	163.25	-	-	161.8
10	-	105.91	-	-	104.4
1'	-	122.99	-	-	121.2
2'	7.37 <i>d</i> J=1.8	116.91	7.36 <i>d</i> J=2.07	7.33 <i>s</i>	116.2
3'	-	146.52	-	-	145.8
4'	-	149.86	-	-	149.2
5'	6.93 <i>d</i> J=8.4	116.55	6.93 <i>d</i> J=8.32	6.88 <i>d</i> J=8.35	116
6'	7.30 <i>dd</i> J=8.4, 2.1	122.77	7.29 <i>dd</i> J=2.07, 8.32	7.26 <i>d</i> J=8.35	121
Ramnosil					
1''	5.38 <i>d</i> J=0.9	103.28	5.37 <i>d</i> J=0.93	5.3 <i>s</i>	102.4
2''	4.19 <i>m</i>	82.72	4.19 <i>m</i>	4.02 <i>m</i>	81.1
3''	3.9 <i>m</i>	71.82	3.89 <i>dd</i> J=3.7, 9.7	a	70.8
4''	3.35 <i>dd</i> J=9.3, 9.3	74.37	3.35 <i>dd</i> J=9.7, 9.7	a	73
5''	3.8 <i>m</i>	72.06	3.87 <i>dq</i> J=9.7, 6.2	a	70.9
6''	1.02 <i>d</i> J=6.3	17.76	1.1 <i>d</i> J=6.2	0.9 <i>d</i> J=6.1	17.8
Arabinosil					
1'''	4.21 <i>d</i> J=7.2	107.833	4.2 <i>d</i> J=7.1	4.09 <i>d</i> J=6.37	106.9
2'''	3.56 <i>dd</i> J=9.3, 7.2	72.86	3.54 <i>dd</i> J=7.1, 9.28	a	71.6
3'''	3.47 <i>dd</i> J=9.3, 3	73.84	3.47 <i>dd</i> J=3.25, 9.28	a	72.3
4'''	3.74 <i>m</i>	69.90	3.72 <i>m</i>	a	68.3
5'''	3.66 <i>dd</i> J=12.9, 2.0	67.47	3.65 <i>dd</i> J=12.45, 2.27	a	66.3
	3.39 <i>d</i> J=11.4		3.37 <i>d</i> J=12.45		

a Sinais que não aparecem na literatura.

DISCUSSÃO

6. Discussão

A utilização de plantas no tratamento e cura de muitas doenças é tão antiga quanto a espécie humana (MACIEL et al., 2002). O conhecimento do povo indígena sobre a ação terapêutica dessas plantas revelada por estudos etnobotânicos não é somente útil para a preservação da cultura tradicional e da biodiversidade, mas também para a descoberta de novos fármacos (BEKALO; WOODMATAS; WOLDEMARIAM, 2009). Isso porque as plantas medicinais podem produzir fármacos importantes, os quais dificilmente seriam adquiridos via síntese química. Também há a possibilidade de produzir compostos que podem ser ligeiramente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Além disso, os produtos naturais podem ser utilizados como modelos para a obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes as dos compostos de referências (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

De acordo com a revisão de literatura vários trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar a influência de extrato e frações de *K. pinnata* em diversas atividades farmacológicas e *in vitro*. Ademais, estudos fitoquímicos revelam que os flavonoides, classe de metabólitos secundários presente nesta espécie, estão envolvidos na maioria das atividades estudadas. Em relação à ação antiúlcera, foco deste trabalho, já existem estudos publicados, entretanto, se encontram incompletos (ADESANWO et al., 2007; PAL; CHAUDHURI, 1991 PEREZ; CORREA; BORGES, 1999). Dessa maneira, houve o interesse de realizar um trabalho mais abrangente, ou seja, além de verificar se o extrato bruto e frações apresentam atividade antiúlcera e uma possível sugestão do mecanismo de ação, o isolamento e identificação dos compostos majoritários, que possam estar envolvidos com tal atividade também foram realizados.

No modelo de úlcera aguda gástrica, induzida por etanol, as lesões são facilmente produzidas por administração intragástrica de 0.5 a 2.0 mL de etanol em uma concentração de 50 a 100%. A maioria das lesões se forma dentro de 1-3 minutos após o contato do indutor com a mucosa gástrica (GLAVIN; SZABO, 1992).

A administração aguda de etanol em conjunto com o ácido gera uma resposta inflamatória e destrói a camada protetora da mucosa gástrica, causando necrose celular. A necrose celular é o resultado de uma cadeia de eventos que envolvem a liberação de radicais livres, enzimas e mediadores vasoativos, conduzindo a uma

vasoconstrição, edema e hemorragia, havendo um comprometimento no fluxo sanguíneo da mucosa (CASTRO et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Além disso, ocorre a diminuição da liberação do óxido nítrico, o qual auxilia na redução das lesões gástricas hemorrágicas devido à sua ação vasodilatadora (REPETTO; LLESUY, 2002; KAWANO; TSUJI, 2000).

Vários fatores são responsáveis pela indução de úlceras gástricas por esse modelo. Alguns deles são: aumento da geração de radicais livres, aumento do refluxo na difusão de ácido, aumento da liberação de serotonina e histamina, aumento do efluxo de sódio e potássio, aumento do influxo de cálcio, aumento da produção de leucotrienos, aumento da isquemia, aumento da permeabilidade vascular gástrica e diminuição da produção de muco, diminuição motilidade gástrica, diminuição da diferença de potencial transmucosa, diminuição da produção endógena de GSH (glutathiona), diminuição da produção de prostaglandinas e diminuição fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (GLAVIN; SZABO, 1992).

