UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Solanum cernuum Vell: estudo fitoquímico, avaliação das
atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção
do extrato seco por <i>spray dryer</i>

Mariza Abreu Miranda

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Solanum cernuum Vell: estudo fitoquímico, avaliação das atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por spray dryer

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Mariza Abreu Miranda

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas em 13/07/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP. AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Miranda, Mariza Abreu

Solanum cernuum Vell: estudo fitoquímico, avaliação das atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por *spray dryer*. Ribeirão Preto, 2015.

203 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

- 1. Solanum cernuum. 2. cernumidina. 3. gastroproteção.
- 4. citotoxidade. 5. antimicrobiano. 6. hiperplasia prostática benigna. 7. *spray dryer*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Mariza Abreu Miranda

Título do trabalho: *Solanum cernuum* Vell: estudo fitoquímico, avaliação das atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por *spray dryer*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.		_
	Assinatura:	_
Prof. Dr		_
	Assinatura:	
Prof. Dr		_
	Assinatura:	
Prof. Dr.		_
	Assinatura:	
Prof. Dr.		_
Instituição:	Assinatura:	

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a toda minha família, em especial aos meus queridos e amados pais, Fátima e João, por todo amor, compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por dar forças, saúde e sabedoria para alcançar esse desejado sonho.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, por todo ensinamento, amizade e orientação que se estendeu do mestrado ao doutorado.

A toda minha família: tias, tios, primos, primas e em especial aos meus pais, Fátima e João, e aos meus irmãos, Luciana e Wilson, por estarem sempre comigo com pensamentos positivos e orações.

Ao meu love, Mike, por tornar minha vida ainda mais feliz e por fazer sentir o amor verdadeiro. Por sempre me apoiar, se orgulhar de meu trabalho e dizer: "You will finish my Love! Keep studying! You wil be a doctor!".

À Universidade de Mississipi, ao *National Center for Natural Products Research* (NCNPR) e aos professores Dr. Ikhlas Khan e Dr. James McChesney, grandes nomes na área de produtos naturais, que foram meus co-orientadores durante meu estágio sanduíche, por todo ensinamento, ajuda e amizade durante minha estadia nos EUA.

Aos técnicos e amigos Douglas Rodenburg e Kamila Alves, da empresa Ironstone Separations, que muito me ensinaram, tanto em conhecimento como em desafios da vida.

Aos novos amigos que pude conhecer durante o estágio no exterior: Vamshi, Amer, Amir, Mohammed, James, Ayana, Cássia, Mariana, Michele, entre outros que contribuíram de alguma forma para tornar tal período ainda mais proveitoso.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP: Angélica, Walter e Mário por toda ajuda e paciência com tantas solicitações que fazia.

À Prof. Dra Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado e à técnica Angélica, do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP, por todo ensinamento e auxílio na realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Mandip Sachdeva, da Florida A&M University, por realizar os ensaios de inibição da angiogênese.

À Prof. Dr^a Simone de Pádua Teixeira e sua aluna Marina, do laboratório de Botânica da FCFRP, pelo auxilio no uso do fotomicroscópio e estereomicroscópio.

À aluna e amiga Marivane Lemos por ensinar e auxíliar a realização dos ensaios de gastroproteção.

Ao técnico Vinicius do Departamento de Química da FFCLRP/USP por realizar análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo Júnior, da FFCLRP/USP, pela identificação botânica da espécie em estudo.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, à técnica Izabel Cristina Turatti, da FCFRP/USP, pelas análises de cromatografia gasosa e ao técnico José Carlos Tomaz pelas análises de massas.

Ao Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal, da FCFRP/USP, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos durante a realização do estagiário PAE.

Ao Dr. João Paulo Barreto de Sousa, do laboratório de Quimica Orgânica da FCFRP/USP, pelo ensimaneto e axílio para a realização da 'short column'.

Ao Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis, da FMRP/USP, por abrir as portas de seu laboratório para realização dos ensaios com as linhagens de hiperplasia prostática benigna e a sua aluna Claudia Sares, agora também amiga, por todo cuidado com nossas células e ajuda nos experimentos.

Ao Dr. Kleiton Silva Borges, do departamento de Genética da FMRP/USP, por ensinar e colaborar com nossos ensaios de apoptose e necrose.

Às técnicas Patrícia e Camila, do hemocentro de Ribeirão Preto, por realizar as leituras de citometria de nossos testes e tentar buscar respostas junto a nossa equipe para resultados inesperados.

Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, da FCFRP/USP, por toda paciência e ensinamento na realização dos testes de secagem e planejamentos. À suas alunas, Simone e Ana pela grande ajuda, companhia e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia que não hesitam de auxiliar e dividir seus conhecimentos, além de tornarem meus dias muito mais alegres: Anny, Bruno, Cristiane, Danniela, Daniela, Eliane, Érick, Federico, Gari, Ingrid, Juliana, Jonas, Lucas, Marcela, Marcelo, Marivane, Mohammed, Rejane, Rosana, Tatiane, Tiago, William.

À amiga Danni, 'twin', por todo bom tempo compartilhado em Ribeirão Preto. Por me acolher em seu 'lar doce lar' quando retornei do doutorado sanduíche e pela amizade que ainda permanece.

Às amigas que de perto ou mesmo de longe, sempre torceram e torcem pelo meu sucesso e para que essa etapa fosse concluída: Lorena, Fernada (Fer),

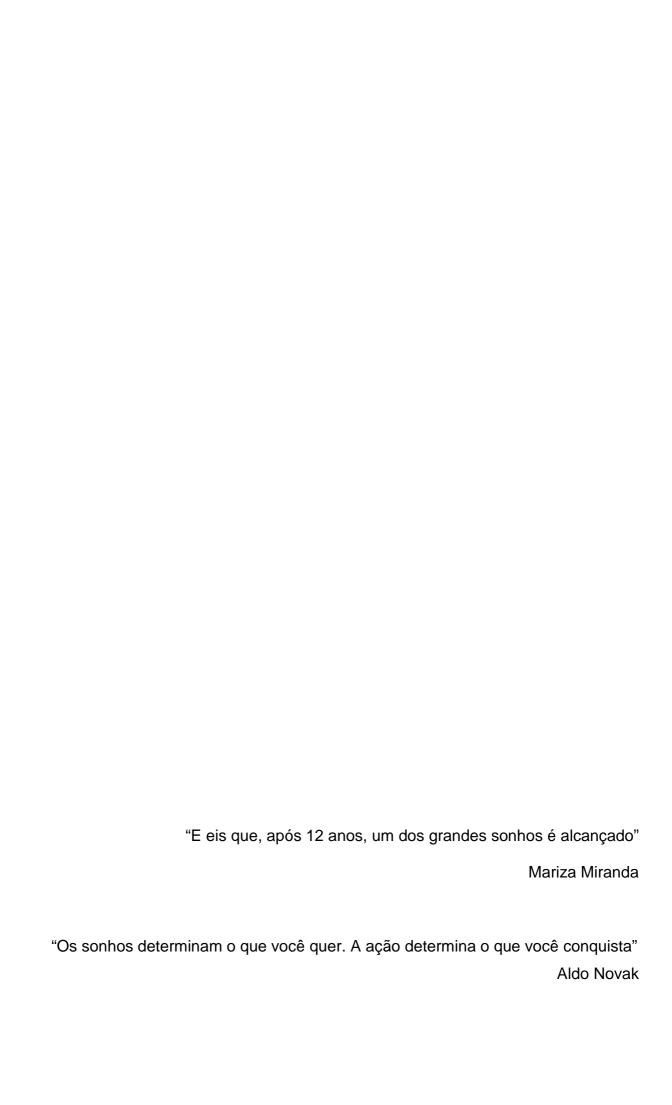
Renata, Jand, Simoninha, Josi, Juliana (Ju), Fernanda Carvalho, Ana Clarissa, Fabrícia, Estael, Dayane (Day), Soninha, Christian e Luis Gustavo.

Ao programa de pós-graduação da FCFRP e aos funcionários Eleni, Rafael e Rosana por serem sempre tão atenciosos e prestativos em todas as necessidades.

À CAPES (PROEX 0223085) pela bolsa inicial concedida.

À FAPESP (processo 2012/00715-7) pela bolsa concedida e oportunidade do doutorado sanduíche.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse sonho fosse realizado.



RESUMO

MIRANDA, M. A. Solanum cernuum Vell: estudo fitoquímico, avaliação das atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por spray dryer. 2015. 204f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Solanum cernuum Vell. (Solanaceae), popularmente conhecida como "panacéia", é uma planta nativa do sul e sudeste do Brasil. Seu nome "panacéia" provavelmente é devido à grande amplitude de aplicações que possui na medicina popular: tratamento de úlceras, lesões hepáticas, infecções de pele, como antitumoral, diurético, depurativo, anti-hemorrágico, bem como para o tratamento da gonorreia e da hiperplasia benigna da prostática (HBP). Considerando os usos de S. cernuum na medicina popular brasileira e a escassez de estudos que os corroborrem, propomos neste trabalho, a partir da obtenção de diferentes extratos, frações e compostos isolados, testar as atividades biológicas gastroprotetora, citotóxica e antimicrobiana relatadas na medicina popular. Para tanto, folhas da espécie Solanum cernuum Vell. (Solanaceae) foram coletadas no município de Teresópolis/ RJ. O extrato hidroetanólico (ESC) e em acetato de etila foram obtidos a partir de folhas secas e trituradas. Frações em hexano (FHex), diclorometano (FDCM), acetato de etila (FAcOEt), n-butanol (FBuOH) e água (FAq) foram obtidas a partir do extrato ESC. A partir dos diversos fracionamentos do extrato ESC isolaram-se e identificaram-se quatro compostos: ácido trans-isoferulico, cernumidina, quercitrina e afzelina, sendo encontrados no extrato nas concentrações de 1,5%, 4,8%, 1,3% e 1,6%, respectivamente. Da fração em heptano, obtida da partição do extrato em acetato, isolaram-se β -sitsterol e friedelina. No ensaio antimicrobiano, apenas as frações FHex, FDCM e FAq, oriundas da partição do extrato ESC, apresentaram atividade, em diferentes concentrações, frente a determinadas linhagens de bactérias e fungos testadas. Quanto aos compostos voláteis, na extração por hidrodestilação, não houve rendimento suficiente, mas a partir do hidrolato, por partição com diclorometano, foi possível determinar a composição dos voláteis por CG/EM. Os tricomas de S. cernuum são majoritariamente estrelados, do tipo tectores. No ensaio do XTT apenas a FDCM e o composto friedelina foram seletivos para células MCF-7 (carcinoma mamário) na concentração de 16,6 μg/mL e 124,9 μg/mL, respectivamente. O extrato ESC apresentou atividade gastroprotetora nos ensaios de indução de úlcera por etanol/HCl e por anti-inflamatório não esteroidal (AINE), bem como foi curativo no ensaio de úlcera crônica induzida por ácido acético na dose de 250 mg/kg. Os compostos isolados, exceto o alcaloide cernumidina, apresentaram atividade gastroprotetora pelo ensaio de indução de úlcera por etanol/HCl na dose de 30 mg/kg. Ainda sobre a gastroproteção, na avaliação de pH utilizando o ensaio de ligadura de piloro, todos os grupos de animais tratados com extrato ESC não apresentaram diminuição da acidez estomacal. Porém, houve diminuição da concentração de íons hidrogênio ([H+] mEq.g-1/L) na secreção gástrica nos grupos tratados. A produção de muco na mucosa gástrica também não foi aumentada nos grupos tratados com o extrato ESC. A avaliação da ação gastroprotetora por inibição da enzima iNOS e alguilação de grupos sulfidrilas evidenciou que a produção de óxido nítrico e de grupos sulfidrilas podem estar envolvidos na atividade gastroprotetora do ESC. Diferentes concentrações de

extrato ESC e alcaloide cernumidina foram testadas nos tempos de 48, 72 e 96 h em cultura primária de células de músculo liso relacionadas a hiperplasia benigna da próstata (HPB), sendo possível observar inibição do crescimento celular de 60% na concentração de 3 mg/mL para o extrato e de 62% para o alcaloide na concentração de 1 mg/mL (3,3 x 10⁻⁶ M) no tempo de exposição de 96 h. Com o intuito de avaliar o potencial efeito indutor de apoptose, foi realizado o ensaio de anexina V Cy5 por citometria de fluxo. Tanto para o extrato ESC como para o acaloide cernumidina observou-se que a morte celular ocorreu mais por apoptose. Apenas para o alcaloide, na concentração de 1 mg/mL, houve significativa morte por necrose. Na atividade de inibição da angiogenese, avaliada em células HUVEC, a FBuOH (50 μg/mL) e o alcaloide cernumidina (160 nM) inibiram a formação de vasos endoteliais em 62,75% e 77,73%. Na secagem do extrato por spray dryer o rendimento, a densidade aparente, a densidade compacta, o tamanho das partículas (D₅₀) e o teor de cernumidina foram influenciados por alguns dos fatores avaliados: temperatura, vazão e porcentagem de adjuvante, linearmente ou na forma quadrática. Na otimização da secagem por spray dryer, utilizando a função desejabilidade, observou-se a proximidade dos valores preditos para rendimento do pó e teor de cernumidina com os valores reais, evidenciando a confiabilidade desse método matemático. Assim, os resultados obtidos corroboram alguns dos usos populares abrindo novas possibilidades para o desenvolvimento de fitoterápico a partir *S. cernuum*.

Palavras-chave: *Solanum cernuum*, cernumidina, gastroproteção, citotoxidade, antimicrobiano, hiperplasia prostática benigna, *spray dryer*.

ABSTRACT

MIRANDA, M. A. Solanum cernuum Vell: phytochemical study, investigation of gastroprotective, antimicrobial, cytotoxic activities and attainment of dry extract by spray dryer. 2015. 204p. Thesis (PhD). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Solanum cernuum Vell. (Solanaceae), popularly known as "panacéia", is a native tree from Southern and Southeastern Brazil. Its traditional name is due to the wide range of uses in folk medicine including the treatment of ulcers, liver damage, skin infections, as diuretic, antitumor, depurative, anti-hemorrhagic, as well as to treat gonorrhoea and benign prostatic hyperplasia (BPH). Considering the importance of S. cernuum in folk medicine and the lack of research supporting its use, the aims of this project were to obtain different extracts, fractions and isolated compounds this plant to be tested for gastroprotective, cytotoxicity and antimicrobial activities. Leaves S. cernuum were collected in Teresópolis/RJ. The hydroethanolic (ESC) and ethyl acetate extracts were obtained from the dried and grinded leaves. Fractions in hexane (FHex), dichloromethane (FDCM), ethyl acetate (FAcOEt), n-butanol (FBuOH) and water (FAQ) were obtained from the ESC extract. The ESC extract was fractionated using different chromatographic techniques furnishing four isolated compounds: trans-isoferulic acid, cernumidine, quercitrin and afzelin. The content of these four compounds were quantified to be 1.5%, 4.8%, 1.3% and 1.6%, respectively, in the extract, β -sitosterol and the friedelin were isolated by partitioning the ethyl acetate extract with heptane. In the antimicrobial assay, only FHex, FDCM and FAq fractions showed activity at different concentrations against the tested strains of bacteria and fungi. The hydrodistillation of the leaves of S. cernuum did not fusrnish essential oils, but the partition of the hydrolate with dichloromethane allowed the determination of its composition by GC/MS. The trichomes of S. cernuum are majority kind of stellate tector. Only FDCM fraction and friedelin compound showed activity in XTT assay against MCF-7 cells (breast carcinoma) at the concentration of 16.6 µg/mL and 124.9 µg/mL, respectively. The ESC extract showed gastroprotective effects in the acute gastric ulcer assay, which is induced by HCI/EtOH and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Also, in the chronic ulcer assay, induced by acetic acid, the oral administration of ESC extract (250 mg/kg) reduced the ulcerated area, suggesting that it has a curative potential. The isolated compounds (30 mg/kg) exhibited gastroprotective activity in acute gastric ulcer assay, except cernumidine. The results indicated that the ESC extract was able to reduce the concentration of H+ ions in comparison with the control group. However, ESC extract did not modify the pH of the gastric juice acid and there was no significant increment in the amount of gastric adherent mucus in pretreated group. Further, it was evaluated the role of nitric oxide (NO) and sulfhydryl (SH) groups on effect elicited by ESC extract. The results showed that the gastroprotective gastroprotection induced by the ESC extract is correlated with the presence of endogenous NO and SH groups which were responsible for gastroprotective activity. In the anti-angiogenic activity assay evaluated in HUVEC cells, the FBuOH fraction (50 µg/mL) and the cernumidine alkaloid (160 nM) inhibited the the formation of endothelial vessels by 62.75% and 77.73%, respectively. Different concentrations of the ESC extract and cernumidine alkaloid were further tested in primary culture of

smooth muscle HPB for 48, 72 and 96 h. ESC extract (3 mg/mL) and the alkaloid (1 mg/mL; 3.3×10^{-6} M) treatment for 96 h inhibited the cell growth by 60% and 62%, respectively. In addition, it was assessed the potential effect of extract and its constituents to induce apoptosis by performing the annexin Cy5 assay by flow cytometry. Treatment with ESC extract and cernumidine alkaloid led to cell death by apoptosis. Only cernumidine at 1 mg/mL showed significant cells death by necrosis compared to control. Considering the spray dryer technique to dry the extract, the yield, bulk and tapped densities, particle size (D_{50}) and the content of the cernumidine are influenced by some of the evaluated factors: temperature, flow and excipient percentage, linearly or quadratic form. To optimize the drying by spray dryer, it was used the desirability function. It was observed that the proximity of the predicted values of the yield and cernumidine content with the real values were found, showing the reliability of this mathematical method. Therefore, the obtained results corroborate the folk use and open new opportunities for the development of a phytotherapic from *S. cernuum*.

Key-words: *Solanum cernuum*, cernumidine, gastroprotective, cytotoxicity, antimicrobial, benign prostatic hyperplasia, spray dryer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral da espécie Solanum cernuum. (a) Individuo de S. cernuum.
(b) inflorescências. Campus da USP/Ribeirão Preto. Fonte: A autora2
Figura 2. Estrutura de triterpenoides de S. cernuum: (1) cicloeucalenona
(2) 24-oxo-31-norcicloartanona5
Figura 3. Estrutura dos alcaloides de S. cernnum: (1) cernumidina (2)
isocernumidina6
Figura 4. Spray dryer de escala laboratorial modelo LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasi
Ltda., Brasil)13
Figura 5. Esquema gráfico do planejamento Box-Behnken com três variáveis e
ponto central15
Figura 6: Fluxograma dos fracionamentos realizados com os extrato e frações25
Figura 7. Fração AcOEt I obtida da partição ácido/base e padrão de quercitrina26
Figura 8. Perfil do ESC por HPTLC eluído na fase móvel RebC:MeOH:H2C
(100:4:1) (a) revelação com anisaldeido, em 254 nm; (b) revelação com Reagente
de Dragendorff, em 366 nm29
Figura 9. (a) Perfil cromatográfico para o extrato hidroetanólico. (b) espectro de
absorção dos picos majoritários do extrato ESC61
Figura 10. Fracionamento realizado para o extrato ESC62
Figura 11. Proposta de biossíntese para os alcaloides cernumidina e
isocernumidina66
Figura 12. Fracionamento realizado para o extrato em acetato de etila67
Figura 13. Estrutura química do composto ácido trans-isoferúlico
Figura 14. Estrutura química do composto quercitrina70
Figura 15. Estrutura química do composto afzelina72
Figura 16. Estrutura química do alcaloide cernumidina74
Figura 17. Estrutura química da friedelina76
Figura 18. Estrutura química do $β$ -sitosterol79
Figura 19. Tricomas presentes na folhas de S. cernuum. (a) face adaxial da folha.
(b) face abaxial da folha83
Figura 20. Gráfico do efeito da administração do extrato hidroetanólico das folhas de
S. cernuum (ESC) (100, 250 e 500 mg/kg), omeprazol (30 mg/kg) e controle (veículo)
por via oral no modelo de úlcera gástrica induzida por EtOH/HCl (60%/0,03M)85

Figura 21. Gráfico do efeito da administração dos compostos isolados das folhas de
S. cernuum (dose de 30 mg/kg), omeprazol (dose de 30 mg/kg) e controle (veículo)
por via oral no modelo de úlcera gástrica induzida por EtOH/HCI (60%/0,03M)86
Figura 22. Gráfico do efeito da administração do extrato ESC (doses de 100, 250 e
500 mg/kg), omeprazol (dose de 30 mg/kg) e controle (veículo) por via oral no
modelo de úlcera gástrica induzida por AINE em camundongos89
Figura 23. Gráfico do efeito da administração do extrato ESC na dose de 250 mg/kg
e ranitidina (100 mg/kg) por via oral no modelo de úlcera crônica induzida por ácido
acético (20 µL, 20%) em camundongos91
Figura 24. Gráfico do efeito da administração de extrato ESC (250 mg/kg) e
carbenoxolona (200 mg/kg) por v.o. no modelo de úlceras gástricas induzidas por
EtOH/HCI (60%/0,03N), associado a inibição da NO-sintase (administração de L-
NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de
NEM, 10 mg/kg, i.p.) em camundongos95
Figura 25. Efeito inibidor do extrato ESC (a) e do alcaloide cernumidina (b) na
proliferação de células musculares de hiperplasia prostática benigna101
Figura 26. Efeito do extrato ESC e do alcaloide em diferentes concentrações na
indução de apoptose103
Figura 27. Gráfico da porcentagem de inibição no número de pontos de ramificação
por campo
Figura 28. Imagens de microscópio de fluorescência de células HUVEC marcadas
com calceína AM após 18 h de tratamento106
Figura 29. Gráfico da superfície de resposta do rendimento em função da
temperatura e da vazão111
Figura 30. Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função da
temperatura e vazão115
Figura 31. Gráfico de superfície de resposta da densidade compacta em função da
temperatura e da vazão117
Figura 32. Gráfico de superfície de resposta para o D_{50} :a) em função da temperatura
e porcentagem de adjuvante;b) em função da temperatura e da vazão120
Figura 33. Gráfico de superfície de resposta para o teor (%) de cernumidina em
função da temperatura e da porcentagem de adjuvante122
Figura 34 Gráfico da desejabilidade com os níveis das variáveis