Um estudo realizado por Gazzieri et al. (2007), com a finalidade de elucidar o mecanismo pelo qual o etanol causa úlcera gástrica, sugeriram que há o envolvimento de canais receptores de potencial transiente vanilóides do tipo 1 (TRPV-1) que, ao serem ativados por etanol, provocam a liberação de substância P, que estimula receptores de neurocinina-1 a gerar espécies reativas de oxigênio. Em contrapartida Li et al., 2012 propõem que a ativação de TRPV-1 e a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) estão relacionados com a gastroproteção da mucosa gástrica após a indução de lesão gástrica por etanol. Isso porque, este neuropeptídeo é um potente vasodilatador, facilitando a restituição da mucosa. Estes eventos foram observados com a administração de capsiato aos animais. No mesmo estudo, os autores verificaram que a administração de etanol não provocou mudança significativa no nível de CGRP, indicando que este neuropeptídeo não está envolvido na formação de lesão gástrica.

No ensaio de indução de úlceras gástricas por etanol acidificado, utilizando o extrato bruto de *K. pinnata* observou-se uma tendência à relação dose-resposta. As doses de 200 mg/kg e de 400 mg/kg demonstraram capacidade de reduzir úlceras em 74% ($p < 0.05$) e 98% ($p < 0.01$), respectivamente. Ainda utilizando o mesmo modelo de indução por etanol acidificado, foi realizada uma análise comparativa entre o extrato bruto e as frações de *K. pinnata*, na dose de 200 mg/kg, para verificar qual amostra-teste era mais efetiva contra a formação de lesões gástricas. A fração

acetato de etila mostrou ser a mais eficaz ($p < 0.01$). As frações também foram ensaiadas, utilizando o mesmo modelo experimental citado acima, em três doses diferentes.

No experimento utilizando a fração acetato de etila, verificou-se uma significativa redução nas lesões gástricas ($p < 0.001$), em 77%, 95% e 96%, nas doses 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle negativo. Sendo assim, esta fração mostrou um potencial relevante na redução de úlceras gástricas. Entretanto, houve falta de resposta dose-resposta a partir da dose de 200 mg/kg, indicando que talvez esta relação encontre-se abaixo de 200 mg/kg. Já, quando foi analisada a fração aquosa observou-se uma tendência à relação dose-resposta. A dose de 200 mg/kg ($p < 0.05$) reduziu as lesões gástricas (69%) em relação ao grupo de animais que receberam água, mas na dose de 400 mg/kg ($p < 0.01$) obteve-se gastroproteção mais satisfatória (91%).

No ensaio subagudo as úlceras gástricas foram induzidas por ácido acético. As úlceras induzidas aparecem com tamanho e severidade constante com uma incidência de 100%. Assemelham-se com a úlcera humana em termos patológicos e mecanismo de cicatrização e, por último, respondem a vários fármacos antiúlcera, tais como: inibidores da bomba de prótons, sulcrafato e diversos fatores de crescimento. Okabe e Amagase (2005) sugerem que o mecanismo pelo qual a úlcera induzida por ácido acético se desenvolve é por necrose isquêmica na mucosa gástrica. De acordo com um artigo de revisão, a úlcera péptica ocorre por uma falta de suprimento de oxigênio e nutrientes e formação de radicais livres, causados por injúria vascular. A mucosa necrosada e a liberação de leucotrieno B₄ atraem os leucócitos, os quais irão fagocitar o tecido necrótico e liberar citocinas pro-inflamatórias, como, por exemplo: TGF- α (fator de crescimento transformante alfa) TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), IL-1 α (interleucina-1alfa) e IL-1 β (interleucina-1beta) ativando os fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, com a finalidade de restabelecer a integridade física e cicatrizar a mucosa gástrica (TARNAWSKI, 2005; 2010).

No ensaio de úlcera subaguda não houve diferença significativa na redução da área de lesão gástrica nas doses testadas do extrato bruto (100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg) comparando com o controle negativo, após 7 dias de tratamento; no entanto, houve uma tendência à diminuição das úlceras gástricas com o aumento da dose. Pal e Chaudhuri (1991) verificaram a facilitação do

processo de cicatrização a partir da administração da dose de 100 mg/kg da fração metanólica de *K. pinnata*, sendo este resultado diferente do obtido neste estudo. Isto pode ter ocorrido devido a diferenças no processo extrativo, cultivo, etc.

A cicatrização de úlcera é um processo complexo que envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e deposição de matriz extracelular, resultando na cicatrização da lesão. Estes eventos são regulados por citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição (TARNAWSKI, 2005; TARNAWSKI, 2010). O aumento da expressão de COX-2, prostaglandina e VEGF também foram relacionados como fatores importantes na cicatrização de úlcera gástrica induzida por ácido acético (KONTUREK et al., 2008). Para verificar uma possível interferência do extrato bruto de *K. pinnata* na cicatrização foram quantificadas as seguintes células: polimorfonucleares, mononucleares, fibroblastos e matriz extracelular pela estimativa de volume celular, por pontos coincidentes, adaptada de Weibel (1979).

Os neutrófilos são as células polimorfonucleares mais abundantes e os primeiros fagócitos a chegar ao local da injúria (PORTH; MATFIN, 2010). O recrutamento e ativação destas células ocasionam a liberação de enzimas lisossômicas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KUMAR et al., 2008). Consequentemente, com uma produção excessiva de espécies reativas haverá a indução do estresse oxidativo na mucosa gástrica causando danos nos componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA, gerando lesão (NAITO; YOSHIKAWA 2002; ROCHA et al., 2011). Nas análises microscópicas observaram-se que nos grupos 200 mg/kg e 400 mg/kg houve uma diminuição da fração de volume (%) ocupada por células polimorfonucleares no local da lesão ulcerativa, quando comparados com os outros grupos, após 7 dias de tratamento. Este fato pode estar relacionado com a facilitação da cicatrização de úlceras gástricas. Kobayashi et al. (2001) relataram que a inibição de neutrófilos está envolvida na ação cicatrizante de úlceras gástricas induzidas por ácido acético, após a administração oral de teprenona, um poli-isoprenóide acíclico. Em outro trabalho, a diminuição da infiltração de neutrófilos também foi verificada após a administração de alfa-bisabolol em úlceras induzidas por etanol, indicando que esse composto possui a capacidade de reduzir as injúrias gástricas provocadas pelo agente lesivo (ROCHA et al., 2011). Em ambos os trabalhos a infiltração de neutrófilos no tecido lesado foi verificada através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O aumento da infiltração de células polimorfonucleares observado no grupo cimetidina

pode ser justificado pelo fato deste antagonista do receptor de H_2 suprimir a inibição da biossíntese de leucotrieno, realizada pela histamina, podendo contribuir no aumento do recrutamento de células polimorfonucleares humanos ativadas para a área lesada (FLAMAND et al., 2004). Em outro estudo, o mesmo fármaco induziu o aumento da infiltração de neutrófilos em modelo inflamatório induzido por carragenina em ratos (HIRASAWA; WATANABE; TSURUFUJI; OHUCHI, 1991).

Para as demais células quantificadas não foi observada uma influência pronunciada do extrato testado em relação aos controles.

Os perfis cromatográficos em camada delgada do extrato bruto e das frações acetato de etila e aquosa permitiram a visualização de grande concentração de flavonoides, sugerindo que esta classe de compostos está associada à atividade gastroprotetora e cicatrizante observada no ensaio de úlcera aguda e subaguda. Rutina, padrão utilizado, teve um R_f semelhante a uma banda de coloração intensa comum a todas as amostras ensaiadas. El Abdellaoui et al. (2010) isolaram da fração do extrato metanólico das folhas de *K. pinnata* o flavonoide rutina. No entanto, mais estudos fitoquímicos precisam ser realizados para confirmar a presença deste flavonoide no extrato bruto e nas frações acetato de etila e aquosa de *K. pinnata*.

O perfil químico do extrato bruto das folhas de *K. pinnata*, proveniente de coletas em épocas diferentes, e das frações obtidas em datas distintas, foram semelhantes. Isto foi constatado após análise do perfil cromatográfico das amostras em cromatografia em camada delgada. Não foi realizada a análise quantitativa comparativa dos constituintes químicos. Em 2011, Cruz, Chedier e Pimenta testaram o comportamento das substâncias presentes no extrato aquoso de mudas de *K. pinnata* em relação à intensidade luminosa. Os autores observaram que não houve diferença proporcional significativa para nenhum dos grupos de flavonoides encontrados em *K. pinnata*, metabólito secundário mais frequente no gênero *Kalanchoe*. No entanto, em trabalho posterior realizado por Muzitano et al. (2011), os autores relataram que o teor de flavonoides, responsáveis pela atividade leishmanicida, contidos no extrato aquoso de folhas de *K. pinnata* é mais elevado em estações na qual é maior a incidência solar (primavera e verão).

As frações acetato de etila e aquosa foram analisadas por CLAE. No cromatograma utilizando a fração acetato de etila observa-se a presença de dois picos majoritários. Já o experimento realizado com a fração aquosa revelou a

presença de um pico de maior intensidade. Os picos majoritários encontrados para ambas as frações foram isolados e a elucidação foi baseada em dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Todos os compostos identificados pertencem ao grupo dos flavonoides.

A proposta estrutural do composto 1 isolado da fração acetato de etila (81.9 mg) foi de um flavonoide glicosilado, quercitrina (Figura 44). Apresenta-se em forma de pó amorfo de cor amarela. A análise do espectro de RMN- ^1H em CD_3OD (300 MHz) apresentou vários deslocamentos químicos, como cinco dubletos (um sinal em 7.35 ppm com constante de acoplamento (J) de 1.7 Hz característico do H-2'; um sinal em 6.92 ppm com J de 8.3 Hz que corresponde ao H-5'; um sinal 6.35 ppm com J de 1.7 Hz que se refere ao H-8; um sinal em 6.19 ppm com J de 1.5 Hz que refere ao H-6 e por último um sinal em 0.95 com J de 6.4 Hz que pertence ao H-6''). Um singlete em 5.36 ppm correspondente ao H-1'', um singlete largo em 4.25 ppm de H-2'' e três duplo-dubletos (um com sinal em 7.30 ppm com J de 8.3 e 1.8 Hz característico do H-6'; outro com sinal em 3.78 ppm com J de 9 e 3.2 Hz característico ao H-3'' e finalmente um sinal em 3.43 ppm com J de 9.61 e 6 Hz que se refere ao H-5'').