Figura	35.	Teor	de	cernun	nidina	durante	0	teste	de	estabilidade	preliminar	do	рó
otimiza	ido po	ela fu	nçã	o desej	abilida	ade						1	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações das colunas preparativas. 22
Tabela 2. Sequência de eluição utilizada na coluna com fase Kromasil de 2,54 cm
para fracionamento da fração AcOEt I e volumes coletados28
Tabela 3. Fases móveis utilizadas para filtração de 50 g do ESC30
Tabela 4. Rendimento das frações obtidas da filtração do ESC30
Tabela 5. Sequência de eluição utilizada no fracionamento de FD10-12, frações e
rendimentos obtidos utilizando coluna de vidro com fase estacionária $\textit{Bakerbond}^{\text{\tiny{B}}}.32$
Tabela 6. Fases móveis utilizadas na coluna Luna de 2,54 cm.33
Tabela 7. Sequência de eluição na coluna Kromasil de 7,62 cm com a fração
heptano obtida da partição do EAE35
Tabela 8. Sequência de eluição e frações obtidas por coluna clássica 36
Tabela 9. Meios de cultura, condições de incubação e antibióticos para cada micro-
organismo indicador49
Tabela 10. Parâmetros do processo de secagem por spray dryer51
Tabela 11. Fatores estudados e seus níveis para o processo de secagem52
Tabela 12. Planejamento fatorial (Box-Behnken) para o processo de secagem53
Tabela 13. Rendimento das frações obtidas após a particão do ESC60
Tabela 14. Rendimentos da partição do extrato com ácido/base63
Tabela 15. Dados dos espectros de RMN obtidos para o ácido trans-isoferúlico em
CD ₃ OD e dados da literatura69
Tabela 16. Deslocamentos obtidos nos espectros de RMN para o composto
quercitrina em CD ₃ OD e dados da literatura71
Tabela 17. Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto afzelina em
CD ₃ OD e dados da literatura73
Tabela 18. Dados dos espectros de RMN obtidos para a cernumidina em CD_3OD e
dados da literatura75
Tabela 19. Dados dos espectros de RMN obtidos para a friedelina em CDCI ₃ e
dados da literatura77
Tabela 20. Dados dos espectros de RMN obtidos para o β -sitosterol em CDCl $_3$ e
dados da literatura80
Tabela 21. Compostos presente no hidrolato das folhas de S. cernuum analisados
por CG/MS82

Tabela 22. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e do extrato ESC
nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg em úlceras gástricas agudas induzidas por
etanol/HCl em camundongos85
Tabela 23. Efeitos da administração oral dos composto isolados de S. cernuum na
dose de 30 mg/kg e omeprazol (30 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas
por etanol/HCl em camundongos87
Tabela 24. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e do extrato ESC
(100, 250 e 500 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por AINE
(indometacina, 100 mg/kg) em camundongos90
Tabela 25. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e do extrato ESC
(250 mg/kg) em úlceras crônicas induzidas por ácido acético (20 μL, 20%) em
camundongos92
Tabela 26. Efeitos da administração intraduodenal de indometacina (100 mg/kg),
ranitidina (100 mg/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) e do extrato ESC (100, 250 e
500 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica ácida e na secreção
de muco de camundongos submetidos à ligadura de piloro93
Tabela 27. Efeito da administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) do extrato
ESC (250 mg/kg) em úlceras gástricas por etanol/HCl associado a inibição da
NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos
sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.)96
Tabela 28 . Concentração Inibitória (CI ₅₀) e Índice de Seletividade (IS) em linhagem
de células de mama (MCF-10A e MCF-7) tratadas com diferentes concentrações das
amostras98
Tabela 29. Concentração Inibitória (CI ₅₀) e índice de seletividade (IS) para o extrato
de S. cernuum e compostos isolados em linhagens celular normal e tumorais pelo
ensaio de XTT99
Tabela 30. Valores de CIM e CBM das amostras testadas para atividade
antimicrobiana108
Tabela 31. Valores dos rendimentos do processo de secagem110
Tabela 32. Análise estatística do rendimento dos pós obtidos pelo processo de
secagem111
Tabela 33. Características dos pós obtidos por spray dryer. 113
Tabela 34 Propriedade do fluxo dos pós relacionados ao FH e IC 114

Tabela 35. Análise estatística da densidade aparente dos pós obtidos pelo pro	cesso
de secagem por <i>spray dryer</i>	115
Tabela 36. Análise estatística da densidade compacta dos pós obtidos	pelo
processo de secagem por <i>spray dryer</i>	116
Tabela 37. Relação entre ângulo de repouso e fluidez	118
Tabela 38. Análise estatística do tamanho médio de partícula dos pós obtido	s pelo
processo de secagem por <i>spray dryer</i>	119
Tabela 39. Análise estatística do teor de cernumidina presente nos pós obtido	s pelo
processo de secagem por <i>spray dryer</i>	121
Tabela 40. Valores estabelecidos para as respostas estudadas no proces	so de
secagem para realizar a função desejabilidade	123
Tabela 41. Caracterização do pó otimizado obtido por spray dryer	124

APÊNDICES

Apêndice 1. Espectro de RMN de ¹ H do ácido trans-isoferúlico em CD ₃ OD	160
Apêndice 2. Espectro de RMN de ¹³ C do ácido trans-isoferúlico em CD ₃ OD	161
Apêndice 3. DEPT-135 do ácido trans-isoferúlico em CD ₃ OD	162
Apêndice 4. Espectro de RMN de ¹ H do composto quercitrina em CD ₃ OD	163
Apêndice 5. Espectro de RMN de ¹³ C do composto quercitrina em CD ₃ OD	164
Apêndice 6. Espectro de RMN de ¹ H do composto afzelina em CD ₃ OD	165
Apêndice 7. Espectro de RMN de ¹³ C do composto afzelina em CD ₃ OD	166
Apêndice 8. Espectro de RMN de ¹ H do alcaloide cernumidina em CD ₃ OD	167
Apêndice 9. Mapa de contorno de HMQC do alcaloide cernumidina em CD ₃ OD	168
Apêndice 10. Espectro de RMN de ¹³ C do alcaloide cernumidina em CD ₃ OD	169
Apêndice 11. DEPT-135 do alcaloide cernumidina em CD ₃ OD	170
Apêndice 12. Espectro de RMN de ¹ H da friedelina em CDCl ₃	171
Apêndice 13. Espectro de RMN de ¹³ C da friedelina em CDCl ₃	172
Apêndice 14. DEPT-135 do composto friedelina em CDCl ₃	173
Apêndice 15. Espectro de RMN de ¹ H do β-sitosterol em CDCl ₃	174
Apêndice 16. Espectro de RMN de ¹³ C do β-sitosterol em CDCl ₃	175
Apêndice 17. DEPT-135 do composto β-sitosterol em CDCl ₃	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt acetato de etila

AINEs anti-inflamatório não esteroidal

AcOH ácido acético
ACN acetonitrila
BuOH butanol

CCDC cromatografia em camada delgada comparativa

CG cromatografia gasosa

CG/EM cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massas

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE/EM cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a

espetrometria de massas

da densidade aparente

DAD detector de arranjo diodo

dc densidade compacta

di diâmetro interno
DI₅₀ dose inibitória
DMSO dimetilsulfóxido

EAE extrato em acetato de etila

EM espectrometria de massas

EPM erro padrão da média
ESC extrato hidroetanólico

EtOH etanol

FAcOEt fração em acetato de etila

FAq fração aquosa

FBuOH fração em butanol

FDCM fração diclorometânica

FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FH Fator de Hausner FHex fração em hexano

HPB hiperplasia prostática benigna

HPTLC high performance thin layer chromatography

h alturaHep heptanoHex hexano

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence

IC índice de Carr

i.p. via intrapertitonealIK Índice de KovatsIV Infravermelho

M molar

MeCN acetronitrila
MeOH metanol

MTBE metil ter-butil eter

MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazo-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

OMS Organização Mundial da Saúde

Rf fator de retenção

RMN ressonância magnética nuclear RPMI Roswell Park Memorial Institute

TFA trifluoracetico

Tr tempo de retenção

UV ultravioleta v.o. via oral

w/a água: ácido acético

LISTA DE SIMBOLOS

® marca registrada

SUMÁRIO

RESU	JMO	
ABST	RACT	III
1 IN	ITRODUÇÃO	1
1.1	Plantas medicinais	
1.1	Gênero <i>Solanum</i> e a espécie <i>Solanum cernuum</i> Vellozo	
1.2	Metabólitos secundários presentes na espécie Solanum cernuum	
1.4	Atividade gastroprotetora	
1.5	Atividade citotóxica	
1.6	Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	
1.7	Angiogênese	
1.8	Atividade antimicrobiana	
1.9	Secagem por spray dryer	
1.9.1	Planejamentos experimentais	
1.9.2	Desejabilidade	
	BJETIVOS	
2.1	Objetivo geral	
2.2	Objetivos específicos	18
3 M	ATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Obtenção do material vegetal, extratos e frações	20
3.2	Cromatografia em camada delgada comparativa e perfil cromatogr	áfico
em Cl	LAE-UV	21
3.3	Fracionamento dos extratos durante o estágio no exterior	22
3.3.1	Solventes preparados	23
3.3.2	Análises cromatográficas	23
3.3.3	Partição ácido/base do extrato ESC	26
3.3.3.	1 Fracionamento da fração AcOEt I	26
3.3.4	Fracionamento do extrato ESC para isolamento de alcaloide(s)	28
3.3.4.	1 Filtração do ESC em coluna de vidro	29
3.3.4.	2 Digestão das frações 10 a 12	31
3.3.4.	3 Cromatografia da amostra digerida das frações FD10-12	32

3.3.4.4	Fracionamento de FCB 6 e FCB 8 em coluna de fase reversa preparat	tiva
Luna c	de 2,54 cm	.33
3.3.5	Fracionamento do extrato em acetato de etila (EAE)	.34
3.3.5.1	Fracionamento da fração heptano por coluna clássica	.35
3.3.5.2	Purificação das frações 260 à 293 por short column	.36
3.4	Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados	.37
3.5	Quantificação dos compostos isolados no extrato ESC	.37
3.6	Avaliação dos compostos voláteis	.38
3.7	Tricomas das folhas de S. cernuum	.39
3.8	Atividade gastroprotetora	.39
3.8.1	Delineamento experimental	.39
3.8.2	Animais	.39
3.8.3	Modelo de úlcera aguda induzida por etanol/HCI e AINEs (indometacina) .	.40
3.8.4	Modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético (ensaio curativo)	.41
3.8.5	Avaliação da atividade sobre a secreção gástrica: Modelo de avaliação	da
secreç	ao gástrica e doseamento de muco gástrico (ligadura de piloro)	.42
3.8.6	Mecanismos de ação gastroprotetora antioxidante - Inibição da óxido nítr	ico
sintase	e (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) <i>in vivo</i>	.43
3.8.7	Análise Estatística	.43
3.9	Ensaio de citotoxicidade	.43
3.9.1	Ensaio XTT	.43
3.10	Ensaios com cultura primária de músculo liso de HPB	.45
3.10.1	Cultura primária	.45
3.10.2	Ensaio de proliferação celular	.45
3.10.3	Ensaio de apoptose	.46
3.11	Inibição da angiogênese	.46
3.12	Avaliação da atividade antimicrobiana	.47
3.12.1	Avaliação da atividade antibacteriana	.48
3.12.2	Avaliação da atividade antifúngica	.50
3.13	Secagem do extrato ESC em spray dryer	.51
3.13.1	Rendimento do processo	.53
3.13.2	Caracterização dos extratos secos	.53
3.13.3	Densidade aparente (da)	.54
3.13.4	Densidade compactada (dc)	.54

3.13.5 Determinação do Fator de Hausner (FH)	54
3.13.6 Determinação do Índice de Carr (IC)	55
3.13.7 Ângulo de repouso (α)	55
3.13.8 Teor de umidade (TU)	56
3.13.9 Tamanho das partículas (D ₅₀)	56
3.13.10 Quantificação do marcador	57
3.13.11 Otimização das condições de secagem	57
3.13.12 Estudo de estabilidade	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1 Rendimento dos extratos e frações obtidas a partir da pa	
4.2 Análises cromatográficas	
4.3 Fracionamento dos extratos	
4.3.1 Partição ácido/base do extrato hidroetanólico (ESC)	
4.3.1.1 Fracionamento da fração AcOEt I	
4.3.2 Fracionamento do extrato hidroetanólico (ESC) para	_
alcaloide(s)	
4.3.2.1 Filtração do ESC em coluna de vidro	
4.3.2.3 Cromatografia da amostra digerida das frações FD10 -12	
4.3.2.4 Fracionamento de FCB6 e FCB8 em coluna de fase rev	
Luna de 2,54 cm	
,	
4.3.3.1 Fracionamento da fração heptano por coluna clássica e short column	
4.4 Determinação estrutural dos compostos isolados	
4.4.1 Composto SC1: acido trans-isoferúlico	
4.4.2 Composto SC2: Quercitrina	
4.4.3 Composto SC3: Afzelina	
4.4.4 Composto SC4: Cernumidina	
4.4.5 Composto SC5: Friedelina	
4.4.6 Composto SC6: β-sitosterol	
4.5 Quantificação dos compostos isolados no extrato ESC	
4.6 Avaliação dos compostos voláteis	

4.7	Tricomas das folhas de S. cernuum	82
Ensai	os Biológicos	84
4.8	Avaliação da atividade gastroprotetora	84
4.8.1	Efeito do extrato hidroetanólico das folhas de S. cernuum em úlc	eras agudas
induzi	das por etanol/HCl	84
4.8.2	Efeito sobre úlceras agudas induzidas por AINEs (indometacina)	88
4.8.3	Efeito sobre úlceras crônicas induzidas por ácido acético	91
4.8.4	Efeito sobre secreção gástrica e doseamento de muco gástrico	(ligadura de
piloro)		92
4.8.5	Mecanismo de ação gastroprotetora antioxidante - Inibição do	óxido nítrico
sintas	e (iNOS) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (SH) <i>in vivo</i>	94
4.9	Ensaio de citotoxidade	97
4.10	Ensaio com cultura de músculo liso de hpb	100
4.10.1	Efeito do extrato ESC e do alcaloide na indução de apoptose	102
4.11	Inibição de angiogênese	104
4.12	Atividade antimicrobiana	107
4.13	Secagem do extrato ESC em spray dryer	109
4.13.1	Caracterização dos extratos secos	112
4.13.2	Densidade aparente (<i>d</i> a)	114
4.13.3	Densidade compacta (<i>d</i> c)	116
4.13.4	Ângulo de repouso (α)	117
4.13.5	Teor de umidade (TU)	118
4.13.6	Tamanho das partículas (D ₅₀)	118
4.13.7	Quantificação do marcador cernumidina	120
4.13.8	Otimização das condições de secagem	122
4.13.9	Ensaio de estabilidade	124
5 C	ONSIDERAÇÕES FINAIS	126
6 RI	EFERÊNCIAS	128
APÊN	DICES	160

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais têm sido investigadas e utilizadas desde o início da história humana para aliviar e tratar doenças. As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação de suas virtudes terapêuticas. Esse tipo de cultura medicinal, denominado etnofarmacologia, desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares como, por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (YAN et al., 2013; MCCHESNEY et al., 2007; LOPEZ, 2006).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) enfatizam a importância dos estudos com espécies vegetais de biomas ameaçados como, por exemplo, o cerrado. Segundo essa organização, dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais 11% são exclusivamente originários de plantas e uma parcela significativa é preenchida por fármacos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais (YAN et al., 2013; NEWMAN, CRAGG, 2012; RATES, 2001).

Nesse contexto, o Brasil se destaca por ser um dos países mais ricos em diversidade vegetal, o que representa um vasto potencial de medicamentos a serem descobertos (ADENLEA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012).

1.2 Gênero Solanum e a espécie Solanum cernuum Vellozo

Espécies do gênero *Solanum* são utilizadas na medicina tradicional por difererentes culturas para diversas finalidades. Algumas se destacam por suas valiosas propriedades nutricionais como o tomateiro (*Solanum lycopersycum*) e a batata inglesa (*Solanum tuberosum*). Outras por apresentarem diferentes atividades medicinais que podem justificar seu uso na composição de medicamentos fitoterápicos (LORENZI, MATOS, 2008).

Glicosídeos esteroidais (IKEDA et al., 2003; ONO et al., 2006; TIOSSI et al. 2012), flavonoides (SILVA et al., 2003) e alcaloides pirrólicos (EL-SAYED et al., 1998; EVANS, SOMANABANDHU, 1980) tem sido descritos como constituintes químicos presentes em *Solanum*. Solasonina e solamargina são glicoalcaloides

majoritários encontrados em pelo menos 100 espécies desse gênero (BLANKEMEYER et al., 1998). Estudos demonstraram ação citotóxica desses glicoalcaloides em diferentes linhagens de células tumorais humanas (ZHOU et al., 2014; DING et al., 2013; CHAM, CHASE, 2012; PUNJABI et al., 2008; KUO et al., 2000; DAUNTER, CHAM, 1990; CHAM et al., 1987).

Solanum cernuum Vell. (Figura 1) (Solanaceae) é uma planta arbustiva, com 2 a 3 metros de altura, caule extremamente piloso, flores que saem de pequenas cimeiras com muitos tricomas. Sua folha é verde escura e brilhante e na parte abaxial apresenta-se verde clara. Em geral, os tricomas estão presentes em grande quantidade em quase todas as partes do vegetal. Os frutos são globosos, pequenos e amarelos quando maduro. Seu aroma é muito intenso no preparo de chás. Muitas pessoas acabam desistindo do tratamento, por reclamarem de seu sabor (LORENZI, MATOS, 2008; ALVES et al., 2007; LORENZI, 1992).





Figura 1. Aspecto geral da espécie *Solanum cernuum.* **(a)** Individuo de *S. cernuum.* **(b)** inflorescências. Campus da USP/Ribeirão Preto. Fonte: A autora.

A espécie é comumente conhecida como "panaceia", nativa do Brasil, sendo encontrada, principalmente, nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. O nome "panaceia" é devido ao grande número de aplicações que possui na medicina popular. Infusões de partes aéreas são utilizadas no tratamento de úlceras, lesões hepáticas, infecções de pele, como antitumoral, diurético, depurativo, antihemorrágico, antiarrítmico, para o tratamento da gonorreia e da hiperplasia prostática benigna (LORENZI, MATOS, 2008; ARAUJO et al., 2002; RODRIGUES, CARVALHO, 2001; CORREA, 1984). As raízes, utilizadas na forma de infusão ou decocção, possuem atividade diurética, depurativa e para tratamento de hemorragias (RODRIGUES, CARVALHO, 2001; CORREA, 1984).

No trabalho realizado por Alves et al. (2007) foram descritos marcadores para a identificação da espécie *S. cernuum* para a planta íntegra, triturada e para o extrato bruto. Caracteres morfológicos das folhas foram utilizados para a planta íntegra: são simples, oblonga ou elíptica; descolorida na parte abaxial; assimétria na base. Para a planta triturada, o conjunto dos tricomas foi utilizado como marcador anatômico. Um marcador macromolecular de uma sequência, com cerca de 600 pares de bases, foi determinado e depositado no *GenBank*®. Por ser uma sequência específica para *S. cernuum*, ela pode ser usada como marcador desta espécie. Ainda no mesmo trabalho de Alves et al. (2007) os flavonoides afzelina e quercetrina foram isoladas e descritos como marcadores químicos para o extrato bruto.

A atividade gastroprotetora das folhas de *S. cernuum* foi testada por Grando et al. (2008) para o extrato diclorometânico no modelo de úlcera gástrica induzida pela administração de etanol em ratos. Nas doses do extrato de 500; 1000 e 2000 mg/kg, os índices de redução da lesão ulcerativa foram de 38,2; 61,0 e 81,9%, respectivamente. Porém, quando os autores utilizaram o modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina, o extrato diclorometânico não apresentou atividade. Araújo et al. (2002) ao utilizar o extrato hidroalcóolico 60% das folhas no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina, observou inibição de 50,4% no índice médio das lesões ulcerativas na dose de 1000 mg/kg.

O extrato diclorometânico obtido das folhas de *S. cernuum* também apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/kg (LOPES et al., 2014).

Screening realizado por Oliveira et al. (2007) pelo método de difusão em ágar com o extrato metanólico das folhas de *S. cernuum* não houve inibição do crescimento microbiano de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Bouzada et al. (2009) reportaram que o extrato metanólico também não foi ativo frente as linhagens de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778).

Duzentos e quarenta e seis fungos endofíticos foram isolados e identificados nas folhas e caules de *S. cernuum*. Avaliou-se a atividade antimicrobiana de 265 extratos dos fungos isolados, sendo que 28% (18 extratos) foram ativos contra diferentes linhagens de bactérias e fungos. Todavia, nos protocolos utilizados em tal trabalho, os extratos metanólicos obtidos das folhas e caules de *S. cernuum*, na

concentração de 100 µg/mL, apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Candida albicans* ATCC 18804 apenas para as amostras coletadas durante o período de verão (VIEIRA et al., 2012).

O estudo realizado por Almança et al. (2011) demonstrou que o extrato hidroetanólico 70% das folhas de *S. cernuum*, administrado por via oral a camundongos, em estudos de toxicidade aguda e sub-crônica foi considerado seguro sendo o valor de DL₅₀ de 14,50 g/kg.

1.3 Metabólitos secundários presentes na espécie Solanum cernuum

Uma revisão dos metabólitos presentes na espécie *S. cernuum* demonstra que em triagens preliminares do extrato metanólico das folhas foram encontrados alcaloides, triterpenos e flavonoides (BOUZADA et al., 2009) e no extrato hidroetanólico, flavonoides e saponinas (ARAUJO et al., 2002). Uma série de alcanos (C25-C34), luteína e esteroides como *β*-sitosterol foram identificados no extrato diclorometânico. O extrato etanólico, quando analisado por reagentes específicos, infravermelho (IV) e por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) detectou-se a presença de glicoalcaloides, peptídeos e dissacarídeos (GRANDO et al., 2008). Nas inflorescências da espécie foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) carboidratos como a D-glucose, frutose, sorbose, mio-inositol e a sacarose (ALVES et al., 2006).

Os triterpenoides cicloeucalenona e 24-oxo-31-norcicloartanona (Figura 2) foram os principais constituintes isolados do extrato diclorometânico das folhas de *S. cernuum* com rendimentos de 7% (p/p) e 1,47% (p/p), respectivamente. Estes triterpenos foram isolados pela primeira vez no gênero *Solanum*.

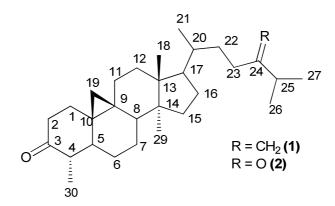


Figura 2. Estrutura de triterpenoides de *S. cernuum*: (1) cicloeucalenona/ (2) 24-oxo-31-norcicloartanona.

A ocorrência de estruturas triterpênicas do esqueleto cicloartano também é descrita nas cascas das frutas de *Musa sapientum* L. (Musaceae), popularmente conhecida por "bananeira" (AKIHISA et al., 1986). Cicloeucalenona também foi isolada das cascas de *Tinospora crispa* (Menispermaceae) (ONDEYKA et al., 2005; KONGKATHIP et al., 2002).