O espectro de RMN- ^{13}C em CD_3OD (75 MHz) apresentou 21 carbonos, sendo que 15 carbonos pertencem ao flavonoide e 6 carbonos pertencem ao açúcar, que está ligado ao flavonoide. O açúcar é uma ramnose porque apresenta um carbono com deslocamento químico em 17.77 ppm, relativo a metila da ramnose do carbono 6 do açúcar. Também se verificam 4 sinais de carbonos (73.39 ppm, 72.24 ppm, 72.1 ppm e 71.99 ppm) na região típica para açúcar. A comparação dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C com os reportados por Hanamura et al. (2005), confirma que a amostra é quercitrina.

Figura 44. Estrutura proposta do composto isolado de *Kalanchoe pinnata*, quercitrina.

A quercitrina é um composto de baixo perfil de toxicidade (MUZITANO et al., 2006b). Em um trabalho de revisão Mota et al. (2009) citaram dois trabalhos, no qual os autores verificaram atividade gastroprotetora da quercitrina em camundongos, no modelo de indução de lesões gástricas com reserpina/intubação gástrica. O tratamento com este flavonoide contribuiu para a reversão do quadro de colite em ratos e um dos mecanismos envolvidos foi a diminuição do infiltrado de células polimorfonucleares no local da lesão (CAMUESCO et al., 2004). Quercitrina também foi responsável pela prevenção da peroxidação lipídica *in vitro* em homogenato de cérebro de ratos na presença de diferentes indutores (WAGNER et al., 2006). Em um estudo sob autoria de Choi et al. (2012), a quercitrina foi isolada de *Cratoxylum formosum* e foi observada atividade antioxidante, *in vitro*, pelo método de ORAC e também capacidade de reduzir o estresse oxidativo em células HepG2. A atividade antiradicalar deste flavonoide, isolado dos frutos de *Capsicum annuum* L., também foi verificada pelo método de DPPH (MATERSKA; PERUCKA, 2005). Os dados obtidos são importantes, pois devido ao potencial antioxidante da quercitrina há a possibilidade de sua participação na ação antiúlcera.

O composto 2 (43.6 mg) foi identificado como um flavonoide glicosilado, mais detalhadamente uma quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo (Figura 45). Esta molécula também foi isolada e identificada na fração aquosa e devido a isso somente a análise do espectro de RMN ^1H foi realizado.

Na análise espectral do isolado número 3 da fração aquosa verificou-se que o espectro de RMN ^1H (CD_3OD) apresenta sinais na região de aromáticos, característicos do flavonoide quercetina. O deslocamento químico em 7.37 ppm é um sinal dubleto do hidrogênio do carbono 2' do anel B do flavonoide. Este dubleto tem uma constante de acoplamento de 1.8 Hz e está acoplado com outro hidrogênio em posição meta, o hidrogênio na posição 6' do anel B. Este sinal é um duplo dubleto e verifica-se o acoplamento de um hidrogênio na posição orto 5' e outro na posição meta 2'. O hidrogênio na posição orto 5' do anel B possui um deslocamento químico em 6.93 ppm com constante de acoplamento 8.4 Hz, sugerindo o acoplamento com outro hidrogênio na posição orto 6'. Os sinais em 6.21 ppm e 6.37 ppm, ambos dubletos, correspondem aos hidrogênios na posição 6 e 8, respectivamente, no anel A e estão acoplados em posição meta. Também se verifica um dubleto em 5.38 ppm com constante de acoplamento de 0.9 Hz, um outro

dubleto em 4.21 ppm com constante de acoplamento de 7.2 Hz e sinais na região típica para açúcares. Dessa maneira, sugere-se que o flavonoide apresenta em sua estrutura ligação com duas unidades de açúcar. O sinal em campo alto de 1.02 ppm é um dubleto com constante de acoplamento de 6.3 Hz. É um sinal característico dos hidrogênios do grupo metil da ramnose. Estas unidades podem estar ligadas ao flavonoide em diferentes posições ou em apenas uma posição, na forma de dímero.

Ao analisar a ramnose, identificam-se os sinais correspondentes 4.19 ppm, 3.9 ppm, 3.8 ppm, 3.35 ppm e 1.02 ppm. Há outros sinais de açúcares também presentes no espectro: 3.74 ppm, 3.66 ppm, 3.56 ppm, 3.47 ppm e 3.39 ppm. Observa-se com o auxílio das constantes de acoplamento que os hidrogênios em 3.56 ppm e 3.47 ppm estão acoplados, sugerindo que são vizinhos.

O espectro de RMN¹³C (CD₃OD) apresenta 26 sinais, no qual se observam claramente os sinais da quercetina (15 carbonos) e de duas unidades de açúcares, ramnose (6 carbonos) e arabinose (5 carbonos). Os sinais da quercetina são: 179.85 ppm referente à carbonila do C-4, 165.86 ppm referente a C-7, 163.25 ppm referente a C-9, 159.28 ppm referente a C-5, 158.55 ppm referente a C-2, 149.86 ppm referente a C-4' do anel B, 146.52 ppm referente a C-3' do anel B, 136.88 ppm referente a C-3, 122.99 ppm referente a C-1' do anel B, 122.77 ppm referente a C-6' do anel B, 116.91 ppm referente a C-2' do anel B, 116.55 ppm referente a C-5' do anel B, 105.91 ppm referente a C-10, 99.88 ppm referente à C-6 e 94.81 ppm referente à C-8. Para a elucidação desta molécula os sinais dos espectros de RMN ¹H e RMN¹³C foram comparados com os presentes na literatura (MUZITANO et al., 2006c).

Figura 45. Estrutura proposta do composto isolado de *Kalanchoe pinnata*, quercetina 3-O-α-L-arabinopiranosil (1→2) α-L-ramnopiranosídeo.

Quercetina 3-O-α-L-arabinopiranosil (1→2) α-L-ramnopiranosídeo, flavonoide isolado, foi encontrado tanto na fração acetato de etila quanto na fração aquosa. O método de extração desta molécula a partir desta espécie vegetal foi patenteado por

Ichikawa et al. (1986). É de restrita ocorrência, não reportado em outras espécies vegetais, exceto para *Alphitonia philippinensis* (Rhamnaceae) e *Rollinia emarginata* (Annonaceae) (JOU et al., 2004; ROTH et al., 2011). Propõe-se, portanto, que este coposto possa ser considerado um marcador químico para espécie *K. pinnata* (Muzitano et al., 2006c).

Existem poucos relatos sobre o estudo deste flavonoide, nenhum relacionado com o envolvimento na ação antiúlcera ou até mesmo em atividade anti-inflamatória. Roth et al. (2011) com intuito de estudar a influência de compostos isolados de *Rollinia emarginata*, sobre transportadores polipeptídeos de ânion orgânico (OATPs) 1B1 e 1B3 verificaram que o composto quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ranopiranosídeo modulou o funcionamento destes. OATPs são sistemas transportadores de substâncias endógenas (sais biliares, hormônios, etc), de alguns fármacos (estatinas, antibióticos, digoxina, entre outros). Estes transportadores estão envolvidos na captação destas substâncias pelos hepatócitos. A coadministração de fármacos e extrato vegetal ou até mesmo substâncias isoladas de extratos vegetais podem ser uma alternativa para melhorar a farmacocinética de fármacos utilizados na terapêutica (FUCHIKAMI et al., 2006; HAGENBUCH; GUI, 2008).

No ensaio de quantificação de flavonoides e de compostos fenólicos foi observado que a fração acetato de etila possui maior concentração de substâncias fenólicas, incluindo flavonoides, seguida do extrato bruto e por último pela fração aquosa. Considera-se que a maioria desses compostos são antioxidantes e que esta atividade é muito importante para a proteção da mucosa gástrica contra o estresse oxidativo e na facilitação da cicatrização da mucosa gástrica (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997; KARAKOYUN, et al., 2009). Assim, foi realizada uma investigação de uma possível capacidade antioxidante, pelo método de radical DPPH do extrato bruto e frações acetato de etila e aquosa de *K. pinnata* para uma sugestão no mecanismo de ação.

No experimento de determinação da capacidade antioxidante observou-se que a fração acetato de etila (CE_{50} = 41.91 μ g/mL) apresentou uma melhor capacidade de reduzir o DPPH radical, seguida do extrato bruto (CE_{50} =72.63 μ g/mL) e fração aquosa (CE_{50} = 110.02 μ g/mL). Trolox, substância de referência utilizada, apresentou uma CE_{50} de 33.38 μ g/mL. Estes resultados estão em consonância com a gastroproteção observada nos experimentos de úlcera aguda, evidenciando que a

quercitrina e a quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo, além de outros compostos flavonoídicos presentes em *K. pinnata*, podem ser parcialmente responsáveis pelo processo de gastroproteção, provavelmente por uma ação antioxidante. No ensaio de úlcera subaguda também foi verificada uma facilitação na cicatrização de lesões gástricas a partir da dose de 200 mg/kg de extrato bruto, sugerindo que esta classe de substâncias presentes no extrato auxilia o processo de cicatrização através da limitação de leucócitos polimorfonucleares na área da lesão, diminuindo a produção de espécies reativas. Reppeto e Llesuy (2002) em seu trabalho de revisão relataram que vários benefícios à saúde que os flavonoides proporcionam estão relacionados com sua atividade antioxidante. Estudos demonstraram que estes compostos sequestram ânion superóxido, radicais hidroxilas e peroxilas, além disso, inibem a peroxidação lipídica em diferentes sistemas e aumentam a secreção de prostaglandina e muco na mucosa gástrica. Karakoyun et al. (2009) atribuíram a facilitação da cicatrização de úlceras induzidas por ácido acético à diminuição da infiltração de neutrófilos por uma substância antioxidante (ácido alfa lipóico-ALA).