O composto 24-oxo-31-norcicloartanona, isolado das folhas de *S. cernuum*, apresentou atividade significativa e seletiva contra linhagem de células tumorais de pulmão (NCI-H460) com total inibição do crescimento na concentração de 1,10 µg/mL (GRANDO et al., 2008). A cicloeucalenona apresentou, *in vitro*, pequena alteração sobre o controle da força atrial direita e esquerda, produzindo leves efeitos cardiotônicos (KONGKATHIP et al., 2002).

Lopes et al. (2014) reportaram a atividade analgésica e anti-inflamatória do dos triterpenos cicloeucalenona e 24-oxo-31-norcicloartanona, isolados a partir do extrato diclorometânico das folhas de *S. cernuum*. Ambos compostos isolados diminuiram a expressão de ciclo-oxigenase (COX-2) explicando, em parte, o mecanismo de ação de tais compostos no efeito anti-inflamatório.

Os alcaloides, cernumidina e isocernumidina, (Figura 3) foram isolados do extrato etanólico das folhas de *S. cernuum* assim como compostos fenólicos conhecidos: flavonoides glicosídicos (hiperina, quercitrina e afzelina) e ácido caféico (LOPES et al., 2011).

Figura 3. Estrutura dos alcaloides de *S. cernnum*: (1) cernumidina (2) isocernumidina.

O alcaloide cernumidina, obtido das folhas de *S. cernuum*, inibiu a produção de interleucina-8 por células HT-29 de carcinoma colorretal. Esse fato pode orientar futuras pesquisas na prevenção e no tratamento de câncer gástrico (LOPES et al., 2011).

1.4 Atividade gastroprotetora

A úlcera gástrica representa uma das mais importantes doenças do sistema digestório, afetando cerca de 10 à 15 % da população mundial (PAGUIGAN et al., 2014). A úlcera caracteriza-se pela ruptura da integridade da mucosa gástrica ou duodenal, ocorrendo no local onde o epitélio da mucosa é exposto a fatores agressivos (KUMAR et al., 2011). São causadas principalmente por um desequilíbrio entre fatores agressivos e fatores protetores endógenos no estômago, tais como a secreção de ácido-pepsina, integridade da barreira mucosa, secreção de muco, supressão de produção de prostaglandina entre outros (FREITAS et al., 2008). Outros fatores também estão associados na ocorrência de úlcera péptica, incluindo, consumo de álcool, uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), infecções por *Helicobacter pylori*, tabagismo e histórico familiar (MOTA et al., 2009).

A acetilcolina (neurotransmissor parassimpático vagal) estimula a secreção de pepsinogênio pelas células pépticas, de ácido clorídrico pelas células parietais e de muco pelas células secretoras da mucosa. A gastrina e a histamina também estimulam acentuadamente a secreção de ácido pelas células parietais. Já as prostaglandinas, produzidas localmente, estimulam a secreção de muco e bicarbonato. Os íons bicarbonatos secretados agem juntamente com o muco

protegendo a mucosa contra o suco gástrico. Caso haja distúrbios nessas funções secretoras pode-se gerar a úlcera (GUYTON, HALL, 2011; RANG et al., 2012).

O tratamento farmacológico está relacionado com a utilização de medicamentos que agem por algum dos seguintes mecanismos: a) os inibidores da bomba de prótons H⁺/K⁺ ATPase: são os supressores mais potentes da secreção de ácido gástrico (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, entre outros); b) os antagonistas dos receptores de H₂: inibem a secreção ácida por competir com a histamina pelos receptores H₂ nas células parietais (ranitidina, cimetidina, nizatidina, famotidina); c) os antiácidos: atuam neutralizando o ácido gástrico, sendo considerados adjuvantes no tratamento das úlceras (sais de magnésio e de alumínio); d) os citoprotetores: protegem a mucosa gástrica (quelato de bismuto, sulcrafato, carbenoxolona, misoprostol) (RANG et al., 2012).

No entanto, a maior parte destes fármacos estão associados com efeitos secundários indesejados (SHIRODE et al., 2008), além de haver uma grande proporção nos casos de recorrência da úlcera quando o tratamento é interrompido (KATSURA et al., 1997). Estudos afirmam que o uso prolongado dos inibidores da bomba de prótons como, por exemplo, o omeprazol, pode levar à diminuição na absorção da vitamina B12, importante para o desenvolvimento hormonal e para a formação dos glóbulos vermelhos (hemácias). Clinicamente os efeitos causados pelo déficit da vitamina B12 podem se manifestar como demência, problemas neurológicos, anemia e outras complicações, às vezes irreversíveis (LAM et al., 2013).

Diante do exposto, uma alternativa para o tratamento com fármacos sintéticos seria a utilização de derivados de drogas vegetais. Diversas substâncias de origem vegetal, entre elas, flavonoides, alcaloides e triterpenos têm apresentado atividade antiúlcera (NASCIMENTO et al., 2015; BABU et al, 2010; JORGE et al., 2004; HIRUMA-LIMA et al, 1999).

1.5 Atividade citotóxica

A busca por substâncias com atividade anticancerígena é destacada como uma das prioridades da química medicinal. No entanto, a descoberta de substâncias antitumorais seletivas para as células afetadas permanece como um objeto elusivo na pesquisa do câncer. Consequentemente, novas abordagens são necessárias

para a busca de compostos a serem testados como drogas anticancerígenas (CRAGG et al., 2014; PISCO et al., 2006).

Os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina, extraídos de *Catharanthus roseus*, por exemplo, foram descobertos e desenvolvidos para o tratamento de cânceres, atuando como eficazes agentes quimioterápicos. Outros compostos bioativos, derivados do metabolismo secundário das plantas, também foram isolados como lideres promissores para o desenvolvimento de drogas anticânceres como, por exemplo, etoposida, taxanos (paclitaxel, docetaxel), campotecina e glicoalcaloides (CRAGG, et al., 2009; GUERRA, NODARI, 2004, CHAM, 1994).

Estudos a cerca da atividade antitumoral de extratos e subtâncias isoladas a partir de produtos naturais têm se destacado na literatura. Atualmente há um grande número de compostos interessantes provenientes de produtos naturais que estão sendo investigadas para a atividade citotóxica (CRAGG et al., 2014; MARTIN et al., 2013). Até mesmo compostos ativos isolados, testados e utilizados para tratamento de outras enfermidades, têm sido triados para a atividade anticâncer, sendo essa estratégia denominada *The drug repurposing strategy* (CRAGG et al., 2014; NEWMAN et al. 2002).

"Panaceia" é popularmante utilizada como antitumoral podendo ser uma espécie potencial na produção de compostos que atuem nessa atividade.

1.6 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é a condição clínica mais frequente da próstata a partir da sexta década de vida, sendo a neoplasia benigna mais comum entre os homens. Devido ao aumento da expectativa de vida, a HPB tem sido cada vez mais identificada. Estima-se que um em cada dez homens no Brasil desenvolverá um quadro histológico de HPB ou carcinoma prostático (SAÚDE DA PROSTATA, 2015; CARDOSO et al., 2000).

Em um indivíduo normal, a próstata apresenta dois componentes: o epitélio glandular arranjado em ácinos e ductos, e o estroma formado principalmente por fibras musculares lisas associadas a tecido conjuntivo, com marcante presença de fibras colágenas e elásticas, fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos (DEERING et al., 1994; BARSTCH et al., 1979; McNEAL, 1978). No entanto, não se sabe ao

certo se o principal elemento envolvido no aumento da próstata é de origem epitelial (ductos ou alvéolos prostáticos) ou da proliferação de células do estroma.

O crescimento tumoral benigno na HPB resulta na formação de arranjo nodular (BILLIS, 1997). Essa condição histológica da próstata é frequentemente associada à obstrução da uretra que se associa a sintomas do trato urinário inferior, como, por exemplo, fluxo urinário baixo, urgência em urinar, esvaziamento vesical incompleto, noctúria, entre outros que afetam a qualidade de vida dos pacientes (FRANCO-SALINAS et al., 2010).

A avaliação inicial da HPB deve ser feita em todos os pacientes com sintomas sugestivos de obstrução urinária. Os critérios obrigatórios para o diagnostico são: história clínica compatível com HPB, quantificação dos sintomas por meio do "International Prostate Symptom Score" (IPSS) e pela avaliação do "Quality of Life" (QoL), exame físico abdominal e toque retal e análise do "Prostate Specific Antigen" (PSA) (AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION, 2003).

O tratamento para os pacientes portadores de HPB visa o alívio dos sintomas do trato urinário, em especial os sintomas obstrutivos. O tratamento inicial, na maioria dos pacientes, é realizado com drogas bloqueadoras dos receptores α_1 -adrenérgicos, que objetivam reduzir o tônus muscular da próstata (atuam sobre o músculo liso (estroma) – componente hidrodinâmico). Outra classe de medicamentos utilizada são os inibidores da 5-alfa-redutase, que tem como objetivo reduzir o volume prostático (atuam sobre a glândula – componente mecânico). O tratamento cirúrgico representa a forma de abordagem quando ocorre falha do tratamento clínico ou quando estiverem presentes complicações relevantes da HPB (LEPOR, 2006; EMBERTON et al., 2003; GORMELY et al., 1992).

Solanum cernuum é popularmente utilizada para prevenção e tratamento da HPB. No entanto, não há nenhum relato na literatura comprovando tal efeito por essa espécie. Sendo assim, selecionamos cultura primária de HPB para testarmos tal atividade.

1.7 Angiogênese

Angiogênese é a formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais. Sua ocorrência é essencial para o crescimento de tumores e para a formação de metástase (FOLKMAN, 1971).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um polipeptídeo ligante de heparina derivado de plaquetas, que atua como um agente mitógeno específico para as células endoteliais, possuindo importante papel na regulação da angiogênese tumoral (ZHU et al., 2009; WALTENBERGER, 2009). O VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração, produção de óxido nítrico, permeabilidade de células endoteliais, além de proteger o endotélio da apoptose (ABDOLLAHI et al., 2003).

Inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos para atingir as células endoteliais e bloquear a angiogênese do tumor, uma vez que essas células são menos propensas a acumular mutações que lhes permitiriam desenvolver resistência aos medicamentos (FOLKMAN, 1995). Os inibidores da angiogênese são divididos em duas classes: diretos e indiretos. Os primeiros atuam impedindo as células endoteliais de responder a vários estímulos através do bloqueio da expressão ou da ativação dos receptores dos fatores pró angiogênicos nessas células, bloqueando-os. Como, por exemplo, pode-se citar o receptor para VEGF. Os inibidores indiretos interferem na comunicação pró angiogênica entre as células tumorais e as células endoteliais. Tal efeito inibitório indireto pode ocorrer por inibição da expressão de fatores angiogênicos como o VEGF no tumor, entre outros (FOLKMAN, 2005).

A endostatina, um fragmento C-terminal do colágeno XVIII, localizada na matriz subendotelial de vasos sanguíneos (CHANG et al., 1999) é um potente inibidor direto endógeno da angiogênese podendo induzir a apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (O'REILLY et al., 1997; SCHMIDT et al., 2004). É, portanto, considerada uma substância antitumoral que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos. As ações da endostatina têm sido verificadas em diversos tumores sólidos como bexiga e próstata (KIKUCHI et al., 2004; TATYANA et al., 2007).

A invasão tecidual e a angiogênese são processos diferentes, porém, estão intimamente relacionados e exigem a degradação da matriz extracelular e da membrana basal através de proteases (FOLKMAN et al., 1989). A cooperação de metaloproteinases (MMPs) na degradação da membrana basal do endotélio vascular e matriz extracelular cria uma passagem por estas barreiras físicas para a formação de novos capilares, assim como contribui para a invasão das células tumorais e

metástase (KLEINER, STELER-STEVENSON, 1999). As MMPs são ativadas por pró-enzimas, hipóxia e acidose e através da degradação da matriz extracelular liberam fatores pró-angiogênicos (RUNDHAUG, 2005).

De forma simplificada, podemos dizer que a angiogênese é um processo de várias etapas que envolvem o desequilíbrio de fatores pró e anti angiogênicos, bem como interações com a matriz extracelular. Compostos que atuam na inibição da angiogênese podem ser considerados importantes agentes inibidores da proliferação do câncer.

1.8 Atividade antimicrobiana

Entre as ações terapêuticas das plantas medicinais, a pesquisa por atividade antimicrobiana têm se destacado frente às altas taxas de mortalidade existentes e a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (PINTO, 2010; ANTHONY et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2008). As plantas são de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, proporcionando grandes chances de se obter protótipos devido a sua diversidade de constituintes (CRAGG et al., 2014; SILVA et al., 2007).

Como em outras áreas de descoberta de fármacos, há duas fontes de antibióticos: produtos naturais e compostos sintéticos. Antibióticos provenientes de fontes naturais geralmente têm complexas estruturas com grupos funcionais bem destacados, possibilitam o máximo de interações moleculares com o alvo e muitas vezes atuam de forma seletiva nos patógenos não sendo tóxico para o hospedeiro. Por outro lado, antibióticos de origem sintética têm contribuído de forma menos significativa como fonte de protótipo, podendo-se citar as sulfonamidas, quinolonas e oxazolidinonas (TAKAHASHI et al., 2008; SINGH, BARRET, 2006).

Os trabalhos publicados na literatura sobre determinação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais são focados na utilização de extratos vegetais (FARJANA et al. 2014; RODINO et al., 2014), óleos essenciais (DIVYA et al., 2014) ou compostos isolados, como alcaloides (SINGH, SHARMA, 2013), flavonoides (AKHAVAN et al.; 2015; OMOSA et al., 2014), lactonas sesquiterpênicas (LIN et al., 2003), diterpeno (OMOSA et al., 2014; EL-SEEDI et al., 2002), triterpenos (KATERERE et al., 2003), entre outros.

Estima-se que 60% dos antitumorais e antimicrobianos que estão no mercado, ou sob triagem clínica, sejam de origem natural (YAN et al., 2013; NEWMAN, CRAGG, 2012).

A espécie *S. cernuum* é popularmente utilizada para o tratamento da gonorreia e não há artigos na literatura para confirmação de tal atividade.

1.9 Secagem por spray dryer

A secagem por *spray dryer*, também conhecida como secagem por aspersão, nebulização ou atomização; é amplamente utilizada em processos produtivos na obtenção de produtos para consumo humano, como alimentos, cosméticos e principalmente farmacêuticos, pois, de maneira geral, confere maior estabilidade ao material, além de diminuir o crescimento de micro-organismos, assim como a degradação física e química das substâncias. Isto ocorre, pois os produtos secos possuem baixa umidade, o que diminui os riscos de contaminação (MASTERS, 1991; CAL, SOLLOHUB, 2010).

A técnica de secagem por *spray dryer* consiste em bombear a amostra para dentro da câmara de secagem onde será aspergida em gotículas. Dentro da câmara, as gotículas formadas entram em contato com ar quente e seco o qual é capaz de absorver toda umidade dando origem ao pó que é arrastado da câmara para um sistema coletor (Figura 4). A secagem ocorre rapidamente devido à sua grande superfície de contato com o ar quente e seco, ocorrendo em poucos minutos (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010). Tal técnica é extremamente rápida, permitindo um baixo tempo de contato dos materiais com o ar quente, pois em questões de segundos, já é possível obter o produto seco. Assim, é possível utilizá-la para materiais termosensíveis, como materiais de origem biológica, entre eles extratos e produtos oriundos de plantas (FREITAS et al., 2010).



Figura 4. Spray dryer de escala laboratorial modelo LM MSD 0.5 (Labmaq do Brasil Ltda., Brasil): 1) chave geral 2) controle do aquecimento; 3) controle de bombeamento de líquido; 4) câmara de secagem; 5) separador de pó; 6) indicador de temperatura de saída; 7) frasco coletor (LABMAQ, 2003).

Apesar de simples, a secagem por *spray dryer* é influenciada por diversas variáveis que afetam diretamente a qualidade do produto obtido. As variáveis existentes podem estar relacionadas ao produto de entrada como viscosidade, tensão superficial, presença ou não de excipiente e seu tipo, concentração da amostra, o tipo de solvente da amostra. Além disso, existem as variáveis do equipamento que podem influenciar tanto a qualidade do produto final quanto a qualidade do processo, entre elas destaca-se a temperatura de saída e de entrada do ar de secagem, a vazão da amostra que entra na câmara de secagem, o tipo de bico atomizador e a vazão do gás de secagem (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010; LIST, SCHMIDT, 1989).

O uso de aditivos de secagem (excipientes) é uma prática comum podendo ser utilizados diversos tipos, como por exemplo, amidos, açúcares (maltodextrina e lactose), polióis (sorbitol e manitol), celulose, dióxido de silício coloidal, para a secagem de extratos vegetais. A seleção e o uso adequado de adjuvantes é uma fase de fundamental importância visto que determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo inclusive afetar as características de biodisponibilidade do pó obtido (COUTO et al., 2011; OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

1.9.1 Planejamentos experimentais

Os planejamentos fatoriais são ferramentas valiosas quando se pretende estudar muitas variáveis (fatores) de um processo, pois permite a obtenção de um grande número de informações utilizando menor número de experimentos. Assim, antes de iniciar uma pesquisa, deve-se analisar cuidadosamente as variáveis escolhidas, principalmente, quando o objeto de estudo são processos nos quais se pretende fazer um aumento de escala (FERREIRA et al, 2007; PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

Há planejamentos fatoriais multivariáveis que estudam diversos fatores simultaneamente e os planejamentos univariáveis que estuda uma variável por vez mantendo as outras fixas. O método multivariado apresenta vantagens como, por exemplo, menor tempo requerido para análise e possibilidade de avaliação das interações entre as variáveis, fato este de grande importância, pois muitas vezes a combinação entre as variáveis é que gera os melhores resultados (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

O planejamento experimental multivariável é muito utilizado quando há diversos fatores a serem estudados e, principalmente, para triagem dos fatores com o objetivo de verificar qual deles possui maior impacto na resposta. Tal planejamento possibilita reduzir o número de fatores a serem investigados nos próximos planejamentos (MYERS, 2003; LI, 2003).

Dentro dos planejamentos fatoriais alguns conceitos são importantes:

- ✓ Fator: pode ser entendido como cada variável do processo ou do estudo.
- ✓ Nível: é definido como as condições de trabalho dos fatores, geralmente é classificado como nível alto (+1); nível médio (0) e nível baixo (-1).
- ✓ Resposta: característica do processo que quer ser analisada em função dos fatores.
- ✓ Modelo estatístico: equação gerada através dos efeitos de cada fator na resposta.

Os planejamentos são representados por uma notação exponencial (Xⁿ), onde a base, X, indica o número de níveis em estudo e o expoente, n, o número de fatores a serem estudados (MACHADO, 2011).

A escolha do tipo de planejamento que melhor se adapta às condições experimentais do estudo é um fator muito importante. O planejamento do tipo Box-Behnken é bastante indicado quando se quer utilizar uma metodologia de superfície de resposta num estudo de três fatores em três níveis (BOX et al., 1978). Este planejamento possui características estatísticas desejáveis com apenas uma fração do total de ensaios requeridos em um planejamento fatorial completo de três níveis. Os níveis de seus fatores se encontram no meio das arestas e no centro quando se observa sua representação gráfica sendo que a geometria deste planejamento sugere o formato de uma esfera dentro da região experimental, como esquematizado no cubo da Figura 5 (NIST/ SEMATECH, 2014; MYERS, 2003)

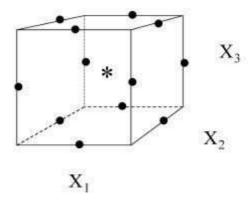


Figura 5. Esquema gráfico do planejamento Box-Behnken com três variáveis e ponto central (MYERS, 2003).

Na metodologia de superfície de resposta, quando se trabalha com três níveis pode se obter regressões com termos quadráticos e, além disto, para cada efeito existe um componente linear e um quadrático, possibilitando uma maior área e componentes de análise (BOX et al., 1978).

Os planejamentos experimentais como o Box-Behnken possuem grandes vantagens: podem determinar qual fator influencia mais em uma determinada resposta e dizer quais são as possíveis interações entre os fatores. É possível obter tais respostas com um número reduzido de experimentos e com menor tempo de análise.

1.9.2 **Desejabilidade**

Quando se tem um processo que possui múltiplas respostas e que cada uma tem sua influência na qualidade final, tal processo pode ser otimizado pelo método da função de desejabilidade (NIST/ SEMATECH, 2014).

Derringer e Suich (1980) propuseram um dos mais conhecidos métodos de função desejabilidade onde se obtém uma desejabilidade global utilizando a média geométrica das respostas normalizadas, conforme demonstrado na Equação 1:

$$D = [d_{1}.(y_{1}).d_{2}.(y_{2}).d_{3}.(y_{3}).d_{4}(y_{4})....d_{n}.(y_{n})]^{1/n}$$
 Equação 1

Sendo 'n' o número de respostas do sistema.

Ainda, para refletir a possível diferença de importância de cada resposta, a qual é estabelecida pelo pesquisador, atribuem-se pesos relativos para cada resposta variando-se de 0, para a menor importância, até 1 para a máxima importância, e quanto mais perto de 1, melhor.

Existem diferentes tipos de função de desejabilidade. A classificação é feita baseada no objetivo da resposta, a minimização, a maximização ou atingir um determinado valor alvo. Para cada objetivo, precisa-se definir o alvo e/ou o limite inferior e superior. Exemplo, na minimização determina-se um valor alvo, assim respostas abaixo deste valor possuem um y próximo de 1, respostas acima deste valor ficam próximas de zero, ou seja, não desejável, pois neste tipo quanto menor o valor, mais desejável é a resposta.

A idéia básica da função de desejabilidade é transformar múltiplos problemas em um único, através de transformações matemáticas, facilitando a resolução da situação.

Os extratos secos de plantas têm sido desenvolvidos e estudados com a finalidade de padronização dos teores de marcadores e/ou substâncias ativas e para se obter estabilidade físico-química e microbiológica (VEHRING et al., 2007).

Considerando que *S. cernuum* é amplamente utilizada na medicina popular e que há poucos trabalhos corroborando tais usos, propomos, a partir da obtenção de diferentes extratos, frações e compostos isolados das folhas avaliar as atividades gastroprotetora, antimicrobiana e citotóxica relatadas na medicina popular para essa espécie. Objetivamos também, a partir do extrato líquido hidroetanólico, estudar e

otimizar o processo de secagem para obtenção do extrato seco das folhas de *S. cernuum* por *spray dryer* visando uma futura padronização do extrato e produção em escala industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo fitoquímico da espécie *Solanum cernuum*; investigar as atividades gastroprotetora, citotóxica e antimicrobiana do extrato, frações e compostos majoritários isolados das folhas de *S. cernuum* e obter o extrato seco por *spray dryer*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter o extrato hidroetanólico e em acetato de etila das folhas de S. cernuum secas e trituradas;
- ✓ Fracionar os extratos obtidos utilizando diferentes técnicas cromatográficas, visando o isolamento dos compostos majoritários;
- ✓ Quantificar os compostos majoritários isolados do extrato hidroetanólico (ESC) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- ✓ Obter o óleo e/ou hidrolato a partir das folhas de S. cernuum e investigar sua composição;
- ✓ Avaliar a atividade gastroprotetora in vivo do extrato ESC e compostos isolados:
- ✓ Realizar ensaios in vitro dos extratos, frações e de compostos isolados para a atividade antimicrobiana;
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica in vitro do extrato e/ou frações e compostos isolados frente às linhagens MCF-7 (carcinoma de mama), MCF-10 A (células da mama normais), B16F10 (melanoma), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), MO59J (glioblastoma humano) e GM07492A (fibroblastos);

- ✓ Avaliar a proliferação celular cultura de células primárias de músculo liso de hiperplasia próstatica benigna (HPB) e o efeito indutor de apoptose frente ao extrato ESC e alcaloide isolado do extrato ESC e alcaloide.
- ✓ Avaliar o potencial do extrato ESC, fração butanólica e do alcaloide isolado na inibição da angiogênese;
- ✓ Obter o extrato seco, a partir do extrato hidroetanólico das folhas de S. cernuum por spray dryer e estudar influências dos parâmetros envolvidos neste processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal, extratos e frações

Foram coletados 15 kg de folhas de *S. cernuum* no município de Teresópolis, Bairro Vargem Grande (Rio de Janeiro/ Brasil) no mês de Janeiro de 2012. A autorização de coleta junto ao SISBio-ICMBio foi obtida sob n. 18458-1. A autorização de Acesso ao Patrimônio Genético (Pesquisa Científica), solicitada no CNPq, foi deferida sob o número de protocolo 010221/2012-3. Uma exsicata da espécie foi depositada como documento taxonômico no herbário do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP sob o número de registro SPFR: 15118, sendo identificada pelo Prof. Dr. Milton Groppo Júnior da Faculdade de Filosofia e Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP-USP. As folhas coletadas foram secas em estufa de ar circulante (45°C) produzindo uma massa de 5 kg de material seco. Esse foi submetido à moagem em moinho de facas e posteriormente armazenado em freezer (-20°C) para posterior utilização.

Dois quilos do pó das folhas foram submetidos ao processo extrativo por maceração seguido percolação em solução hidroetanólica 7:3 (v/v) utilizando-se um percolador de 35 L à temperatura ambiente (28°C). O solvente foi percolado e renovado a cada 48 h por duas semanas consecutivas. As soluções hidroetanólicas obtidas foram filtradas, concentradas em rotaevaporador a vácuo e em seguida liofilizadas para se obter o extrato hidroetanólico bruto das folhas de *S. cernuum* (ESC) (325,74 g).

Cem gramas do extrato ESC obtido foi particionado com solventes orgânicos (hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH)) em sequência, originando as frações FHex, FDCM, FAcOEt e FBuOH, respectivamente. Para isso, o extrato foi solubilizado, primeiramente, em MeOH:H₂O (6:4, v/v) e, após a partição com hexano parte do metanol foi evaporado para continuidade do processo. As partições foram realizadas com três extrações de 300 mL de cada solvente orgânico. As frações orgânicas foram concentradas a vácuo e a fração final aquosa (FAq) foi liofilizada.

A partir de 1 kg de folhas secas e trituradas preparou-se, pelo processo de maceração estática, o extrato em acetato de etila (EAE). O solvente extrator foi

renovado por 3 dias consecutivos. Os volumes obtidos foram rotaevaporados para a obtenção do extrato bruto EAE.

3.2 Cromatografia em camada delgada comparativa e perfil cromatográfico em CLAE-UV

Os extratos e frações foram analisados por cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) em cromatoplacas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck[®]). Para as frações (FHex, FDCM e FAcOEt) e extrato em acetato de etila (EAE) utilizou-se como fase móvel a mistura de Hex:AcOEt (8:2, v/v). Para o extrato hidroetanólico (ESC), FBuOH e FAq utilizou-se a fase móvel: MeOH:AcOEt:AcOH (8:2:0,06 v/v/v) nas análises iniciais. As cromatoplacas foram observadas em luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de 254 e 366 nm e reveladas com anisaldeído e posterior aquecimento, Reagente de Dragendorff e/ou solução de H₂O:H₂SO₄ (90:10).

Os perfis cromatográficos do extrato ESC e frações em AcOEt e BuOH foram obtidos em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca *Waters*[®], com sistema de bombas binário (modelo 1525), injetor automático (modelo 2707), detector de arranjo de diodos (modelo 2998), controlador de temperatura e sistema controlador computadorizado - *software Empower* 3.

As análises foram realizadas usando coluna analítica *Synergi Polar-RP* de 4,6 mm de diâmetro interno (di) x 150 mm de altura (h) (Phenomenex[®]) com tamanho das partículas da coluna e pré-colunas de 4 µm. Como eluentes da fase móvel foram utilizados água com 0,1% de ácido fórmico (pH = 3) na bomba A e acetonitrila (MeCN) na bomba B. O gradiente de polaridade da fase móvel foi iniciado com 15% de B, elevando-se de 15-35% em 15 min., em seguida de 35-95% de B até 17 min., permanecendo em 95% de B até 20 min., seguidos por mais 2 minutos para retorno das condições iniciais.

O volume de 10 µL das amostras foi injetado no sistema cromatográfico. A vazão utilizada foi de 1,5 mL/min e temperatura de 30℃. A detecção do UV-DAD foi registrada, inicialmente, em três comprimentos de onda: 210, 257, 324 nm.

3.3 Fracionamento dos extratos durante o estágio no exterior

O fracionamento dos extratos e frações obtidas foi realizado no National Center for Natural Products Research (NCNPR), University of Mississippi, Oxford, USA, sob a orientação do Prof. Dr. Ikhlas Khan e na empresa Ironstone Separations, Oxford, USA, sob orientação do Prof. Dr. James McChesney no período de 04 de abril a 04 de outubro de 2013. Para o fracionamento, diversas técnicas foram utilizadas, tais como: partições com solventes orgânicos, digestões, cromatografias em coluna clássica com sílica de fase normal e reversa, recristalizações e, principalmente, cromatografia de alto desempenho preparativa. Nessa última técnica foram utilizadas colunas que permitem a injeção de grande massa de amostra obtendo-se resolução e eficiência nas separações. Os tamanhos das fases estacionárias das colunas preparativas eram: 2,54 cm (di) x 45 cm (h) (denominadas colunas de 2,54 cm) e colunas de 7,62 cm (di) x 50 cm (h) (denominadas colunas de 7,62 cm) empacotadas com sílica *Luna* (C₁₈), 10 µm, 100 A° (Phenomenex ®) ou com sílica Kromasil, 10 µm, 60 A° (Merck®). As colunas com 2,54 cm de diâmentro suportam pressões de até 700 psi chegando a ter 16000 pratos teóricos por metro (N/m) e com volume da coluna (VC) de 173 mL. A vazão utilizada nessas colunas foi de 20 mL/min obtido por duas bombas Shimadzu (LC-10AS) acopladas. As colunas com 7,62 cm de diâmentro, com 20000 N/m (pratos teóricos), suportam pressões de até 15000 psi, podendo-se utilizar vazão de 250 mL/min obtido por uma bomba modelo Prep 250. Na Tabela 1 resumem-se as especificações das colunas utilizadas.

Tabela 1. Especificações das colunas preparativas.

Colunas	Massa de sílica empacotada (kg)	Pressão máxima (psi)	Vazão (mL/min)	Volume da coluna (L)	Massa de amostra (g)
2,54 cm - FN	0,085	700			
2,54 cm - FR	0,100	700	20	0,173	até 10
7,62 cm - FN	1,0	15000	250	2	até 200
7,62 cm - FR	1,4	13000	250	2	al c 200

FN: fase normal (Kromasil) / FR: fase reversa (Luna)

3.3.1 Preparação dos solventes para as fases móveis

A seguir apresenta-se a descrição de fases móveis utilizando a representação 'w/a' que indica o acréscimo de água (H₂O) e ácido acético (HCOOH) ao solvente preparado, previamente, para posterior acréscimo de outro(s) solvente(s). As concentrações adicionadas variaram de 1-3% para a água e de 0,1-1% para o ácido. A H₂O e o AcOH foram adicionados a solventes como acetato AcOEt e éter metilterc-butílico (MTBE) sendo necessário agitação do sistema e posteriormente remoção do resíduo não incorporado.

3.3.2 Análises cromatográficas

Os extratos e frações foram analisados por cromatografia de camada delgada comparativa em cromatoplacas de vidro (HPTLC - High performance thin layer chromatography) de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®). Para o extrato EAE e frações apolares obtidas de fracionamentos em colunas (descritas em tópicos a seguir) utilizou-se como fase móvel diversas proporções da mistura de solventes w/a(1:0,1) MTBE:Hep e w/a(3:1)AcOEt:Hep. Para o extrato ESC e outras frações utilizadas seguintes fases polares foram as móveis: w/a(3:1)AcOEt;w/a(3:1)AcOEt:MeOH (95:5 v/v); AcOEt:H₂O:MeOH:AcOH (100:18:14:0,1 v/v/v/v) (demoninada Reb C) e RebC:H₂O:MeOH:AcOH (100:10:10:0,5 v/v/v/v) (denominada Reb N). As cromatoplacas foram observadas em luz ultravioleta nos comprimentos de 254 e 366 nm e reveladas com anisaldeído, solução de H₂O:H₂SO₄ (90:10 v/v) e/ou Reagente de Dragendorff.

No NCNPR o cromatógrafo (CLAE) utilizado para a obtenção dos perfis analíticos era da marca *Agilent* (modelo 1100 Series), equipado com quatro bombas (*QuatPump* – G1311A), degaseificador (G1322A), compartimento para coluna com forno (COLCOM – G1316A), injetor automático (ALS – G1313A), detector de UV (VWD – G1314A) e sistema controlador computadorizado com *software Agilent chemstation*.

As análises foram realizadas usando coluna analítica *Synergi Polar-RP* 4,6 mm (di) x 150 mm (h) (Phenomenex[®]) com diâmetro das partículas da coluna e pré-colunas de 4 μ m ou coluna analítica *Luna* (C₁₈) de dois tamanhos: 4,6 mm (di) x 250 mm (h) e 4,6 mm (di) x 50 mm (h), ambas Phenomenex[®] com diâmetro das

partículas de 5 µm. Como eluentes da fase móvel utilizou-se na bomba A água com 0,01M de ácido fosfórico (H_3PO_4) (pH=3) e na bomba B MeCN ou MeOH ambos grau CLAE (Merck $^{®}$). A eluição foi realizada no modo isocrático ou por gradiente, dependo da amostra analisada. O fluxo utilizado foi de 1,5 mL/min na temperatura de 30° C. Os comprimentos de onda para obtenção dos espectros foram de 257 e 324 nm.

Os extratos e frações foram fracionados conforme o fluxograma descrito na Figura 6.

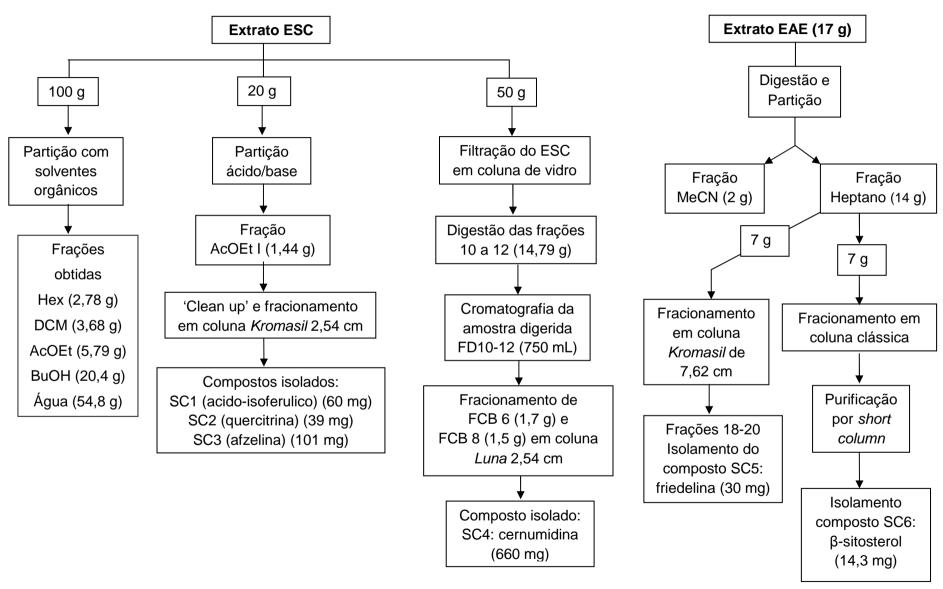


Figura 6: Fluxograma dos fracionamentos realizados com os extrato e frações.

3.3.3 Partição ácido/base do extrato ESC

Vinte gramas do ESC foram solubilizados em 400 mL de solução de HCI (1N) (pH =2). Observou-se a formação de precipitado que foi removido por filtração em papel de filtro. Em seguida o filtrado foi particionado utilizando AcOEt (3 x 200 mL). Essa fração foi concentrada em rotaevaporador a vácuo e seca em estufa a vácuo sendo denominada fração AcOEt I. A fase aquosa resultante foi baseificada utilizando-se NaOH (6M) (pH=12) e particionada novamente com AcOEt (3 x 200 mL) originando a fração AcOEt II. A fase aquosa final foi neutralizada com HCI (6N) (pH=7) concentrada em rotaevaporador *Buchi*[®] e seca em estufa a vácuo. Todas as frações obtidas foram analisadas por HPTLC.

3.3.3.1 Fracionamento da fração AcOEt I

A fração AcOEt I quando analisada por HPTLC demonstrou conter ao menos três compostos de interesse, entre eles um composto com mesmo fator de retenção (Rf) que a quercitrina, comparando-se com padrão do laboratório de pesquisa (Figura 7). Substâncias com maior polaridade também estavam presentes.



Figura 7. Fração AcOEt I obtida da partição ácido/base e padrão de quercitrina (Q). FM: w/a(3:1)AcOEt:Hep (90:10); bandas observados na luz UV 254 nm circuladas, e revelação química com anisaldeído.

A fração AcOEt I foi submetida a um *clean up* para remover os compostos mais polares. Para isso, utilizou-se uma coluna de vidro 8,35 mm (di) x 270 mm (h) empacotada com 5 g de sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) (*Fisher*®) condicionada com 20 mL de w/a(3:1)AcOEt. A amostra, fração AcOEt I (1,4516 g), foi solubilizada em 2 mL de w/a(3:1)AcOEt, adicionada ao topo da coluna e eluída com 100 mL de w/a(3:1)AcOEt. Foram coletadas 10 frações com 10 mL cada.

As frações de 1 a 4 totalizaram uma massa de 1,036 g e, quando analisadas por HPTLC demonstraram conter os três compostos de interesse previamente observados (Figura 7). Sendo assim, tal massa foi selecionada para ser fracionada na coluna de alto desempenho preparativa de 2,54 cm com fase estacionária *Kromasil*.

Para aplicação das colunas de alto desempenho preparativa com sílica *Kromasil* uma composição isocrática de fase móvel, usando mistura de solventes 'w/a', foi determinada por HPTLC para obter um fator de retenção (Rf) de aproximadamente 0,15-0,20 para o(s) composto(s) de interesse. O Rf ao redor de 0,20 indica que o composto de interesse deverá eluir no segundo volume da coluna (VC). Caso necessário, especialmente para misturas complexas, duas ou mais fases móveis eram utilizadas para separar todos os compostos de interesse. Na Figura 7, anteriormente observada, pode-se constatar que os compostos apresentaram Rf de 0,075 a 0,26 na FM w/a(3:1)AcOEt:Hep (90:10) valores aceitáveis para a aplicação na coluna de alto desempenho.

A coluna *Kromasil* de 2,54 cm foi previamente equilibrada com 346 mL (2 VC) de w/a(3:1)AcOEt:Hep (90:10). As frações de 1-4 (1,036 g), obtidas anteriormente, foram reunidas e solubilizadas em 5 mL w/a(3:1)AcOEt:Hep (90:10) para ser injetada utilizando um *loop* de 8 mL. O fluxo utilizado foi de 20 mL/min. A sequência de eluição e os volumes coletados encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de eluição utilizada na coluna com fase *Kromasil* de 2,54 cm para fracionamento da fração AcOEt I e volumes coletados.

Fase móvel	Fracões	Volumes coletados por fração
I) w/a(3:1)AcOEt:Hep (90:10)	1-40	4 mL
.,	41-60	9 mL
II) w/a(3:1)AcOEt:Hep (95:5)	61-77	10 mL
, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	78-95	8 mL
III) w/a(3:1)AcOEt	96-115	10 mL
IV) Reb C	116	1000 mL
V) w/a(3:1)AcOEt:Hep (90:10)	117	200 mL

As fases móveis IV e V foram eluidas com o objetivo de limpar e regenerar a coluna, respectivamente.

As frações coletadas foram analisadas por HTPLC utilizando como fase móvel diferentes proporções de w/a(3:1)AcOEt:Hep e foram reunidas de acordo com o perfil apresentado. Desse fracionamento um derivado do ácido cinâmico (SC1) e dois flavonoides (SC2 e SC3) foram isolados e identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

3.3.4 Fracionamento do extrato ESC para isolamento de alcaloide(s)

O ESC quando analisado por HPTLC na fase móvel RebC:MeOH:H₂O (100:4:1) apresentou bandas com absorções nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (Figura 8: bandas circuladas). Quando revelado com anisaldeido (Figura 8a) apresentou três bandas majoritárias e compostos polares que ficavam retidos na origem e quando revelada com Reagente de Dragendorff (Figura 8b), apresentou coloração alaranjada para uma das bandas, podendo ser indicativo da presença de alcaloide(s).

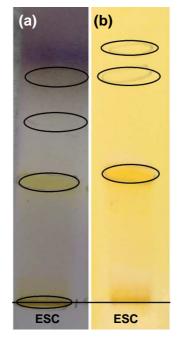


Figura 8. Perfil do ESC por HPTLC eluído na fase móvel RebC:MeOH:H2O (100:4:1). **(a)** revelação com anisaldeido, em 254 nm; **(b)** revelação com Reagente de Dragendorff, em 366 nm.

3.3.4.1 Filtração do ESC em coluna de vidro

Cinquenta gramas do ESC foram solubilizados em MeOH:H₂O (95:5) e incorporados em 100 g de sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) (*Fisher*®). Após o extrato ser incorporado na sílica essa foi seca em capela de exaustão e posteriormente em estufa a vácuo (45°C).

Em uma coluna de vidro com dimensões de 5 cm (di) x 33 cm (h) foram empacotados 200 g de sílica gel 60 seca, sobre a qual adicionou-se os 100 g de sílica previamente preparada contendo a amostra de extrato ESC.

A amostra foi eluida utilizando-se apenas duas fases móveis como descrito na Tabela 3. Aplicou-se pressão com auxílio de uma bomba de vácuo no topo da coluna para facilitar a eluição. O fluxo utilizado foi de aproximadamente 50 mL/min.

	Tabela 3. Fases móveis utilizadas	para filtração de 50	q do ESC em coluna de vidro.
--	-----------------------------------	----------------------	------------------------------

Fase móvel	Volume eluído (L)	Número de frações coletadas	Volume de cada fração (L)
I) w/a(3:1)AcOEt	4	8	0,5
II)w/a(3:1)AcOEt:MeOH (50:50)	4	8	0,5

Foram obtidas 16 frações com os rendimentos descritos na Tabela 4. O total de massa obtida foi 33,41 g (66,8%).

Tabela 4. Rendimento das frações obtidas da filtração do ESC em coluna de vidro.

Frações	Massa (g)	Frações	Massa (g)
F1	1,620	F9	0,216
F2	0,435	F10	10,65
F3	1,253	F11	5,77
F4	0,767	F12	2,69
F5	0,618	F13	2,71
F6	0,439	F14	2,23
F7	0,360	F15	1,93
F8	0,175	F16	1,55

Todas as frações foram analisadas por HPTLC. Quando reveladas com anisaldeído, as frações 2 e 3 demonstraram conter o composto SC1. Esse composto foi purificado por recristalização utilizando-se MeOH e gotas de DCM. Um frasco contendo as frações, MeOH e as gotas de DCM foi vedado e aquecido a 50°C por alguns minutos. Após resfriar a temperatura ambiente o frasco foi colocado no freezer (-20°C) por cerca de 12 h. Após esse período o sobrenadante foi retirado e os cristais formados foram lavados com MeOH diversas vezes para remoção da coloração verde proveniente do extrato.

A fração 4 demonstrou conter, principalmente, SC2 e as frações 5 e 6, principalmente, SC3.

As frações 9 a 16 foram eluídas com RebC:MeOH:H₂O (100:4:1) e quando reveladas com Reagente de Dragendorff, as frações de 10 a 12 apresentaram bandas com coloração alaranjada indicativa da presença de alcaloides. As frações

15 e 16 não apresentaram a presença de compostos quando revelada na luz UV ou reveladores químicos.

3.3.4.2 Digestão das frações 10 a 12

As frações de 10 a 12, obtidas da filtração em coluna do ESC, que apresentaram perfis similares na HPTLC, foram reunidas totalizando uma massa de 19,11 g e denominada FD10-12. Após alguns testes preliminares, fez-se a digestão de 14,79 g da FD10-12 com 3 x 250 mL de H₂O destilada a 50°C sonicando por 15 minutos. Houve formação de precipitado (2,37 g) que foi removido por filtração em papel de filtro. Quando analisado por HPTLC o precipitado não apresentou compostos com absorção nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e nem bandas quando utilizado reveladores químicos.

A massa digerida em solução aquosa, quando analisada por HPTLC, apresentou perfil semelhante às frações que as originaram.

Como os alcaloides de interesse demonstravam ser compostos com alta polaridade, uma fase móvel foi desenvolvida em CLAE para analisar as frações que poderiam contê-los. Utilizou-se a coluna analítica de fase reversa *Luna* (C₁₈) (4,6 mm x 250 mm), água com 0,01M de ácido fosfórico (H₃PO₄) (pH = 3) na bomba A e MeOH na bomba B com a seguinte eluição: 13% de B mantidos por 10 min, 13-60 % de B atingido em 3 min, permanecendo em 60% por mais 4 min. Aos 17 min a concentração de B era elevada para 95% em 2 min, permanecendo nessa porcentagem por 3 min para limpeza da coluna. Aos 22 min de eluição as condições iniciais eram retornadas e mantidas por 3 min para re-equilibrio da coluna. A temperatura utilizada foi de 30°C, fluxo de 1,5 mL/min e comprimento de onda de 324 nm. A solução digerida foi analisada em tais condições cromatográficas.

A fase móvel foi desenvolvida visando utilizar posteriormente a coluna de fase reversa em escala preparativa cuja fase estacionária também era sílica C₁₈ (*Luna*[®]). Para essas colunas, a fase móvel era desenvolvida no CLAE analítico observando a eluição do composto após o segundo volume de coluna na escala analítica. Tal condição era sobreposta para a escala preparativa.