Este trabalho confirma o potencial terapêutico de *K. pinnata*, espécie muito utilizada pela população. No entanto, mais investigações são necessárias para confirmar o mecanismo de ação dos flavonoides presentes nesta espécie, além da possível participação de outros compostos nos processos de gastroproteção e cicatrização de lesões gástricas observados no presente estudo.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Com a realização deste trabalho concluí-se:

- O extrato bruto e frações acetato de etila e aquosa de *K. pinnata* exercem uma ação protetora na mucosa gástrica, verificado no processo de indução por etanol acidificado. No ensaio com a fração acetato de etila observou-se gastroproteção com uma dose a partir de 100 mg/kg, enquanto que tal ação para o extrato bruto e fração aquosa foi a partir da dose de 200 mg/kg;
- O processo de cicatrização de úlceras subagudas, induzidas por ácido acético, foi facilitado pela administração do extrato bruto de *K. pinnata* (doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg), verificado pela redução da fração de volume ocupada por células polimorfonucleares no local da lesão;
- Verificou-se nas análises de quantificação de flavonoides e compostos fenólicos que a fração acetato de etila possui maior concentração desses compostos, seguido do extrato bruto e fração aquosa. Estes dados estão em consonância com o perfil cromatográfico do extrato e frações evidenciado por CCD;
- O extrato bruto, fração aquosa e principalmente a fração acetato de etila das folhas de *K. pinnata* possuem capacidade antioxidante, confirmada por ensaio *in vitro* por meio do sequestro do radical DPPH.
- A partir das análises fitoquímicas por CLAE das frações acetato de etila e aquosa foram isolados compostos majoritários e identificados como compostos pertencentes à classe dos flavonóides, mais precisamente quercitrina e quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) α -L-ramnopiranosídeo, sugerindo que possam estar envolvidos no mecanismo de gastroproteção e cicatrização de úlceras gástricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- ADESANWO, J.K.; RAJI,Y.; OLALEYE, S.B.; ONASANWO, S.A. Antiulcer activity of methanolic extract of *Bryophyllum pinnatum* in rats. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 409-412, 2007.
- AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M. AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K. R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F.; Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v.83, p.853-858, 2012.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n.4, 2007.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 827-874.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. **Fitoterapia**, v.71, p.193-194, 2000.
- ALMEIDA, A.P.; SILVA, S.A.G.; SOUZA, M.L.M.; LIMA, L.M.T.R.; ROSSI-BERGMANN, B.; GONÇALVES DE MORAES, V.L.; COSTA, S.S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent Lymphocyte suppressive activity. **Planta Medica**, v.66, p.134-137, 2000.
- BABU, T.H.; MANJULATHA, K.; KUMAR, G.S.; HYMAVATHI, A.; TIWARI, A.K.; PUROHIT, M. RAO, J.M.; BABU, K.S. Gastroprotective flavonoid constituents from *Oroxylum indicum* Vent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.117–120, 2010.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, 2005.
- BEKALO, T.H; WOODMATAS, S. D.; WOLDEMARIAM, Z. A. An ethnobotanical study of medicinal plants used by local people in the lowlands of Konta Special Woreda, southern nations, nationalities and peoples regional state, Ethiopia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p.26, 2009.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILHO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 45, n. 12, 1997.
- BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; KARMAKAR, U. K.; SHILL, M. C. Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* Linn. (Family: Crassulaceae) leaves and stems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n.10, p. 2605-2609, 2011.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas medicinais de interesse ao SUS**. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1. Acesso em: 10 maio 2010.

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

BUCCIARELLI, A.; MANCINI, M.M.; SKLIAR, M. Propiedades gastroprotectoras de plantas medicinales: estudios fitoquímicos y farmacológicos. **Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca**, v.17, n.1, p.3-9, 2007.

CALAM, J.; BARON, J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **British Medical Journal**, v.323, p.980-983, 2001.

CAMUESCO, S.; COMALADA, M.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E.; NIETO, A.; LORENTE, M. D.; CONCHA, A.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrina is associated with an inhibition in iNOS expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, p. 908-918, 2004.

CASTRO, G.A; CARVALHO, J.E.; TINTO, S.V.; POSSENTI, A. SGARBIERI, V.C. Anti-Ulcerogenic Effect of a Whey Protein Isolate and Collagen Hydrolysates Against Ethanol Ulcerative Lesions on Oral Administration to Rats. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.1, p. 83–90, 2010.

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

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

COSTA, S.S; MUZITANO, M. F.; CAMARGO, L. M.; COUTINHO, A. S. M. Therapeutic Potential of *Kalanchoe* Species: Flavonoides and other Secondary Metabolites. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 12, p. 2151-2164, 2008.

CRUZ, B.P.; CHEDIER, L. M.; PIMENTA, D. S. Luminosidade em *Kalanchoe brasiliensis* CAMB. e *Kalanchoe pinnata* (LAMK.) PERS. **X Congresso de Ecologia do Brasil**, 2011.

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

CRUZ, E.A.; SILVA, S.A.G.; MUZITANO, M.F.; SILVA, P.M.R.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMAN, B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **International Immunopharmacology**, v.8, p.1616–1621, 2008.

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SINHORINI, I. L.; WU, T.S.; RIZZI, M. B. S. L.; PENTEADO, V. C.; MORENO, F. S. Beta-carotene reduces the ductular (oval) cell reaction in the liver of wistar rats submitted to the resistant hepatocyte model of carcinogenesis. **Pathology**, v. 30, p. 259-266, 1998.

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

EL ABDELLAOUI, S.; DESTANDAU, E.; TORIBIO, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; CANCELLIERI, P.; LANDEMARRE, L. Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p.1329–1338, 2010.

ERLUND, I.; KOSONEM, T.; MAENPAA; PERTTUNEN, K.; KENRAALI, J.; PARANTAINEN, J.; ARO, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, p.545-553, 2000.

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

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA. **Úlceras pépticas**. Disponível em: <http://www.fbg.org.br/Textos.asp?Codigo=194>. Acesso em: 10 maio 2012.

FLAMAND, N.; PLANT, H.; PICARD, S.; LAVIOLETTE, M.; BORGEAT, P. Histamine-induced inhibition of leukotriene biosynthesis in human neutrophils: involvement of the H₂ receptor and Camp. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 552-561, 2004.

FUCHIKAMI, H.; SATOH, H.; TSUJIMOTO, M.; OHDO, S.; OHTANI, H.; SAWADA, Y. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 34, n. 4, p. 577-582, 2006.

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

GAIND; K.N.; GUPTA, R.L. Phenolic componentes from the leaves of from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 23, p.149-153, 1973;

GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTREL, G.S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI, S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERARD, N.P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER, A.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.581-589, 2007.

GEETHA, T.; MALHOTRA, V.; CHOPRA, K.; KAUR, I.P. Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of quercetina. **Indian Journal of Experimental Biology**. Jan; 43 (1): 61-7, 2005. [Abstract].

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

GOMES, D.C.O.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.137, p.613–618, 2010.

GONZÁLEZ, R. BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELA, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.331-362, 2011.

GOODMAN; GILMAN. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p. 869-882, 2007.

GOSSELL-WILLIAMS, M; SIMON, OR; WEST, ME. The past and present use of plants for medicines. **West Indian Medical Journal**. Mona, v. 55, n. 4, Sept. 2006.

GREER, M. R. J.; CATES, R. G.; JOHNSON, F. B.; LAMNAOUER, D.; OHAI, L. Activity of acetone and methanol extracts from thirty-one medicinal plant species against herpes simplex virus types 1 and 2. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n.9, p.1031-1037, 2010.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 715-722, 1997.

HAGENBUCH, B.; GUI, C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. **Xenobiotica**, v. 38, p. 778-801, 2008.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H.. Structural and funcional characterization of polyphenols isolated from Acerola (*Malpighi emarginata* DC.) fruit. **Bioscience Biotechnology Biochemistry** v.69, n.2, p.280-286, 2005.

HARLALKA, G. V.; PATIL, C. R.; PATIL, M. R. Protective effect of *Kalanchoe pinnata* Pers. (Crassulaceae) on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n.4, p. 201-205, 2007.

HATANAKA, E. CURI, RUI. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira Farmacia**, v. 88 n.2, p. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão 53-58, 2007.

HIRASAWA, N.; WATANABE, M; MEU, S.; TSURUFUJI, S.; OHUCHI, K. Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous histamine without affecting vascular permeability responses in air-pouch-type carragenin inflammation in rats. **Inflammation**, v. 15, n. 2, p.117-126, 1991.

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

JAIN, K. S.; SHAH, A. K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S. M.; KALE, P. A.; JAGTAP, J. R.; BHOSALE, A. V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181-1205, 2007.

JOSEPH, B. SRIDHAR, S.; SANKARGANESH, JUSTINRAJ, EDWIN, B. T. Rare medicinal plant- *Kalanchoe pinnata*. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 322-327, 2011.

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

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 283-316, 2008.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A. K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz: phytochemical and pharmacological profile: A review. **Pharmacognosy Review**, v.3, n. 6, p. 364-375, 2009.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. Microscopical and preliminary phytochemical studies on aerial part (leaves and stem) of *Bryophyllum pinnatum* kurz. **Pharmacognosy Journal**, v.2, n.9, p. 254-259, 2010.

KARAKOYUN, B.; YUKSEL, M.; ERCAN, F.; ERZIK, C.; YEGEN, B. C. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. **Infammation**, v. 32, n.1, 2009.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica e Clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 867-881, 2006.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of mucosal blood flow: A conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.15. supl.D1-D6, 2000.

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

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v. 43, 2001.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy. FISIOLÓGIA**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier p. 491-543, 2009.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S. J.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R. J. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 45, p. 180-190, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005, p.816.

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

KUIPERS, E.J.; BLASER, M.J. **Doença ácido-péptica: epidemiologia e fisiopatologia**. GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil Medicina. 23rd ed. v.1. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1161-1162, 2009.

KWAK, H.S.; PARK, S.Y.; NGUYEN, T.T.; KIM, C.H.; LEE, J.M.; SUH, J.S.; WHANG, W.K.; SOHN, U.D. Protective effect of extract from *Rumex aquaticus* Herba on ethanol-induced gastric damage in rats. **Pharmacology**, v. 90, p. 288-297, 2012.

LEVY, M. N.; KOEPPEN, M. B.; STANTON, B. A.; **Berne e Levy. Fundamentos de Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 451-472.

LI, N. S.; LUO, X.J.; DAI, Z.; LIU, B.; ZHANG, Y.S.; YANG, Z. C.; PENG, J. Beneficial effects of capsate on ethanol-induced mucosal injury in rats are related to stimulation of calcitonin gene-related peptide release. **Planta Medica**, v. 78, n. 1. P. 24-30, 2012.

LIN, K. J.; RODRÍGUES, L.A.G.; HERNÁNDEZ-DÍAZ, S. Systematic review of peptic ulcer disease incidence rates: do studies without validation provide reliable estimates? **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v.20, p. 718–728, 2011.