3.3.4.3 Cromatografia da amostra digerida das frações FD10-12

Um teste foi realizado com 5 mL da solução aquosa obtida da digestão de FD10-12 em um pequeno cartucho de SPE C₁₈-E (Phenomenex[®]). A eluição de diferentes fases móveis no cartucho possibilitou a obtenção de frações menos complexas. Assim, todo volume (750 mL) obtido da digestão da FD10-12 foi fracionado utilizando uma coluna de vidro (5 cm (di) x 33 cm (h)) empacotada com 287 g de sílica *Bakerbond*[®] (50 mm, 120 A), com uso de pressão para eluição da fase móvel à um fluxo de 40 mL/min. A coluna foi previamente equilibrada com 800 mL de água destilada antes da adição da amostra. A sequência de eluição e o rendimento das frações obtidas estão descritos na Tabela 5. Eluiu-se 1 L de cada fase móvel coletando-se frações de 500 mL.

Tabela 5. Sequência de eluição utilizada no fracionamento de FD10-12, frações e rendimentos obtidos utilizando coluna de vidro com fase estacionária *Bakerbond*[®].

Fase móvel	Frações	Rendimento (g)
I) H ₂ O 100%	FCB 1	5,600
	FCB 2	0,889
II) H ₂ O:MeCN (90:10)	FCB 3	0,213
	FCB 4	1,250
III) H ₂ O:MeCN (80:20)	FCB 5	0,315
	FCB 6	1,700
IV) MeCN:H ₂ O (70:30)	FCB 7	0,267
	FCB 8	1,510
V) MeOH 100%	FCB 9	0,119
	FCB 10	1,560
	Total	13,423

As frações obtidas foram analisadas por HPTLC na fase móvel Reb N e revelada com Reagente de Dragendorff. As frações que demonstraram perfis de interesse e massa para posterior purificação foram: FCB 6 e FCB 8.

3.3.4.4 Fracionamento de FCB 6 e FCB 8 em coluna de fase reversa preparativa *Luna* de 2,54 cm

As frações FCB 6 e FCB 8 foram selecionadas para serem purificadas em coluna preparativa *Luna* de 2,54 cm. Essas frações, quando analisadas em CLAE analítico, demonstraram a presença de um pico que possívelmente seria um composto de interesse eluindo após o segundo volume de coluna (4,15 mL) na coluna analítica *Luna* C₁₈. Assim, foram realizadas duas separações na coluna preparativa *Luna* de 2,54 cm: uma com a amostra FCB 6 e outra com a amostra FCB 8.

As amostras foram solubilizadas em 5 mL de água para serem injetadas no *loop* de 8 mL. Para monitorar a eluição dos compostos utilizou-se detector (*Kipp & Zonen*) no comprimento de onda de 324 nm.

A coluna foi previamente equilibrada com 173 mL da primeira fase móvel antes do início das eluições (Tabela 6). Pode-se acompanhar o perfil das subfrações pelo cromatograma que era gerado no detector. A fase móvel era alterada quando se visualizava o decaimento de um pico no cromatograma.

Utilizou-se fluxo de 20 mL/min coletando-se frações de 20 mL. As fases móveis eluidas e as subfrações coletadas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Fases móveis utilizadas na	coluna Luna de 2,54 cm.
--------------------------------------	-------------------------

Fases móveis	Subfrações coletadas	Subfrações com compostos de interesse
I) MeOH:H ₂ O:HOAc (15:85:0,1)	FCB 6: 45 frações	15 a 35 oriundas da FCB 6
	FCB 8: 25 frações	12 a 25 oriundas da FCB 8
II) MeOH:H ₂ O:HOAc(70:30:0,1)	FCB 6: 10 frações	
	FCB 8: 10 frações	
III) MeOH		

As subfrações obtidas foram analisadas por HPTLC eluida com fase móvel Reb N, observadas no UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, reveladas com anisaldeido e Reagente de Dragendorff. As subfrações 15 a 35 oriundas da fração FCB 6 e as frações 12 a 25, do fracionamento de FCB 8 apresentaram perfis

semelhantes e foram reunidas. Da reunião de tais subfrações isolou-se e identificou-se o alcaloide SC4 por RMN.

3.3.5 Fracionamento do extrato em acetato de etila (EAE)

A análise preliminar por HPTLC do EAE demonstrou compostos com absorção no UV além de bandas com coloração violeta/roxa após revelação química com anisaldeído.

Com objetivo de isolar compostos apolares, adicionou-se 250 mL de MeCN em 17 g do EAE e particionou-se com heptano (4 x 250 mL). Tais fases foram aquecidas em banho-maria (40°C) e sonicadas simultaneamente antes de serem colocadas no funil de separação para otimizar a partição. Todas as fases obtidas foram concentradas a vácuo em rotaevaporador. As fases em heptano apresentaram aspecto oleoso e foram reunidas após análise em HPTLC obtendo-se um rendimento de 82% (14 g).

O solvente w/a(1:0,1)MTBE quando misturado ao heptano mostrou melhor resolução na HPTLC para os compostos presentes na fração heptano do que quando utilizado a mistura w/a(3:1)AcOEt. Após cálculo do Rf (aproximadamente 0,2) e escolha de fase móvel, solubilizou-se 7 g da fração em heptano em uma mistura de Hep:AcOEt (7:3) que foi incorporada em 40 g de celite. O celite contendo a amostra, após ser seco em capela de exaustão foi posteriormente empacotado no cartucho de amostra.

Cerca de 1 L de cada fase móvel utilizada foi eluída primeiramente pelo cartucho de amostra com vazão de 50 mL/min, pois esse não suportava grandes pressões. Após eluição desse volume, uma válvula era alterada para que a fase móvel seguisse diretamente para a coluna *Kromasil* de 7,62 cm com fluxo de 250 mL/min.

A Tabela 7 apresenta a sequência de eluição, o volume eluído, o número de frações coletadas e os volumes obtidos de cada fração. A coluna foi previamente equilibrada com 3 L da primeira fase móvel antes de iniciar-se o fracionamento.

Tabela	7.	Sequência	de	eluição	na	coluna	Kromasil	de	7,62	cm	com	а	fração
heptano	o ob	otida da part	ição	do EAE									

Fase movél	Volume eluído (L)	Número de frações coletadas	Volume de cada fração (L)
I) Hep:w/a(1:0,1)MTBE (95:5)	4	32	0,125
II) Hep:w/a(1:0,1)MTBE (90:10)	4	32	0,125
III) Hep:w/a(1:0,1)MTBE (80:20)	4	32	0,125
IV) Hep:w/a(1:0,1)MTBE (50:50)	4	32	0,125
V) w/a(3:1)AcOEt	2	2	1
VI) w/a(3:1)AcOEt:MeOH:H ₂ O(95:4:1)	1	1	1
VII) w/a(3:1)AcOEt	2	2	1

Para eluição dos compostos mais polares foram utilizadas as fases móveis V e VI. A coluna foi armazenada na última fase móvel.

As frações coletadas foram analisadas por HTPLC utilizando mistura de Hep:w/a(3:1)MTBE em diferentes proporções. As frações foram reunidas de acordo com o perfil apresentado.

As frações 18 a 20, eluídas na primeira fase móvel, (Hep:w/a(1:0,1)MTBE (95:5)) foram reunidas e recristalizadas utilizando-se a fase móvel na qual haviam sido eluídas. Após as recristalizações, cerca de 30 mg das frações 18-20 demonstraram conter apenas um composto quando analisadas por HPTLC. Essa amostra foi submetida para análise de RMN e identificou-se o triterpeno SC5.

3.3.5.1 Fracionamento da fração heptano por coluna clássica

No Laboratório de Farmacognosia da FCFRP/USP, 7 g da fração em heptano, obtida no tópico anterior, foi submetida a cromatografia em coluna clássica empregando-se coluna de vidro de 9 cm de diâmetro e 106 cm de altura. A coluna foi empacotada com 1,37 kg de sílica gel 60 (0,060-0,200 mm, 60 Å) (*Acros Organics*®) em hexano.

A fração heptano, antes de ser adicionada a coluna, foi solubilizada em uma mistura de Hex:AcOEt (1:1) e incorporada em 4 g de sílica. Essa foi completamente

seca antes de ser aplicada na parte superior da coluna. A eluição foi realizada por gradiente conforme descrito na Tabela 8. Foram coletadas frações de 150 mL. Posteriormente, as frações foram reunidas de acordo com os perfis apresentados na CCDC utilizando-se anisaldeído como revelador (Tabela 8).

Tabela 8. Sequência de eluição e frações obtidas por coluna clássica

Fase móvel	Frações	União das	s frações e rendi	mentos (mg)
Hexano 100%	1 - 100	1 = 180	83-90 = 18	239-247 = 36
Hex:w/a(3:1)AcOEt (98:2)	110 -182	2-3 = 48	91-100 = 72	248-259 = 88
Hex:w/a(3:1)AcOEt (95:5)	183 - 244	4-14 = 9	101-107 = 71	260-293 =619
Hex:w/a(3:1)AcOEt (93:7)	245 - 257	15-17 = 3	108-109 = 10	294-301 = 57
Hex:w/a(3:1)AcOEt (90:10)	258 - 293	18-23 = 12	110-137 = 68	302-305 = 78
Hex:w/a(3:1)AcOEt (85:15)	294 - 303	24-30 = 3	138-158 = 259	306-312 =415
Hex:w/a(3:1)AcOEt (80:20)	304 - 335	31-43 = 22	159-174 = 90	313-333 =773
Hex:w/a(3:1)AcOEt (70:30)	336 - 343	44-50 =518	175-181 = 70	334-341 = 74
Hex:w/a(3:1)AcOEt (60:40)	344 - 352	51-63 = 78	182-190 = 605	342-350 =398
Hex:w/a(3:1)AcOEt (50:50)	353 - 363	62-64 = 7	191-219 = 535	350-359 =126
w/a(3:1)AcOEt (100%)	364 - 375	65-82 = 21	220-238 = 222	360-375 =315

As frações 260 a 293 (619 mg) apresentaram perfis sugestivo da presença de compostos de interesse, porém com intensa cor verde. A reunião de tais frações foi selecionada para ser purificada por *short column*.

3.3.5.2 Purificação das frações 260 à 293 por short column

Em busca de uma fase móvel para se utilizar na *short column* testou-se, em CCDC, diferentes misturas de Hex:AcOEt. Selecionou-se, após três eluições seguidas, a fase móvel Hex:AcOEt (99:1) que produziu o efeito procurado: pouco deslocamento da banda da origem

Para o fracionamento utilizou-se uma coluna com as seguintes dimensões: 1,2 cm (di) x 22 cm (h). A amostra foi solubilizada em AcOEt, adsorvida em 500 mg de sílica gel 60 (0,060-0,200 mm, 60 Å) e seca até evaporação total do solvente. A coluna foi empacotada com 5 g de sílica gel 60 previamente incorporada na fase

móvel Hex:AcOEt (99:1). A amostra foi colocada na parte superior da coluna e eluiu-se 1 L da fase móvel selecionada.

Oitenta e oito frações de 20 mL cada foram coletadas. Essas foram analisadas por CCDC na fase móvel Hex:w/aAcOEt (80:20), reveladas com anisaldeído e reunidas de acordo com o perfil apresentado.

As frações 56 a 59 (14,3 mg) apresentaram-se como um sólido cristalino. Tais frações quando analisadas por CCDC foram reunidas. A amostra foi solubilizada em clorofórmio deuterado e submetida para análise por RMN. O composto isolado foi denominado SC6.

3.4 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados

Os compostos isolados foram analisados por HPTLC ou CCDC utilizando-se diferentes fases móveis e por CLAE-UV empregando-se diferentes métodos de eluição e colunas de acordo com a polaridade dos compostos a serem analisados.

As estruturas químicas dos compostos isolados foram elucidadas Ressonância utilizando-se espectroscopia de Magnética Nuclear unidimensional de ¹H, ¹³C, DEPT e bidimensionais (HSQC e HMBC). Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Brucker–Advance DRX₅₀₀, operando em 500 MHz (RMN de ¹H e HMBC), 400 MHz (HSQC) e 125 MHz (RMN de ¹³C e DEPT-135). As amostras foram preparadas em solventes deuterados: metanol ou clorofórmio (Sigma Aldrich®). Algumas análises foram realizadas no NCNPR (EUA) e outras no Departamento de Química da FFCLRP/USP.

3.5 Quantificação dos compostos isolados no extrato ESC

Os compostos quantificados foram apenas os detectados por UV no perfil cromatográfico do extrato ESC. A quantificação foi realizada por meio de curvas analíticas dos compostos isolados.

Soluções padrões foram preparadas em seis concentrações diferentes, 5, 25, 50, 75, 100 e 200 µg/mL e analisadas em triplicata por CLAE-UV utilizando-se o método descrito no item 3.2. O comprimento de onda máximo observado no espectro de UV para cada composto isolado foi utilizado na quantificação. A partir

das áreas correspondentes foram construídas as respectivas curvas analíticas para cada composto utilizando-se os valores médios das áreas das triplicatas para cada ponto.

Para a quantificação dos compostos no extrato ESC, preparou-se uma solução do extrato na concentração de 1 mg/mL e as áreas obtidas pelos picos dos compostos majoritários foram adquiridas nos comprimentos de onda utilizados para as curvas analíticas.

3.6 Avaliação dos compostos voláteis

Cerca de 1 kg de folhas frescas de *S. cernuum* foram coletadas no mês de julho de 2014 na mesma localidade descrita no tópico 3.1. Quatrocentos gramas de folhas frescas foram trituradas em liquidificador industrial com água destilada. Esse material foi transferido para um balão de fundo redondo com capacidade para 6 L, sendo conectado ao aparelho de Clevenger e submetido a hidrodestilação por 6 h (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Esse mesmo procedimento foi realizado com 400 g de folhas coletadas, no mesmo período, de outro indivíduo da espécie *S. cernuum* presente na FCFRP/USP.

Outro teste foi realizado com 400 g do material vegetal fresco coletado no estado do Rio de Janeiro, no mês de julho, para a obtenção do hidrolato. Para isso, o material vegetal foi triturado com água e transferido para um balão de fundo redondo com capacidade para 6 L e conectado ao aparelho de Clevenger. Quando o material vegetal começou a ferver, a torneira do sistema foi aberta para coleta da água volatilizada (hidrolato). Após 4 h de coleta, o hidrolato (1,5 L) foi particionado com DCM (3 x 500 mL). A fase orgânica foi rotaevaporada utilizando-se baixa temperatura. A massa obtida foi submetida a cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) para determinar a composição dessa fração.

A análise foi realizada no Núcleo de Apoio a Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da FCFRP/USP sob responsabilidade do Prof. Dr. Noberto Peporine Lopes. Utilizou-se cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas da *Shimadzu* (modelo QP-2010). A coluna utilizada foi a DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) da *Agilent Technologies*.

Os espectros de massas foram comparados com os da biblioteca de espectrômetro (FFNSC 1.3). Para o cálculo dos índices de Kovats (IK), foram

utilizados os dados de séries homólogas de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C8 a C20 e C21 a C40) cromatografados na mesma coluna e em condições de análise iguais as utilizadas para análise da fração. Os IK calculados foram comparados com índices da literatura disponíveis no *National Institute of Standards and Technolog*-(NIST).

3.7 Tricomas das folhas de S. cernuum

As superfícies adaxial e abaxial das folhas de de *S. cernuum* apresentam grande número de tricomas. Para identificar o tipo de tricoma(s) majoritário(s) presente nas folhas essa foi coletada no campus da FCFRP/USP e observada a fresco no estereomicroscópio da marca Leica (modelo M205C) no laboratório de Botânica da mesma instituição.

3.8 Atividade gastroprotetora

3.8.1 **Delineamento experimental**

Devido ao caráter multifatorial da úlcera gástrica, existem diversos modelos experimentais para indução de lesões na mucosa gástrica, a partir de diferentes agentes, como etanol/HCI, ácido acético, administração de AINE, entre outros.

Para avaliação da atividade gastroprotetora do extrato ESC e compostos isolados foram empregados diferentes protocolos de indução da lesão com base nos mecanismos envolvidos na fisiopatologia.

3.8.2 **Animais**

Para realização dos experimentos de gastroproteção foram utilizados animais da linhagem Balb/C, machos, pesando entre 25±5g provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (dimensões: 49Cx34Lx16A cm, com área total de 1666 cm² representando 277,67 cm² para cada animal), em salas com controle de temperatura (20-24 °C), umidade natural (40-60%) e ciclos controlados (claro/escuro 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram

realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo que os protocolos foram aprovados pelo Conselho de Ética e Pesquisa no Uso de Animais da Universidade de São Paulo do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo n.12.1.104.53.5). Nos experimentos de indução de úlcera, os animais foram mantidos em jejum de no máximo 12 horas. Uma grade foi adicionada para inibir a coprofagia tendo livre acesso a água.

3.8.3 Modelo de úlcera aguda induzida por etanol/HCl e AINEs (indometacina)

Estes modelos são os mais utilizados na triagem para a investigação da atividade gastroprotetora (MIZUI, DOTEUCHI, 1983; RAINSFORD, WHITEHOUSE, 1980). Os animais (n=6) foram pré-tratados por via oral (v.o.) com omeprazol (30 mg/kg) ou ranitidina (100 mg/kg) (controle positivo para os ensaios de indução de úlcera por etanol/HCI e por AINEs, respectivamente), veículo (controle negativo, solução de Tween 80 a 2%, 10 mL/kg) e extrato ESC (100, 250 e 500 mg/kg). Na indução de úlceras por EtOH/HCI, 60 min após os tratamentos os animais receberam 0,1 mL/10 g de peso do animal de uma solução de HCl 0,3 M preparado em etanol 60% por v.o. Uma hora após a administração do agente lesivo os animais foram sacrificados com sobredosagem de pentobarbital na concentração de 20 mg/mL (dose de 0,20 mg de pentobarbital por g de peso animal) associado à uma solução de lidocaína (anestésico local) na concentração de 10 mg/mL (dose de 0,1 mg de lidocaína por g de peso animal), por via intraperitoneal (i.p.). Na indução de úlceras por indometacina, 60 min após os tratamentos, os animais receberam uma solução de indometacina 100 mg/kg de peso do animal por v.o., preparada em carbonato de sódio a 5%, em pH 7,4. Quatro horas após a administração do agente lesivo, os animais foram sacrificados. Os estômagos dos animais foram retirados e abertos ao longo da curvatura maior sendo colocados entre placas de vidro e escaneados para a obtenção das imagens digitalizadas. Tais imagens foram analisadas pelo software $Image \mathcal{J}^{\mathbb{R}}$. Para a análise estatística utilizou-se o programa Instat e software GraphPad Prism[®]. O índice de cura foi calculado em relação a área de lesão através da equação 2 a seguir:

Onde: %AL tratado: Porcentagem de área lesada do grupo tratado; média %AL controle: Média da porcentagem de área lesada do grupo controle.

Todos os compostos isolados no presente trabalho também foram avaliados para a atividade gastroprotetora pelo modelo de úlceras induzido EtOH/HCl na dose de 30 mg/kg.

3.8.4 Modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético (ensaio curativo)

Para este ensaio utilizou-se a metodologia descrita por Takagi et al. (1969), com algumas modificações. Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 h, para posterior procedimento cirúrgico. Após esses foram anestesiados com uma mistura anestésica de xilazina e cetamina (10 mg e 100 mg/kg de peso animal, respectivamente) e submetidos a cirurgia para exposição do estômago. Na camada subserosa da parede externa do estômago foram injetados 15 µL de solução aquosa de ácido acético 20%. Em um grupo de 6 animais injetou-se 15 µL de solução salina (Naïve) para controle do experimento. O local foi pressionado por 30 segundos para evitar o extravasamento do líquido injetado e lavado delicadamente com solução salina para evitar aderência aos demais órgãos, sendo a parede abdominal posteriormente suturada. O antisséptico iodopovidina foi aplicado no local da sutura para auxiliar o processo de cicatrização. Dois dias após a recuperação dos animais iniciou-se o tratamento: os animais operados com a administração do ácido acético foram divididos em diferentes grupos (n=6) e tratados com ranitidina 100 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Tween 80 a 2%, 10 mL/kg) e extrato ESC 250 mg/kg. Para os animais Naïve (controle do experimento, n=6) também foi administrado o veículo. Ao final do período de tratamento (7 dias), os animais foram sacrificados e os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura e colocados em uma placa de vidro para digitalização. As imagens digitalizadas foram analisadas por software ImageJ[®]. Determinou-se a área total lesada (mm²), a porcentagem relativa de área lesada para o cálculo do índice de cura (IC %) utilizando a mesma equação 2 descrita anteriormente.

3.8.5 Avaliação sobre a secreção gástrica: Modelo de avaliação da secreção gástrica e doseamento de muco gástrico (ligadura de piloro)

Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 h. Decorrido tal período esses foram anestesiados com uma mistura anestésica de xilazina e cetamina e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo ao processo apófise xifóide. Após a abertura da incisão, a válvula pilórica foi amarrada e por via intraduodenal foram administrados os seguintes tratamentos em diferentes grupos: ranitidina 100 mg/kg (controle positivo), carbenoxolona 200 mg/kg (controle negativo), indometacina 100 mg/kg (controle negativo), veículo (controle negativo, solução de Tween 80 a 2%, 10 mL/kg) e o extrato ESC (100, 250 e 500 mg/kg).

Após os tratamentos as incisões foram suturadas e 4 h após a cirurgia os animais foram sacrificados. As incisões foram reabertas e após o pinçamento da válvula cárdia (para evitar a perda do conteúdo gástrico), o estômago foi retirado para determinação do volume estomacal, pH, concentração de íons hidrogênio e quantidade de muco aderido a mucosa (SHAY et al., 1945; SUN et al., 1991).

Após a determinação do volume, foram adicionados 5 mL de água destilada à amostra, sendo posteriormente centrifugada por 10 min a 3000 rpm à 5°C. No sobrenadante foi determinado o pH através de pHgâmetro e titulado com solução de hidróxido de sódio a 0,01 N para a determinação da acidez titulável utilizando-se fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em mL (volume), pH e mEq/L/4h (concentração de íons hidrogênio).

Ao tecido estomacal foram adicionados 7 mL de solução de Alcian Blue (Alcian Blue 0,02%, sacarose 0,16 M, acetato de sódio 0,05 M; pH 5,8). Após 24 h o tecido estomacal foi retirado e o sobrenadante centrifugado a 3000 rpm por 10 min. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectofotômetro no comprimento de onda de 615 nm. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores de absorbância obtidos interpolados na equação da curva padrão de solução de Alcian Blue (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μg/mL), sendo os resultados calculados sobre a média das leituras. Os resultados foram expressos em quantidade de corante aderido ao muco (mg) por grama de tecido (g).