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

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, C.A.; VEIGA Jr. V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

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

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R. G; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, n. 3, p.234-239, 1998.

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

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

MATERSKA, M.; PERUCKA, I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1750-1756, 2005.

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

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimation antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORTON, J.F. Mucilaginous plants and their uses in medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 245-266, 1990.

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

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

MUDI, S.Y.; IBRAHIM, H. Activity of *Bryophyllum pinnatum* S. Kurz extracts on respiratory tract pathogenic bacteria. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v.1, n.1, p.43-48, 2008.

MUTHU, C.; AYYANAR, M.; RAJA, N.; IGNACIMUTHU, S. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.7, n.2, p.43, 2006.

MUZITANO, M. F. **Flavonoides de *Kalanchoe pinnata* (CRASSULACEAE): Avanços na pesquisa da utilização desta espécie medicinal no tratamento da leishmaniose cutânea.** Rio de Janeiro, 2006. 186 p. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006a.

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

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

MUZITANO, M.F.; FALCÃO, C.A.B.; CRUZ, E.A.; BERGOZI, M.C.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. **Planta Medica**, v.75, p.307–311, 2008.

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

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

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 323-336, 2002.

OJEWOLE, J. A. O. Antihypertensive properties of *Bryophyllum pinnatum* {(Lam) Oken} leaf extraxts. **American Journal of Hypertension**. v. 15, n. 4, 2002. [Abstract].

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

OKABE, S.; AMAGASE, K. An overview of acetic ulcer models- The history and state of the art of peptic ulcer research. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1321-41, 2005.

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

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. Exotic multifaceted medicinal plants of drugs and pharmaceutical industries. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.25, p. 7271-7282, 2009.

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.3, n.2, p. 27-33, 2011.

PAL, S.; CHAUDHURI, N. Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, p.97-102, 1991.

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

PLANGGER, N.; RIST, L.; ZIMMERMANN, R.; von MANDACH, U. Intravenous tocolysis with *Bryophyllum pinnatum* is better tolerated than beta-agonist application. **European Journal of Obstetrics & Gynecology Reproductive Biology**, v.124, p.168–172, 2006.

PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1. 2010, p.384-405.

POZZI, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. São Carlos, 2007. 73p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2007.

PROENÇA DA CUNHA, A. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian, p. 238-288, 2005.

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

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier p. 385-390, 2007.

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.36, n.3, p.282-288, 2002.

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, n.5, p.523-534, 2002.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonóides and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7. p. 933-956, 1996.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.

ROBINSON, M.M.; ZHANG, X. **The world medicines situations 2011**: tradicional medicines: global situations, issues and challenges. 3.ed. Geneva: World Health Organization, 2011. 12p. Disponível em: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>. Acesso em: 25 novembro 2011.

ROCHA, N.F.M.; OLIVEIRA, G. V.; ARAÚJO, F.Y.R.; RIOS, E.R.V.; CARVALHO, A.M.R.; VASCONCELOS, L. F.; MACÊDO, D.S.; SOARES, P.M.G.; DE SOUSA, D.P.; SOUSA, F.C.F. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 455-461, 2011.

ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. *et al.* Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* in mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, p.399-402, 1994.

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

SALAHDEEN, H. M.; YEMITAN, O. K. Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. **African Journal of Biomedical Research**, v.9, n. 2, p. 101-107, 2006.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E.; REYES-RAMÍREZ, A.; ANTONIO, L. C.; JIMÉNEZ, L. M.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; ARRIETA, J. Biosay-Guided Isolation of na Anti-Ulcer Compound, Tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: Role of Nitric Oxide, Prostaglandins and Sulfhydryls. **Molecules**, v.16, p. 665-674, 2011.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V.B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogênica activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1-6, 2005.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842–1860, 2008.

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

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 687-719, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5.ed. ver.amp. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2007; p.577-614

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

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

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.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKITAMA, K.; HAYASHI, H. New Insecticidal bufadienolide, Bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 64, p. 1310-1312, 2000.

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

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive Disease and Science** v. 50, n. 1, p.S24-S33, 2005.

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

TATSIMO, S. J. N.; TAMOKOU, J. D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Kaempferol rhamnoside derivates from *Bryophyllum pinnatum*. **BioMed Central Research Notes**, v. 5 p. 158, 2012.

TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; ANDRADE, F.D.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.9, p.1151-1155, 2002.

TORRES-SANTOS, E.C.; Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous Leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v.17, p.801–803, 2003.

TROPICOS. Quick Name Search. *Kalanchoe pinnata*. Disponível em: <http://www.tropicos.org/>. Acesso em: 1 mar. 2011.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, June 2006.

VAN DAM, R. M.; NAIDOO, N.; LANDBERG, R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. **Current opinion in lipidology**, v. 24, n.1, p. 25-33, 2013.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: thin layer chromatography atlas**. 2.ed Berlin: Springer, 1996. 384p.

WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; CORTE, C. L. D.; BRITO, V. B.; SEVERO, D.; DIAS, G. O. C.; MOREL, A. F.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. **Brain Research**, v. 1107, p. 192-198, 2006.

WEIBEL, E. R. **Stereological Methods**, v.1. London: Academic Press, 1979.

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

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

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extract. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 1 p. 219-231, 2005.

ANEXOS