3.8.6 Participação do óxido nítrico e de grupos sulfidrilas (SH) na atividade gastroprotetora in vivo

O método a ser empregado para avaliação do NO foi descrito por Arrieta et al. (2003) e o método descrito para avaliação dos grupos sulfidrilas foi descrito por Matsuda, Yoshikawa (1999). Ambos métodos foram utilizados com algumas modificações. O L-NAME (N-nitro-L-Arginina metil éster) atua como um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, enquanto o NEM (N-metil-maleimida) quela grupamentos sulfidrilas. Os animais foram divididos em três grandes grupos (n=18) e pré-tratados com: L-NAME 70 mg/kg (i.p), NEM 10 mg/kg (i.p), salina 0,1 mL/kg (i.p.).

Após 30 min dos pré-tratamentos, os grupos foram divididos (n=6) e tratados por v.o. com carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo), veículo (controle negativo, solução de Tween 80 a 2%, 10 mL/kg) e extrato ESC (250 mg/kg). Após 60 min dos tratamentos, prosseguiu-se com o experimento de úlceras agudas induzidas por EtOH/HCI, conforme descrito no item 3.8.3.

3.8.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA) seguido do teste de Tukey, sendo que os valores com p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos (SOKAL; ROHLF, 1995). Os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism[®]. As curvas (equações da reta) e DI₅₀ (dose inibitória) foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear.

3.9 Ensaio de citotoxicidade

3.9.1 **Ensaio XTT**

O ensaio do XTT foi realizado na Universidade de Franca (UNIFRAN) em colaboração com as Prof^a Dr^a Raquel Alves dos Santos e Dr^a Denise Crispim Tavares.

As linhagens de melanoma (B16F10), adenocarcinoma cervical humano (HeLa), glioblastoma humano (MO59J) e fibroblastos (GM07492A) foram semeadas na concentração de 1 x 10⁴ células/poço utilizando-se microplacas de 96 poços e meio cultura HAM F10 + DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), na proporção de 1:1, ou somente meio DMEM. As amostras testadas para tais linhagens foram o extrato ESC e o alcaloide cernumidina, iniciando a diluição seriada na concentração de 5000 μg/mL.

Para as linhagens MCF-7 (carcinoma mama) e MCF-10 A (células da mama normais) foram semeadas 2×10^4 células/poço em placas de 6 poços de fundo chato contendo meio de cultura completo (DMEM). Foram testadas para tais linhagens diferentes concentrações (1000 a 7,8 µg/mL) do extrato (ESC), frações FHex, FDCM, FAcOEt, FBuOH e FAq, e os compostos isolados cernumidina, β -sitosterol e friedelina.

Para todas as linhagens, após 24 h de cultivo a 37°C, as células foram expostas por mais 24 h às amostras testadas. Como controle negativo utilizou-se meio de cultura e como controle positivo dimetilsulfoxido (DMSO) a 3%. O teste foi realizado em triplicata.

Após o tempo de incubação de 24 h, o sobrenadante foi removido de cada poço e as culturas foram lavadas com 250 μL de tampão fosfato de sódio (PBS). Em seguida, nas placas de 6 poços, foram adicionados 200 μL de meio DMEM sem vermelho de fenol e nas placas de 96 poços 100 μL, acrescido de 50 ou 25 μL, respectivamente, de solução XTT [sódio 3΄-[1-(fenilaminocarbonil]- 3,4-tetrazolium]-bis (4-metoxi-6-nitro) ácido benzeno sulfônico hidratado] (Kit-XTT, *Roche Molecular Biochemicals*). Após um período de 4 h de incubação a 37°C protegido de luz foram realizadas as leituras à 450-620 nm usando um leitor de ELISA. A atividade citotóxica foi avaliada utilizando o parâmetro de inibição de 50% do crescimento das linhagens celulares (CI₅₀) (ROGERO et al., 2003).

Para o cálculo do valor de Cl₅₀ utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do *post test* Tukey.

3.10 Ensaios com cultura primária de células de músculo liso de HPB

3.10.1 Cultura primária

Os ensaios com cultura primária de HPB foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis da FMRP/USP.

Células de cultura primária de músculo liso de HPB foram compradas da empresa LONZA[®] contendo a seguinte codificação: CC-2587 PrSMC (*Prostate Smooth Muscle Cells*).

A cultura primária foi mantida em meio SmGm[™] - 2Bullet Kit[™] (CC-3182)(LONZA[®]) e incubada em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37℃.

3.10.2 Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando-se resazurina. As células da cultura primária foram semeadas em placas de 96 poços (800 células/poço). Após 24 h de incubação o meio de cultura foi removido e as células tratadas com extrato ESC (concentrações de 5; 4; 3; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL, solubilizados em 0,5% de DMSO) ou alcaloide cernumidina (concentrações de 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg/mL, solubilizados em 0,14% de DMSO). Realizou-se o teste nos tempos de 48, 72 e 96 h de exposição às amostras testadas. Após os respectivos tempos de exposição o meio de cultura foi removido e adicionou-se 195 µL de meio de cultura com 5 µL de resazurina em cada poço. Após adição da resazurina as placas foram novamente incubadas por 4 h. Após o período de incubação, a leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de onda de 570 e 595 nm utilizando-se o aparelho iMark Microplate Absorbance reader (BioRad Laboratories). Os experimentos foram realizados em triplicata em todos os tempos avaliados e como controle negativo utilizou-se células em meio de cultura e células com meio de cultura contendo DMSO 0,5% ou 0,14%.

3.10.3 Ensaio de apoptose

O ensaio para detecção de morte celular foi realizado através da marcação de células apoptóticas com Anexina V Cy-5 (BD Biosciences Pharmigen[®]) e células necróticas com iodeto de propídio (PI). A anexina tem alta afinidade pela fosfatidilserina, se ligando a essa especificamente, na presença de cálcio. A fosfatidilserina é um fosfolipídio presente na face interna da membrana das células. Sua externalização ocorre durante o processo de apoptose e serve como um sinal para as células serem removidas. A marcação positiva com PI indica que as células perderam a integridade da membrana. Células de cultura primária de músculo liso foram semeadas em placas de 6 poços contendo 4 x 10⁴ células/poço. As concentrações do extrato ESC avaliadas foram: 2; 0,5 e 0,125 mg/mL. Para o alcaloide cernumidina foram testastas as concentrações de 1 mg/mL (3,3 x 10⁻⁶ M); 0,5 mg/mL (1,6 x 10⁻⁶ M) e 0,05 mg/mL (1,6 x 10⁻⁷ M).

O tempo de exposição avaliado foi de 96 h. Decorrido tal período, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS gelado e ressuspendidas em 300 μL de tampão de ligação diluído (1x) (BD Biosciences Pharmigen®). Foram adicionados 5 μL de anexina V Cy5 em cada amostra testada. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente protegidos da luz por 15 min. Após a incubação foram adicionados 50 μL de uma solução de PI (50 μg/mL) e as células analisadas imediatamente por citometria de fluxo BD FACSCaliburTM (BD Biosciences Pharmigen® San Jose, CA). Como controle negativo utilizou-se células em meio de cultura, células em meio de cultura com DMSO 0,5% ou 0,14%. O ensaio foi realizado em triplicata.

As análises estatísticas para os ensaios com cultura de células primárias foram realizados no *software* GraphPad Prism[®]. Utilizou-se ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

3.11 Inibição da angiogênese

O ensaio de inibição de formação de vasos endoteliais foi realizado na Universidade da Flórida, Estado Unidos, em colaboração com o Prof. Dr. Mandip Sachdeva.

Células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (*Lonza*[®]) foram cultivadas em garrafas de 75 mm² utilizando meio ECGM (*Endothelial Cell Growth Medium*) (*Lonza*[®]). Tais células foram posteriormente tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi resuspendido ajustando-se a concentração de células para 1 x 10⁶ célula/mL.

As soluções estoques do extrato ESC, fração FBuOH e alcaloide isolado foram preparados em DMSO (0,5%) e, posteriormente, diluída com meio de cultura EGM para se obter concentrações de 40 e 100 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado o Docetaxel (20 nM/mL, agente citotóxico) e como controle negativo solução de DMSO a 0,5%.

Em placas de 24 poços, revestidas com 0,25 mL de Matrigel TM (*BD-Corning*), foram adicionados cuidadosamente 150 μL de células HUVEC (contendo 1 x 10⁶ cel/mL) com 150 μL da solução a ser testada, previamente preparada. Sendo assim, as concentrações finais testadas foram 20 e 50 μg/mL.

Após 18 h de incubação o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com solução salina *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS). Adicionou-se calceína AM nos poços e as placas foram novamente incubadas por 40 min. Decorrido tal tempo a calceína foi removida e os poços novamente lavados com HBSS.

Pela microscopia de fluorescência foram obtidas as imagens (10x) de diferentes campos de cada poço (10 imagens por poço). Utilizou-se calceína AM para marcação.

A partir das imagens foram calculados os números de ramificações formadas e a porcentagem de inibição do número de pontos de ramificação comparando-se com o controle.

3.12 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP/USP sob supervisão da Prof. Drª Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado.

3.12.1 Avaliação da atividade antibacteriana

As seguintes bactérias provenientes da 'American Type Culture Collection' (ATCC) foram utilizadas neste estudo: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Salmonella choleraesuis ATCC 10708, Helicobacter pylori ATCC 43504 e Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizou-se o método de microdiluição em caldo segundo metodologias preconizadas pelo *Clinical* and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006), com adaptações.

Para os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*, utilizados nos ensaios de microdiluição em caldo, foram preparados inoculos em soluções salina a 0,9% e, em seguida, estes foram padronizados em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 625 nm, por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland obtendo-se um inoculo, após diluições de 5 x 10⁵ UFC/mL.

Para o preparo do inoculo de *H. pylori*, preparou-se uma suspensão solução salina equivalente a solução padrão de McFarland a 2,0 (contendo de 1 x 10⁷ UFC/mL) a partir de uma sub-cultura de 72 h em uma placa ágar sangue.

O inoculo de *N. gonorrhoeae* foi preparado a partir de uma suspensão direta de colônias em solução salina equivalente a uma solução padrão de McFarland 0,5, sendo as colônias obtidas de uma cultura em ágar chocolate, incubada por 48 h a 35°C e atmosfera com 5% de CO₂.

Os meios de cultura, as condições de incubação para cada micro-organismo teste, bem como o antibiótico utilizado como controle para cada cultura estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. N	∕leios (de	cultura,	condições	s de	incubação	е	antibióticos	para	cada	micro-
organismo i	indicad	dor.	_								

Bactérias	Meio de	Meio de	Tempo de	Temperatur	Atmosfera de	Antibióticos
	cultura	cultura	incubação	de	incubação	
	(caldo)	(ágar)		incubação		
S. aureus	MH	MH	24 h	37℃	Aeróbia	Penicilina
E. coli	MH	MH	24 h	37℃	Aeróbia	Estreptomicina
P.	MH	MH	24 h	37℃	Aeróbia	Estreptomicina
aeruginosa						
S.	MH	MH	24 h	37℃	Aeróbia	Estreptomicina
choleraesuis						
H. pylori	-	MH	72 h	37℃	Microaeróbia	Claritromicina
N.	-	GC + 5%	48 h	37℃	Microaeróbia	Penicilina
gonorrhoeae		sangue +				
		suplemento				
		Isovitalex				

O extrato ESC, FHex, FDCM, FAcOEt, FBuOH e FAq (concentração de 400 a 0,195 µg/mL) foram testados para todas as linhagens. Já os compostos isolados, cernumidina, β-sitosterol e friedelina (concentração de 100 a 0,049 μg/mL) foram testados para H. pylori e N. gonorrhoeae. Nos ensaios de microdiluição em caldo foram depositados em microplacas de 96 orifícios os meios de cultura apropriados para cada micro-organismo, as amostras e o inoculo, obtendo-se o volume final de 100 µL em cada poço. Os volumes de inoculo e soluções das amostras foram os mesmos em todos os poços. Antibióticos (Tabela 9) foram utilizados como controles positivos. Realizou-se também os controles de esterilidade do meio de cultura, do crescimento da cultura (com e sem adição de DMSO 5%, solvente utilizado para solubilizar as amostras), do extrato, frações e antibióticos. As placas foram incubadas em temperaturas e atmosferas adequadas (Tabela 9). Após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina em cada poço, na concentração de 0,02% em solução aquosa como indicador da viabilidade celular. A verificação da cor rosa nos orifícios foi interpretada como presença de crescimento microbiano, enquanto que a cor azul interpretada como inibição do crescimento do microorganismo testado (micro-organismo sensível à amostra avaliada). As concentrações dos antibióticos variaram de 10 a 0,0049 µg/mL.

Os ensaios foram realizados em duplicata. Avaliou-se também se a atividade detectada era bactericida ou bacteriostática (CBM). Para tanto, uma alíquota de cada poço foi retirada da placa antes da revelação com indicador de viabilidade

celular, e em seguida as alíquotas foram inoculadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura ágar apropriado para cada micro-organismo. Após incubação a detecção ou ausência de crescimento microbiano nas placas inoculadas indicava efeito bacteriostático ou bactericida, respectivamente.

3.12.2 Avaliação da atividade antifúngica

As linhagens utilizadas para avaliação da atividade antifúngica foram: Candida albicans ATCC 10231, Candida tropicalis ATCC 750, Candida krusei ATCC 6258, Candida glabrata ATCC 90030, Candida parapsilosis ATCC 22019.

Utilizou-se o método de microdiluição em caldo segundo metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com adaptações.

Os procedimentos foram os mesmos utilizados nos ensaios com bactérias, exceto o preparo do inoculo, o qual foi preparado em solução salina esterilizada (0,85%) seguida da padronização em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, por comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland, fornecendo inoculo após diluições de 2,5 x 10³ UFC/mL. O meio de cultura utilizado para esse ensaio foi o caldo RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) e para controle positivo utilizou-se o fluconazol (concentrações de 160 a 0,039 µg/mL) para todas as linhagens de candidas avaliadas.

Os micro-organismos foram incubados a 37°C durante 48 h em placas de 96 poços com as mesmas amostras testadas no ensaio descrito no tópico 3.12.1 sendo que para os compostos isolados os fungos testados foram: *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Após o tempo de incubação adicionou-se 20 µL de resazurina em cada poço, na concentração de 0,02% em solução aquosa como indicador de viabilidade celular. Neste ensaio também foi determinado o efeito fungicida ou fungistático das amostras. Para tanto, uma alíquota de cada poço foi retirada da placa com auxilio de palito estéril, antes da revelação com indicador de viabilidade celular, e em seguida inoculada em placas de Petri, contendo meio de cultura TSA (ágar triptona de soja). As placas foram incubadas e a detecção ou ausência de crescimento microbiano indicaria efeito fungistático ou fungicida, respectivamente.

3.13 Secagem do extrato ESC em spray dryer

Os experimentos utilizando *spray dryer* foram realizados no laboratório de Física Industrial da FCFRP/USP, sob supervisão do Prof Dr. Luís Alexandre Predro de Freitas.

O extrato ESC foi preparado por percolação de acordo com o procedimento descrito no tópico 3.1. Após ser concentrado a vácuo, para remoção do etanol, o teor de sólido do extrato foi medido utilizando-se uma balança com lâmpada de halógeno (modelo MB45, OHAUS). A avaliação do teor é importante, pois a concentração de sólidos no líquido de alimentação é um dos fatores que podem alterar a eficiência da operação de secagem (FREITAS et al., 2010). O extrato apresentou uma porcentagem de teor de sólidos de 1,98%. Após tal medida, o extrato rotaevaporado foi transferido para um frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração até o momento de sua secagem em *spray dryer*. A secagem foi realizada em escala laboratorial em Mini *spray dryer* (modelo SD 0.5, Labmaq do Brasil Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) com cilindro de secagem de vidro borosilicato com as seguintes dimensões: 130 mm de diâmetro e 510 mm de altura. Utilizou-se bico atomizador de fluído pneumático com diâmetro de abertura de 1,0 mm. Os parâmetros utilizados no processo estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros do processo de secagem por *spray dryer*.

Parâmetros operacionais	valores
Vazão do ar de secagem (Hertz)	20
Vazão do ar comprimido (L/min)	40
Pressão do ar comprimido (bar)	4
Vazão de alimentação dos extratos (mL/min)	5
Temperatura do ar de secagem (℃)	80

A porcentagem de aditivo foi calculada baseada no teor de sólidos do extrato a ser seco. Inicialmente, foi realizado um estudo preliminar obtendo-se extratos secos de *S. cernuum* com diferentes excipientes tendo por finalidade comparar os diferentes pós obtidos e selecionar o excipiente que fornecesse as melhores

características físicas e rendimento de pó. Utilizou-se até 100% de aditivo, ou seja, uma relação 1:1 do teor de sólidos e aditivo.

Após os pré-testes com diferentes proporções e tipos de adjuvantes de secagem, como por exemplo, maltodextrina, amido, aerosil, lactose, manitol, celulose microcristalina, entre outros, optou-se por utilizar uma mistura de celulose microcristalina e aerosil na proporção de 8:2 por fornecer maior rendimento.

Para análise dos parâmetros do processo de secagem, optou-se por utilizar um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com três níveis e três variáveis (BOX et al., 1978). A temperatura de saída do equipamento, a porcentagem de aditivo e a vazão de alimentação foram os fatores escolhidos. Estas variáveis foram eleitas pelo fato de afetarem bastante o processo de secagem de extratos de plantas (ARAUJO et al., 2010; SOUZA et al., 2007). A Tabela 11 descreve os fatores escolhidos e os níveis selecionados na sua forma descodificada, usando a nomenclatura -1 (nível baixo), 0 (nível médio) e 1 (nível alto) e a Tabela 12 apresenta o planejamento fatorial adotado para o processo de secagem.

Tabela 11. Fatores estudados e seus níveis para o processo de secagem.

Fatores	Níveis			
	-1	0	1	
Temperatura (℃)	60	80	100	
Adjuvante (%)	50	100	150	
Vazão (mL/min)	3	5	7	

Tabela 12. Planejamento fatorial (Box-Behnken) para o processo de secagem.

T 4 .	Temperatura	Adjuvante	Vazão
Teste	(\mathcal{C})	(%)	(mL/min)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

A identificação dos parâmetros significativos foi realizada pelo software Statistica $5^{\, \text{\tiny (B)}}$. Estabeleceram-se como significativos os parâmetros com p < 0,05.

3.13.1 Rendimento do processo

O rendimento do processo de secagem foi calculado através da razão da massa de pó obtida após o processo e da quantidade de sólidos presentes em cada experimento em base seca.

3.13.2 Caracterização dos extratos secos

Para avaliação das micropartículas produzidas por *spray dryer* foram realizados ensaios com todos os 15 pós obtidos seguindo o planejamento Box-Behnken estudado. Os testes realizados foram: densidade aparente, densidade

compactada, Índice de Carr, Fator de Hausner, ângulo de repouso, umidade e tamanho (D_{50}). Adicionalmente, avaliou-se por CLAE-UV o teor de alcaloide cernumidina, utilizado como marcador, em cada amostra obtida nos testes.

3.13.3 Densidade aparente (da)

Em uma proveta com capacidade de 10,0 mL, previamente zerada, foi transferida uma massa específica de pó. Evitando-se movimentos bruscos, verificouse o volume ocupado pelo material. A densidade aparente foi calculada a partir da relação entre a massa e o volume ocupado pelo pó (USPXXX, 2007; ALIGIANNIS et al., 2001).

3.13.4 Densidade compactada (dc)

A densidade compactada foi obtida por meio de compactação artificial da amostra. Após realizar a avaliação da densidade aparente, submeteu-se a mesma proveta, contendo a amostra, a 100 batidas sucessivas sobre um pedaço de borracha até que fosse observado a retração do volume de pó. A densidade compactada foi obtida a partir da relação entre a massa inicial da amostra e o volume final ocupado pelo pó, após a compactação (USPXXX, 2007).

3.13.5 Determinação do Fator de Hausner (FH)

O FH é o quociente da razão entre a densidade compactada e a densidade aparente como observa-se na equação 3:

$$FH = dc/da$$
 Equação 3

Os materiais os quais apresentam FH inferior a 1,25 são facilmente compactados em contrapartida aos que apresentam valores superiores.

3.13.6 Determinação do Índice de Carr (IC)

O IC é uma medida indireta para avaliar a capacidade de compactação de pós, sendo determinado segundo a equação 4:

IC (%)=
$$((dc-da)/dc) \times 100$$

Equação 4

Materiais com IC inferior a 15% apresentam boas características de compactação.

3.13.7 Ângulo de repouso (α)

Quando um pó ou material granulado corre livre através de um orifício sobre uma superfície plana, o material depositado forma uma pilha cônica. O ângulo da base do cone denomina-se ângulo de repouso.

Para a determinação do ângulo de repouso utilizou-se um funil de plástico (orifício inferior de 12 mm, 90 mm de altura). A altura da saída do funil com relação à base foi fixada em 32 mm. Enquanto tampado a saída do funil, adicionou-se cerca de 500 mg da amostra, previamente pesada, e em seguida sua saída foi liberada. Formou-se um cone por escoamento gravitacional. Em seguida mediu-se, com auxílio de paquímetro digital, a altura e o diâmetro da base do cone formado (AULTON, 2005). Os testes foram realizados em triplicata.

O ângulo formado (α) foi obtido através do cálculo da tangente inversa das medidas da altura (h) do cone formado pela amostra (mm), e do raio da base circular (r) (mm), demonstrado na equação 5:

Por meio dos resultados obtidos, os pós são classificados segundo suas propriedades de escoamento (fluidez).

3.13.8 **Teor de umidade (TU)**

Avaliou-se os teores de umidade dos pós secos por *spray dryer* em estufa (NOVA ÉTICA®).

Placas de Petri de vidro (6 cm de diâmetro) foram previamente etiquetadas e pesadas sendo mantidas em estufa de convecção forçada por 24 h, a 105°C. Após este período foi transferido 100 mg de cada pó seco para as placas de Petri, que retornaram para a estufa por 3 h sob aquecimento de 105°C. Decorrido tal período, as placas foram retiradas da estufa e armazenadas por 15 min em um dessecador, sendo pesadas logo em seguida. O processo de aquecimento em estufa e pesagem das placas foi realizado até que a perda de massa do sólido se mantivesse constante. O teste foi realizado em triplicata. Para o cálculo do teor de umidade das amostras utilizou-se a equação 6 a seguir:

$$TU = [(Mi-Mf) \times 100)]/Mi$$

Equação 6

Onde M_i é o valor de massa inicial do pó e M_f valor de massa final.

3.13.9 Tamanho das partículas (D₅₀)

O tamanho das partículas dos pós obtidos foi determinado por microscopia. Para tal preparou-se lâminas com o uso de um espalhador de partículas. Em um dos compartimentos desse aparato colocou-se uma porção do pó a ser analisado e no outro compartimento uma lâmina de vidro. O espalhador de partículas foi fechado e através do orifício na parte frontal conectou-se um jato de ar comprimido espalhando sobre a lâmina uma camada fina e homogênea de partículas para serem observadas no microscópio. Após limpar o espalhador, o mesmo processo foi realizado para o preparo de todas as amostras de pós.

Para análise das partículas, um microscópio da marca NIKON (modelo Eclipse E200), com câmera, foi acoplado a um computador. Uma lâmina de calibração foi utilizada antes da análise das lâminas contendo as amostras para calibração do programa *motic images plus 2.0*. As lâminas, preparadas anteriormente, foram observadas no aumento de 4x. Foram capturadas imagens da lâmina para se obter o número desejado de partículas (aproximadamente 1000).

Pelo programa *motic images plus 2.0* obteve-se a área e perímetro de cada partícula. Utilizou-se o programa Excel para análise dos dados e obtenção do tamanho médio (µm) das partículas em cada amostra.

3.13.10 Quantificação do marcador

O teor de alcaloide cernumidina, utilizado como marcador, foi obtido utilizando-se o mesmo procedimento descrito nos tópicos 3.2 e 3.5.

3.13.11 Otimização das condições de secagem

O ponto ótimo das condições de secagem foi considerado para obter as máximas respostas, ou seja, melhor rendimento e maior quantidade do marcador. Para tanto, utilizou-se como ferramenta de otimização a análise pelo método de funções desejabilidade, com o auxílio do software Minitab 14.0 (Lead Technologies Inc.). Os valores estabelecidos para o software como baixo, alto e a resposta desejada foram retirados da região experimental do Planejamento Box-Behnken e todas as respostas foram determinadas com peso um. Após definição das condições experimentais para obtenção do extrato otimizado, a secagem, caracterização e quantificação do marcador foi realizada novamente para o pó obtido.

3.13.12 Estudo de estabilidade

O estudo para avaliação de estabilidade preliminar foi realizado com o extrato seco por *spray dryer* otimizado pela desejabilidade. Esse teste foi baseado no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). A duração do estudo foi de 14 dias consecutivos, nos quais as amostras foram submetidas a ciclos de 24 h sob aquecimento a 40 ± 2°C e umidade 75% de umidade relativa (UR) em câmara climatizada (FANEM, modelo 345) e ciclos de 24 h sob resfriamento em geladeira a 5 ± 2°C. Foram coletadas amostras do material a cada 48 h totalizando sete amostras. Após a finalização do estudo, analisou-se o teor de alcaloide cernumidina

nas amostras coletadas durante o período, utilizando-se CLAE-UV conforme método descrito no tópico 3.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento dos extratos e frações obtidas a partir da partição do ESC

A partir de 2 kg das folhas secas e trituradas obteve-se rendimento de 16,29% (325,74 g) do extrato bruto hidroetanólico. Considerando o rendimento em relação a biomassa, Almança et al. (2011) relatam rendimento de 18% do extrato hidroetanólico (7:3) a partir de 200 g de folhas de *S. cernuum* obtido por maceração estática. Entretanto, o processo de extração no presente trabalho foi realizado em grande escala, uma vez que foi utilizado um percolador de 35 L de capacidade. Desta forma, considerando a grande manipulação dos volumes de extração é possível que tenha ocorrido perda de material durante o processo. Além disso, o material vegetal utilizado foi coletado de indivíduos diferentes, localizados em regiões distintas e em diferentes estações do ano. Esses e outros fatores podem influenciar no rendimento e conteúdo dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Para o extrato em AcOEt (EAE) utilizou-se 1 kg de folhas secas e trituradas para a extração por maceração estática produzindo 19 g (1,9 % de rendimento) de extrato.

Estudos demonstram rendimentos variados do extrato quando utilizado outros métodos extrativos e combinações de solventes. Alves et al. (2007) obtiveram rendimento de 10,5 % a partir das folhas de *S. cernuum* quando extraídas com mistura de solventes AcOEt:MeOH:H₂O (10:4:1 v/v/v). Grando et al. (2008) obteve rendimento de 6,6% do processo de maceração das folhas com diclorometano.

Para a partição inicial do ESC foram utilizados 100 g do extrato. Os rendimentos para as diferentes frações obtidas estão descritos na Tabela 13.

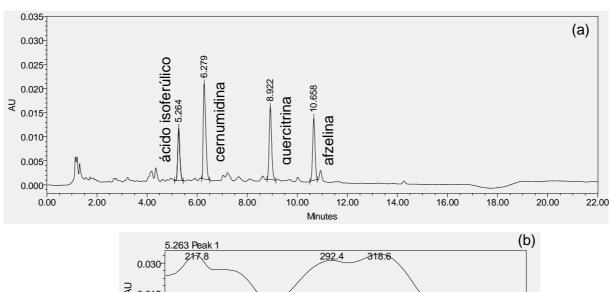
Tabela 13. Rendimento das frações obtidas após a particão do ESC.

Frações _	Rendimento				
riações _	%	Peso (g)			
FHex	2,78	2,78			
FDCM	3,68	3,68			
FAcOEt	5,78	5,78			
FBuOH	20,40	20,40			
FAq	54,28	54,28			
Total	86,92	86,92			

As frações em FHex e FDCM apresentaram aspecto oleoso e menores rendimentos. Pelos valores obtidos sugere-se que o extrato hidroetanólico das folhas de *S. cernnum* é constituído majoritariamente por constituintes de média a alta polaridade.

4.2 Análises cromatográficas

O extrato hidroetanólico (ESC) foi analisado por CLAE-UV-DAD em diferentes comprimentos de onda. O perfil do extrato no comprimento de onda de 257 nm e os espectros de absorção dos picos majoritários estão apresentados nas Figuras 9a e 9b.



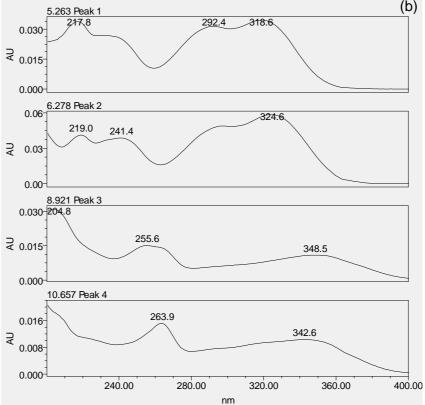


Figura 9. (a) Perfil cromatográfico para o extrato hidroetanólico. Coluna *Synergi Polar* (4,6 x 150 mm, 4 μ m). Fase móvel: água com 0,1% de ácido fórmico (pH = 3) na bomba A e MeCN na bomba B; eluição gradiente: 15-35 % de B em 15 min, 35-95 % de B até 17 min, permanecendo em 95% até 20 min., seguidos por mais 2 minutos para retorno das condições iniciais; Vazão: 1,5 mL/min; λ = 257 nm. **(b)** espectro de absorção dos picos majoritários do extrato ESC.

No perfil cromatográfico do extrato produzido por maceração das folhas de S. cernuum com a mistura de AcOEt:MeOH:H₂O (10:4:1 v/v/v) foi possível identificar os flavonoides quercitrina e afzelina (ALVES et al., 2007).

As frações obtidas da partição do ESC foram avaliadas por CCDC utilizando diferentes fases móveis como eluente. As cromatoplacas, com as frações eluidas, quando expostas ao UV e reveladas com reveladores químicos evidenciou a

presença de vários compostos nas diferentes frações. A fração butanólica, quando revelada com Reagente de Dragendorff, apresentou bandas de coloração alaranjada, características de alcaloides.

4.3 Fracionamento dos extratos

O fluxograma a seguir (Figura 10) demonstra os procedimentos realizados para o fracionamento do extrato ESC e obtenção dos compostos isolados SC1, SC2, SC3 e SC4.

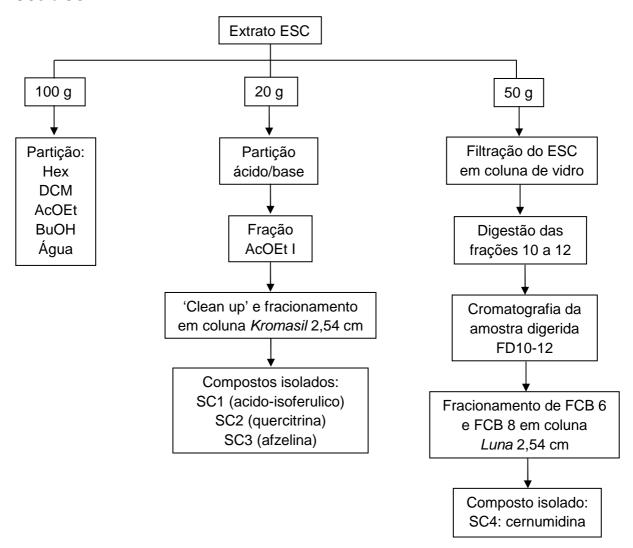


Figura 10. Fracionamento realizado para o extrato ESC

4.3.1 Partição ácido/base do extrato hidroetanólico (ESC)

Os rendimentos das frações obtidas pela partição ácido/base do ESC (20 g) encontram-se descritos na Tabela 14.

Tabola 14	Pandimentes	da particão	do ovtrato o	om ácido/base
Tabela 14.	Renaimentos	da particao	do extrato c	om acido/base

Frações	Gramas (g)
Precipitado	2,9825
AcOEt I	1,4451
AcOEt II	0,3380
Aquosa	92,761

A massa do precipitado, apresentada na Talela 14, representa a parte não solúvel em HCl (1N) inicial. A fração aquosa final apresentou grande massa, pois no processo de basificação e neutralização ocorreu formação de sal nesta fração.

As análises dessas frações em HPTLC revelaram a presença de compostos nas frações AcOEt I e II quando reveladas em luz UV (254 e 366 nm) e com anisaldeído. A fração aquosa e o precipitado não apresentaram absorção no UV e nem bandas quando reveladas com os reveladores químicos na HPTLC.

Para a determinação da composição das fases móveis para uso em coluna preparativa e cálculo dos Rfs, as placas de CCDC de alumínio não são recomendadas, uma vez que a sílica nessas não possuem a mesma qualidade que a sílica presente na HPTLC.

4.3.1.1 Fracionamento da fração AcOEt I

Com o fracionamento da fração AcOEt I isolou-se 3 compostos: SC1: ácido trans-isoferúlico (60 mg) (frações 5-8), SC2: quercitrina (39 mg) (frações 26-35) e SC3: afzelina (101 mg) (frações 81-87). Esses compostos foram identificados por análises de RMN.

Flavonoides glicosilados são frequentemente descritos no gênero *Solanum*, principalmente os derivados de canferol (3,5,7,4'-tetraidroxiflavona) e da quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona) (SILVA et al., 2003). Quercitrina já havia sido

previamente isolado de *Solanum melongena* (BARNABAS, NAGARAJAN, 1989). Alves et al., (2007) identificaram quercitrina e afzelina no extrato das folhas de *S. cernuum* isolando pela primeira vez a afzelina em uma espécie da família Solanaceae. Lopes et al. (2011) identificaram no extrato etanólico das folhas de *S. cernuum* o ácido caféico e também os flavonoides isolados no presente trabalho.

4.3.2 Fracionamento do extrato hidroetanólico (ESC) para obtenção de alcaloide(s)

4.3.2.1 Filtração do ESC em coluna de vidro

Os rendimentos das frações obtidas na filtração do ESC em coluna de vidro foram descritos previamente no item 3.3.4.1.

As frações 2 e 3, obtidas da filtração do extrato ESC, que demonstram conter o composto SC1 foram recristalizadas obtendo-se cerca de 500 mg de ácido trans-isoferúlico.

As frações F10 a F12 que demonstraram presença de coloração alaranjada na HPTLC, quando reveladas com Reagente de Dragendorff, foram selecionadas para fracionamento.

4.3.2.2 Digestão das frações 10 a 12

Como os alcaloides de interesse são compostos de alta polaridade, as frações 10-12 foram digeridas (sonicação e aquecimento) apenas com água destilada com intuito de se obterem os alcaloides mais concentrados. Porém, tais frações apresentavam outros constituintes também polares que não foram separados apenas com a digestão. Por isso, a fração FD10-12 digerida foi submetida a coluna cromatográfica.

4.3.2.3 Cromatografia da amostra digerida das frações FD10 -12

Nesta etapa foi possível separar constituintes que eluiam próximos ao composto de interesse quando analisados por CLAE-UV e, principalmente, 1,56 g de

material que não apresentava absorção no UV, nem bandas visíveis quando plotadas em HPTLC e reveladas com reveladores químicos.

A cromatografia das frações FD10-12 em coluna com recheio de sílica *Bakerbond*[®] gerou 10 frações. As maiores massas obtidas estavam presentes nas frações FCB6 (1,7 g) e FCB8 (1,51 g) totalizando 24 % de rendimento. Essas frações foram selecionadas para serem fracionadas em coluna preparativa de fase reversa *Luna* de 2,54 cm.

4.3.2.4 Fracionamento de FCB6 e FCB8 em coluna de fase reversa preparativa *Luna* de 2,54 cm

Utilizando-se a coluna *Luna* de 2,54 cm para fracionamento das frações FCB6 e FCB8 obteve-se 660 mg do alcaloide SC4 identificado como cernumidina (C₁₅H₂₁N₄O₃ (PM=305,16 g/mol)). O uso do detector durante a eluição, no comprimento de onda de 324 nm, auxiliou para o isolamento desse composto.

O alcaloide guanidínico isolado foi analisado por HPTLC e CLAE analítico. E sua estrutura química foi identificada por análises espectroscópicas de RMN.

Considerando a partir do extrato ESC foi obtido 1,32% (660 mg) do alcaloide a partir do extrato ESC. O trabalho de Lopes et al. (2011) descreve o isolamento do alcaloide cernumidina obtendo rendimento de 1,92% para tal composto a partir do extrato etanólico das folhas de *S. cernuum* após diversos procedimentos cromatográficos.

Compostos como a cernumidina ainda são um desafio para os pesquisadores em produtos naturais, pois é difícil isolar grandes quantidades de compostos com alta polaridade.

Até o início dos anos oitenta do século passado acreditava-se que somente espécies pertencentes às famílias Euphorbiaceae (*Alchornea* spp) e Leguminosae eram capazes de acumular alcaloides guanidínicos. Porém, com os novos estudos fitoquímicos e químicos, tal classe foi encontrada em outras famílias: Amaranthaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Caryophyllaceae, Fabaceae, Ranunculaceae, entre outras (REGASINI, 2008).

Apesar da ocorrência dos alcaloides guanidínicos provenientes de plantas superiores ocorrer apenas em algumas famílias, existem outras formas de vida que também os acumulam, sendo estes metabólitos produzidos por micro-organismos

(BERLINCK et al., 2012; CARDOZO et al., 2007), invertebrados (FREITAS et al., 1995), algas (CARDOZO et al., 2007), esponjas (MAKARIEVA et al., 2012) entre outros.

A proposta biossintética apresentada pelos autores Graser e Hartmann (2000) e Regasini (2008) permite a divisão dos derivados guanidínicos de origem vegetal em três grandes grupos. O primeiro refere-se a incorporação dos resíduos de arginina em peptídeos cíclicos, enquanto o segundo está relacionado aos metabólitos derivados do acoplamento de uma unidade guanidínica com substituintes terpênicos abertos ou rearranjados em ciclos. O terceiro refere-se aos alcaloides guanidínicos derivados de agmatina, um produto de descarboxilação do aminoácido arginina, reação catalisada pela enzima arginina descarboxilase (ADC), no qual se enquadra o alcaloide cernumidina. Lopes et al. (2011) propuseram em seu trabalho a rota biossintética para a formação dos isômeros cernumidina e isocernumidina (Figura 11).

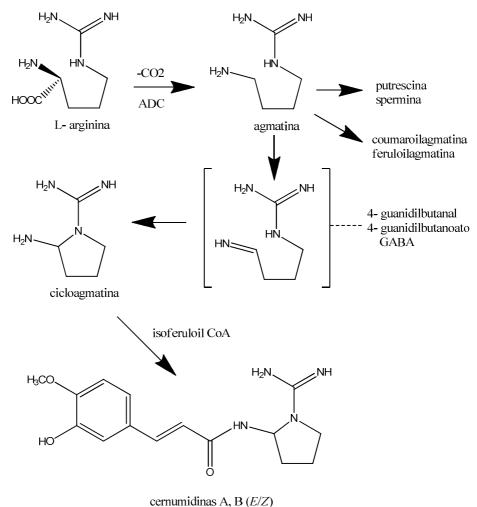


Figura 11. Proposta de biossíntese para os alcaloides cernumidina e isocernumidina (LOPES et al., 2011).

4.3.3 Fracionamento do extrato em acetato de etila (EAE)

O fluxograma a seguir (Figura 12) demonstra os procedimentos realizados para fracionamento do extrato EAE.

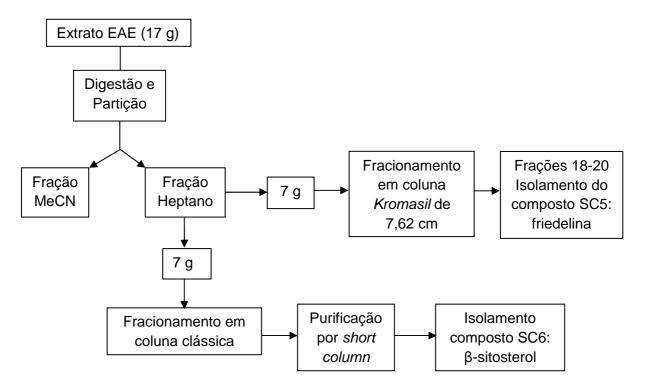


Figura 12. Fracionamento realizado para o extrato em acetato de etila.

Dezessete gramas do extrato EAE foram particionados com MeCN e heptano produzindo 14 g da fração em heptano. Sete gramas dessa fração foram fracionadas em coluna *Kromasil* de 7,62 cm coletando-se 133 frações. A reunião das frações 18-20, após recristalização, produziu cerca de 30 mg (rendimento de 0,43%) do composto SC5: o triterpeno friedelina ($C_{30}H_{50}O$). Tal composto foi isolado pela primeira vez para a espécie *S. cernuum*.

4.3.3.1 Fracionamento da fração em heptano por coluna clássica e purificação por short column

A short column utiliza uma pequena fase estacionária e o uso de uma fase móvel que retém os compostos de interesse no ponto de partida. O princípio consiste na passagem contínua da mesma fase móvel que provocará a eluição dos compostos.

As frações 260 à 293 (619 mg) obtidas do fracionamento por coluna clássica da fração em heptano, quando analisadas por CCD, foram selecionadas para serem repurificada por *short column*.

Da reunião das frações 56 a 59 (14,3 mg, rendimento de 0,20% a partir da fração em heptano) obtidas da *short column*, isolou-se o composto SC6 que foi identificado como β -sitosterol, um fitoesteroide amplamente encontrado no reino vegetal.

Uma série de alcanos (C_{25} - C_{34}), xantofila luteína e o β -sitosterol já haviam sido identificados no extrato diclorometânico conforme descrito por Grando et al.(2008).

Estudos científicos demonstram que o β -sitosterol melhora os sintomas e previne a incontinência urinária causada pelo aumento da próstata na HPB. Quando os homens envelhecem, frequentemente, as células das glândulas da próstata crescem causando hiperplasia que obstrui a uretra, resultando em lentidão urinária. Estudos mostram que o β -sitosterol pode ser utilizado sozinho ou combinado com fármacos já usados no combate da HPB (STRUM, FALOON, 2005).

4.4 Determinação estrutural dos compostos isolados

4.4.1 Composto SC1: acido trans-isoferúlico

Os dados obtidos por RMN (apêndices 1, 2 e 3) quando comparados com a literatura (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009) (Tabela 15), possibilitou a identificação do ácido trans-isoferúlico ($C_{10}H_{10}O_4$) (Figura 13).

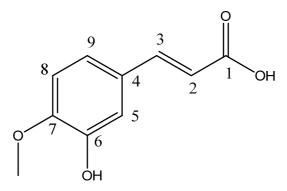


Figura 13. Estrutura química do composto ácido trans-isoferúlico.

A estrutura do acido trans-ferúlico foi determinada devido a presença dos sinais, em δ 7,04 (H5); δ 7,00 (H9) e δ 6,91 (H8) de um anel aromático tri-substituído, além de dois hidrogênios olefínicos (δ 7,43 (H3) e δ 6,43 (H2)) conjugados à carbonila em relação trans (J = 16 Hz). O sinal (duplo dupleto) em δ 7,00 foi atribuído ao H9 por ser capaz de acoplar com os H8 e H5. Observou-se também a presença do sinal de metoxila ligado ao anel aromático (δ 3,87 (-O-CH3)). A aquisição do RMN de DEPT (apêndice 3) demonstrou exatamente a presença de 5 carbonos –CH e de 1 carbono –CH3 (Tabela 15).

Tabela 15. Dados dos espectros de RMN obtidos para o ácido trans-isoferúlico em CD₃OD e dados da literatura

Número do carbono	¹ Ηδ(ppm); multiplicidadeJ (Hz); integral	^{*1} Ηδ(ppm); multiplicidadeJ (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	* ¹³ C δ(ppm)	DEPT
1			171,4	171,2	
2	6,43 (d; 16 Hz; 1H)	6,31 (d; 16 Hz; 1H)	118,8	115,9	120,9
3	7,43 (d; 16 Hz; 1H)	7,59 (d; 16 Hz; 1H)	142,9	147,0	141,5
4			129,3	127,8	
5	7,04 (d; 1,92 Hz; 1H)	7,18 (d; 1H)	114,6	111,6	113,2
6			147,9	151,5	
7			150,9	149,9	
8	6,91 (d; 8,4 Hz; 1H)	6,82 (d; 8,4 Hz; 1H)	112,5	116,5	111,1
9	7,00(dd; 8,28 e	7,07 (dd; 1H)	122,3	124,0	117,4
	1,96 Hz; 1H)				
O-CH3	3,87 (s; 3H)	3,89 (s; 3H)	56,3	56,5	54,95

^{*}Dados da estrutura do ácido trans-ferúlico em CD₃OD 400 MHz (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009).

4.4.2 Composto SC2: Quercitrina

Considerando os espectros de RMN de 1 H e 13 C (apêndices 4 e 5, respectivamente) obtidos em comparação com dados da literatura (NUGROHO et al. 2009) (Tabela 16), o composto SC2 foi identificado como quercitrina (quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo) ($C_{21}H_{20}O_{11}$) (Figura 14), um flavonoide encontrado em diversas espécies vegetais.

Figura 14. Estrutura química do composto quercitrina.

Os dois dupletos com deslocamentos químicos δ 6,2 (d; 2,4 Hz; 1H) e δ 6,37 (d; 2,4 Hz; 1H) referem-se aos hidrogênios aromáticos H-6 e H-8 do anel A substituídos nas posições 5 e 7, apresentando uma constante de acoplamento pequena referente aos hidrogênios meta correlacionados. Os sinais δ 6,91 (d; 8,4 Hz; 1H), δ 7,31 (dd; 2,0 e 8,4 Hz; 1H) e δ 7,34 (d; 2,0 Hz; 1H) são relativos aos hidrogênios orto e meta do anel B que juntamente com os sinais de RMN do espectro de 13 C confirmam a substituição em C-3' (δ 144,99) e C-4' (δ 148,37), característicos do flavonol quercitrina (ANDERSEN, MARKHAM, 2006; AGRAWAL, 1989).

Foram observados 21 sinais de carbono no espectro de RMN de ¹³C (apêndice 5), sendo 15 atribuídos à aglicona quercetina e os outros 6 da unidade de açúcar. Segundo Markham et al. (1978) a glicosilação na posição 3 de um flavonol parece excercer um efeito mais acentuado no C-2 da aglicona (orto em relação a C-3) do que a glicosilação em outras posições. Sabendo-se que o deslocamento químico do C-2 da quercetina, aglicona da quercitrina, é de aproximadamente 146,9 ppm e que para o composto isolado o mesmo foi de 157,10 ppm, confirma-se que ocorre uma 3-O-glicosilação.

Em comparação com a literatura (PURI et al., 1994), o carbono C-6", que apresenta deslocamento químico de δ 16,25, corresponde ao açúcar ramnose. O C-6" de açúcares como a glicose e galactose apresentam deslocamento químico na faixa de 60 a 67 ppm. Em ramnosídeos, a configuração da ligação glicosídica é do tipo α e o açúcar ocorre na forma piranosídica.

Tabela 16. Deslocamentos obtidos nos espectros de RMN para o composto quercitrina em CD₃OD e dados da literatura.

Número				
do	$oldsymbol{\delta}^1H$	*δ¹H	δ^{13} C	*δ ¹³ C
carbono				
2			157,10	156,87
3			134,82	133,80
4			178,22	177,84
5			161,79	161,65
6	6,20 (d; 2,4 Hz; 1H)	6,20 (d; 2,0 Hz; 1H)	98,39	99,19
7			164,45	164,6
8	6,37 (d; 2,4 Hz; 1H)	6,39 (d; 2,0 Hz; 1H)	93,29	94,17
9			157,89	157,05
10			104,48	104,99
1′			121,46	121,67
2´	7,34 (d; 2,0 Hz; 1H)	7,55 (d; 2,0 Hz; 1H)	114,95	115,74
3´			144,99	145,20
4′			148,37	148,86
5′	6,91 (d; 8,4 Hz; 1H)	6,86 (d; 8,5 Hz; 1H)	115,51	116,77
6′	7,31 (dd; 2,0 e 8,4 Hz; 1H)	7,54 (dd; 2,0 e 8,5Hz; 1H)	121,55	122,05
1′′	5,35 (d; 1,6 Hz; 1H)	4,41 (s(l); 1H)	102,13	100,86
2′′	4,61 (s(I); 1H)	3,46 (m, 1H)	70,62	70,50
3′′	4,22 (m; 1,6 e 2,6 Hz; 1H)	3,53 (m, 1H)	70,70	70,52
4′′	3,75 (d; 3,6 Hz; 1H)	3,45 (m, 1H)	71,84	70,96
5′′	3,74 (d; 3,2 Hz; 1H)	3,29 (m, 1H)	70,49	67,29
6′′	0,94 (d; 6 Hz; 3H)	1,11 (d; 5,0 Hz; 3H)	16,25	18,04
OH (C-5)	12,52 (s, 1H)	·	•	

^{*}Dados da estrutura da quercitrina em DMSO-d6 125 MHz (NUGROHO et al., 2009).

4.4.3 Composto SC3: Afzelina

Nos dados obtidos por RMN (1 H e 13 C apêndices 6 e 7, respectivamente) quando comparados com a literatura (NUGROHO et al., 2009), pode-se identificar o composto afzelina (canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo) ($C_{21}H_{20}O_{10}$) (Figura 15).

Figura 15. Estrutura química do composto afzelina.

Os sinais em δ 6,20 (d; 2,0 Hz; 1H) e δ 6,37 (d; 1,6 Hz; 1H) são relativos a hidrogênios aromáticos do anel A, com constantes de acoplamento de hidrogênios *meta* correlacionados, indicando substituições em C-5 e C-7 (Tabela 17).

A afzelina se diferencia da quercitrina por não conter o grupamento -OH ligado ao C-3'. Assim, os dupletos δ 6,93 (8,8 Hz; 1H) e δ 7,76 (8,8 Hz; 1H) são pertencentes aos hidrogênios do anel B e indicam a substituição *para*. Esses dados indicam monosubstituição na posição 4' do anel B conferido-lhe assimetria e produzindo um efeito mesomérico doador de elétrons, causando proteção na posição orto. Dessa forma, o sinal de deslocamento químico δ 6,93 é atribuído aos hidrogênios simétricos das posições 3' e 5' do anel B, enquanto que o sinal em δ 7,76 é atribuído aos hidrogênios simétricos das posições 2' e 6'.

Os sinais com deslocamento químico na região de 3 no espectro de RMN 1 H e a quantidade de carbonos detectada no espectro de RMN 13 C, permitiram identificar uma unidade de açúcar. O deslocamento químico acentuado em C-2 confirmou O-hidroxilação em C-3. O deslocamento químico do carbono C-6" δ 17,67, juntamente com os dados da literatura (PURI et al., 1994) permitiram determinar que o açúcar corresponde a ramnose.

Tabela 17. Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto afzelina em CD₃OD e dados da literatura

Número do carbono	¹ Η <i>δ</i> (ppm); multiplicidade; J (Hz); integral	^{*1} Ηδ(ppm); multiplicidade; J (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	*13C δ(ppm)
2			158,56	156,94
3			136,23	133,71
4			179,63	177,89
5			163,23	161,63
6	6,20 (d; 2,0 Hz; 1H)	6,22 (d; 2,5 Hz; 1H)	99,84	99,21
7			165,88	164,60
8	6,36 (d; 2,0 Hz; 1H)	6,45 (d; 2,5 Hz; 1H)	94,77	94,38
9			159,30	157,30
10			105,95	104,42
1′			122,64	121,37
2´	7,76 (d; 8,8 Hz; 1H)	8,0 (d; 7,5 Hz; 1H)	131,93	131,37
3´	6,93 (d; 8,8 Hz; 1H)	6,89 (d; 7,5 Hz; 1H)	116,54	115,60
4′			161,60	160,37
5´	6,93 (d; 8,8 Hz; 1H)	6,89 (d; 7,5 Hz; 1H)	116,54	115,60
6´	7,76 (d; 8,8 Hz; 1H)	8,0 (d; 7,5 Hz; 1H)	131,93	131,37
1′′	5,37 (d; 1,6 Hz; 1H)	4,44 (s(l); 1H)	103,52	100,88
2′′	3,72 (m; 1H)	3,47 (m, 1H)	72,05	70,43
3′′	3,32 (m; 1H)	3,46 (m, 1H)	72,13	70,53
4′′	3,31 (m; 1H)	3,45 (m, 1H)	73,20	71,00
5′′	4,22 (m; 1H)	3,68 (m, 1H)	71,94	67,16
6′′	0,92 (d; 5,6 Hz; 3H)	1,10 (d; 5,0 Hz; 3H)	17,67	18,01
OH (C-5)	12,49 (s, 1H)	,		

^{*}Dados da estrutura da afzelina em DMSO-d6 125 MHz (NUGROHO et al., 2009).

4.4.4 Composto SC4: Cernumidina

Os dados obtidos por RMN (Apêndices 8, 9, 10 e 11) quando comparados com a literatura (LOPES et al., 2011) possibilitaram identificar o alcaloide guanidinico cernumidina ((E)-N-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il) isoferulamida) ($C_{15}H_{20}N_4O_3$) (Figura 16).

Figura 16. Estrutura química do alcaloide cernumidina.

O espectro de RMN de 1 H (Apêndice 8 , Tabela 18) mostrou um típico padrão para um derivado de ácido cinâmico 3,4- di-substituído, com os sinais para a olefina trans-di-substituída: δ 7,52 (d, 15,6 Hz, H-3) e δ 6,45 (d, 15,6 Hz , H-2), acompanhada dos deslocamentos do sistema aromático em δ 7,05 (d, 1,96 Hz, H-5), δ 7,01 (dd , 8,32 - 2 Hz , H-9) e δ 6,92 (d , 8,36 Hz , H-8). A partir do HSQC (Apêndice 9), pode-se também visualizar os sinais para C-2 (δ 117,5), C-3 (δ 144,4), C-5 (δ 114,5), C-8 (δ 112,4), C-9 (δ 122,7), e -OCH₃ (δ 56,4). Dois outros sinais presentes no HMBC (dados não apresentados), H-2 (δ 6,45) e H-3 (δ 7,52), correlacionaram com o átomo de carbono da carbonila C-1 (δ 170,0). Este valor de deslocamento químico para o grupo carbonílico está de acordo com a frequência para a banda de absorção do grupo carbonila de amida como descrito por LOPES et al. (2011). No HSQC o C-1' (δ 65,28) apresenta correlação com o hidrogênio H-1' (δ 5,78; d; 5,12 Hz).

A aquisição do RMN de DEPT (Apêndice 11) do composto cernumidina evidenciou a presença de 6 carbonos –CH, 3 carbonos –CH $_2$ e 1 carbono –CH $_3$ (Tabela 18).

Tabela 18. Dados dos espectros de RMN obtidos para a cernumidina em CD₃OD e dados da literatura.

Número do cabono	δ¹H (ppm); multiplicidade;J (Hz); integral	* ¹ Ηδ (ppm); multiplicidade; J (Hz)	DEPT	¹³ C δ(ppm)	* ¹³ C δ(ppm)
1				169,9	170
2	6,45 (d; 15,6 Hz; 1H)	6,45 (d; 15,6 Hz)	116,40	117,5	117,6
3	7,52 (d; 15,6 Hz; 1H)	7,52 (d; 15,6 Hz)	142,91	144,4	144,4
4				128,9	129,0
5	7,05 (d, 1,96 Hz, 1H)	7,05 (s (l))	113,18	114,5	114,6
6				148,0	148,0
7				151,3	151,3
8	6,92 (d; 8,36 Hz; 1H)	6,92 (d; 8,3 Hz)	111,12	112,4	112,5
9	7,01 (dd; 8,32 e	7,01 (dd; 8,32 e	121,41	122,7	122,7
	2Hz; 1H)	1,2 Hz)			
1'	5,78 (d; 5,12 Hz; 1H)	5,78 (d; 5,2 Hz)	63,84	65,28	65,4
2'A	2,30 (m; 1H)	2,30 (m)	32,04	33,38	33,4
2'B	2,03 (m; 1H)	2,03 (m)			
3'A	2,30 (m; 2H)	2,30 (m)	22,42	23,7	23,7
3'B	2,15 (m; 1H)	2,14 (m)			
4'A	3,57 (m; 1H)	3,57 (m)	46,74	49,8	48,1
4'B	3,40 (m; 1H)	3,40 (m)			
5'				156,8	156,7
O-CH ₃	3,87 (s; 3H)	3,86 (s)	55,05	56,3	56,4

^{*}Dados da estrutura da cernumidina em CD₃OD 400 MHz (LOPES et al., 2011).

4.4.5 Composto SC5: Friedelina

Os dados obtidos por RMN (Apêndices 12, 13 e 14) para o composto SC5 isolado, quando comparado com os dados encontrados na literatura (SEUPEL et al., 2014; KONG et al., 2008), permitiu identificar o triterpeno pentacíclico friedelina $(4\beta,5\beta,8\alpha,9\beta,10\alpha,13\alpha,14\beta)$ -5,9,13-trimetil-24,25,26-trinoroleanan-3-ona) (C₃₀H₅₀O) (Figura 17).

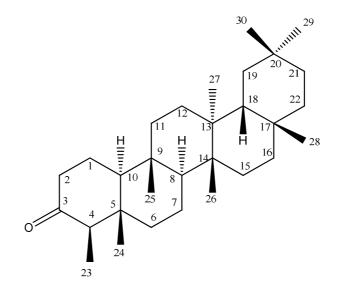


Figura 17. Estrutura química da friedelina.

O espectro de RMN de 1 H do composto friedelina em CDCI $_3$ mostrou os seguintes sinais característicos: oito grupos metilas no δ 0,73 (s), 0,88 (s), 0,89 (d, J = 6,5 Hz), 0,96 (s), 0,99 (s), 1,01 (s), 1,05 (s), 1,19 (s), bem como dos hidrogênios metilênicos e metínicos na região de 1,20-1,65 ppm.

Os hidrogênios metínicos e metilênicos em 2,40 (ddd, 1H, J = 13,6; 5,0; 1,8 Hz, H-2), 2,30 (m, 1H, H-2), 2,25 (q, 1H, J = 6,9 Hz, H-4), 1,97 (m, 1H, H-1), 1,72 (m, 1H, H-6), 1,69 (m, 1H, H-1) e 1,26 (m, 1H, H-6) aparecem com tais deslocamentos devido à presença do grupo carbonila em C-3.

O espectro de RMN de 13 C apresentou vinte e nove sinais no campo alto do espectro, na faixa de 59,5-6,8 ppm, e um único sinal no campo baixo, δ 213,4 ppm (C-3). A análise do espectro de RMN de 13 C em combinação com o espectro DEPT permitiu determinar a presença de oito grupos metílicos (CH₃: δ 6,8; 14,7; 17,9; 20,2; 18,6; 32,1; 31,8; 35,0), onze grupos metilênicos (CH₂: δ 22,3; 41,5; 41,3; 18,3; 35,6; 30,5; 32,7; 36,0; 35,3; 32,4; 39,2), quatro grupos metínicos (CH: δ 58,2; 53,1; 59,5; 42,8), seis carbonos quaternários (C: δ 42,1; 37,4; 39,7; 38,3; 30,0; 28,2) e um grupo carbonila (C=O: δ 213,4).

Tabela 19. Dados dos espectros de RMN obtidos para a friedelina em $CDCl_3$ e dados da literatura.

Número do carbono	¹ Hδ (ppm); multi;J(Hz); integral	^{(a) 1} Ηδ (ppm); multi;J (Hz); integral	^{(b)1} Ηδ(ppm); multi;J (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	^{(a) 13} C δ(ppm)	^{(b) 13} C δ(ppm)	DEPT
1	1,97 e 1,69	1,96 (m, 2H)	α: 1,96; β: 1,68	22,3	22,3	22,3	22,50
2	2,30 e 2,40	2,31 (m, 2H)	α: 2,28; β: 2,39	41,5	41,5	41,5	41,48
3				213,2	213,2	213,1	-
4	2,25 (q; 6,9; 1H)	2,25 (d, 10,0 Hz, 1H)	2,24	58,2	58,2	58,2	58,43
5				42,1	42,1	42.1	-
6	1,26 e 1,72		α: 1,28; β: 1,75	41,3	41,3	41,3	41,74
7	1,46 e 1,36		α: 1,49; β: 1,39	18,2	18,2	18,2	18,44
8	1,36 (m)		1,39	53,1	53,3	53,1	53,38
9				37,4	37,5	37,4	-
10	1,51		1,53	59,5	59,5	59,5	59,67
11	1,23 e 1,43		α: 1,28 β: 1,46	35,6	35,6	35,6	35,82
12	1,32		1,35	30,5	30,5	30,5	30,71
13				39,7	39,7	39,7	-
14				38,3	38,3	38,3	-
15	1,27 e 1,50		α: 1,29 β: 1,51	32,7	32,8	32,4	32,96
16	1,35 e 1,54		α: 1,36 β: 1,57	36,0	36,0	36,0	36,21
17				30,0	30,0	30,0	-
18	1,58 (m)		1,56	42,8	42,8	42,8	42,98
19	1,23 e 1,35		α: 1,21; β: 1,37	35,3	35,4	35,3	35,55

20			28,2	28,2	28,2		-
21	1,24 e		α: 1,28;	22.4	22.4	22.0	22.20
	1,44		β : 1,48	32,4	32,4	32,8	32,30
22	0,92 e		α: 0,94;	39,2	39,3	39,2	39,46
	1,45		β : 1,49				
23	0,89	0,89 (d, 6,9 Hz, 3H)	0,88	6,8	6,8	6,8	7,05
	0,73	0.72 (2.24)	0,73	14,7	14,7	14,6	14,8
24	(s; 3H)	0,73 (s, 3H)	0,73	14,7	14,7	14,0	14,0
25	0,88	0,87 (s, 3H)	0,87	17,9	17,9	17,9	18,16
	(s; 3H)			17,5			
26	1,01	1,01 (s, 3H)	1,01	20,2	20,3	20,2	20,48
	(s; 3H)			20,2		20,2	
27	1,05	1,05 (s, 3H)	1,05	18,6	18,7	18,6	18,88
	(s; 3H)			10,0			
28	1,19	1,18 (s, 3H)	1,18	32,1	32,1	32,1	32,62
	(s; 3H)			JZ, I			
29	0,96	0,95 (s, 3H)	0,95	21.0	31 Q	35 O	31,99
	(s; 3H)			31,8	31,8	35,0	
30	1,01	1,00 (s, 3H)	1,00	35,0	35,0	31,8	35,24

⁽a) KONG et al., 2008

4.4.6 Composto SC6: β-sitosterol

O composto SC6 isolado por *short column* foi submetido a análises de RMN. Com base nas análises dos dados obtidos e comparação com os dados da literatura pode-se propor que o composto isolado trata-se do β -sitosterol (Figura 18).

⁽b) SEUPEL et al., 2014

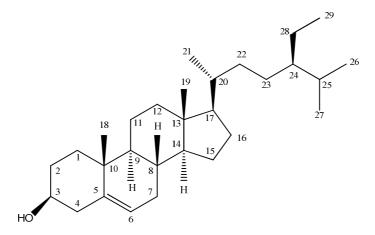


Figura 18. Estrutura química do β -sitosterol.

O β -sitosterol (sitosterol, stigmast-5-en-3-ol, (24R)-etilcolest-5-en-3 β -ol) (C₂₉H₅₀O) é um fitoesteroide bastante difundido no reino vegetal. Os fitoesteroides são substâncias esteroidais ou terpenoides tetracíclicos. Possuem o esqueleto carbônico formado pelo anel ciclopentanoperidrofenantrênico (Figura 18) onde podem ser encontradas ligações duplas, principalmente na posição C-5. Diferencia-se do colesterol, principal esteroide encontrado nos animais, pela presença da cadeia lateral com dez carbonos e dos outros fitoesteroides pela presença de um grupo etila no carbono C-24, pertencendo ao grupo dos colestanos (OLIVEIRA, 2007).

No espectro de 1 H (Apêndice 15) observou-se grande número de sinais na região de δ 0,6 a 2,3 relativos a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos sugerindo a presença de composto com núcleo esteroidal. Detectou-se a presença de um multipleto em δ 3,49 referente ao hidrogênio carbinólico, H-3, e um dupleto largo em δ 5,31 referente ao higrogênio olefínico H-6. Observou-se também os simpletos em δ 0,65 e δ 0,98, referentes aos grupos metílicos dos carbonos 18 e 19, respectivamente. Os hidrogênios dos carbonos 21, 26 e 27 se apresentam no espectro de 1 H como dupletos, sendo observados nos δ 0,89, δ 0,84 e δ 0,81, respectivamente.

No espectro de 13 C (Apêndice 16) pode-se observar os 29 sinais referentes aos átomos de carbonos presentes na estrutura elucidada. Os sinais em δ 121,9 e δ 140,9 são característicos dos carbonos olefínicos C-5 e C-6. O sinal em δ 72,0 é referente ao carbono carbinólico em C-3. Os valores encontrados para os outros carbonos presentes na estrutura estão de acordo com os deslocamentos

encontrados na literatura (Tabela 20). No DEPT (Apêndice 17) pode-se observar a presença de 11 carbonos – CH_2 que estão presentes na estrutura do β -sitosterol e ausência de sinais dos carbonos quaternários (C-5, C-10, C-13).

Tabela 20. Dados dos espectros de RMN obtidos para o β -sitosterol em CDCl₃ e dados da literatura.

Número do carbono	¹ Ηδ (ppm); multiplicidade; J (Hz); integral	^{(a) 1} Hδ (ppm); multiplicidade;J (Hz); integral	¹³ C δ(ppm)	^{(b) 13} C δ(ppm)	DEPT
1			37,5	37,3	37,5
2			31,9	31,6	31,9
3	3,49 (m; 1H)	3,51 (m; 1H)	72,0	71,8	72,0
4			42,5	42,3	42,5
5			140,9	140,8	
6	5,31 (d, 1H)	5,34 (d <i>l</i> , 1H)	121,9	121,7	121,9
7			32,1	32,1	32,1
8			32,1	32,1	32,1
9			50,3	50,2	50,3
10			36,7	36,5	
11			21,3	21,1	21,3
12			40,0	39,8	40,7
13			42,5	42,3	
14			57,0	56,8	57,0
15			24,5	24,3	24,5
16			28,5	28,3	28,5
17			56,3	56,1	56,3
18	0,65 (s; 3H)	0,68 (s; 3H)	12,1	12,0	12,1
19	0,98 (s; 3H)	1,00 (s; 3H)	19,6	19,1	19,6
20			36,4	36,2	36,4
21	0,89 (d; 6,2 Hz; 3H)	0,92 (d; 6,5 Hz; 3H)	19,0	18,8	19,0
22			34,1	34,0	34,1
23			26,3	26,2	26,3
24			46,0	45,2	46,0
25			29,4	29,2	29,4
26	0,84 (d; 6,0 Hz; 3H)	0,83 (d; 6,6 Hz; 3H)	20,0	18,9	20,0
27	0,81 (d; 3H)	,	19,2	19,1	19,2
28	, , ,		23,3	23,1	23,3
29			12,2	11,9	12,2
-OH	7,23 (s)	. 1	,	,	

⁽a) ZHANG et al., $2006 = Dados de^{-1}H do \beta$ -sitosterol;

⁽b) KOVGANKO et al., 2000 = dados de 13 C do β -sitosterol.

4.5 Quantificação dos compostos isolados no extrato ESC

A quantificação foi realizada por CLAE-UV nos comprimentos de onda para os respectivos compostos: 318 nm para o ácido trans-isoferúlico, 324 nm para o alcaloide cernumidina, 255 nm para o flavonoide quercitrina e 263 nm para a afzelina.

Os teores de constituintes isolados presentes no extrato hidroetanólico foram: 1,5% para o ácido trans-isoferúlico, 4,8% para cernumidina, 1,3% para quercitrina e 1,6% para afzelina.

A literatura não descreve a quantificação de compostos presentes em extratos de *S. cernuum*.

4.6 Avaliação dos compostos voláteis

Nas tentativas para extração de óleo essencial das folhas frescas de *S. cernuum* não obtivemos nenhum rendimento de óleo, tanto para as folhas coletadas no estado do Rio de Janeiro como para folhas as coletadas no campus da USP de Ribeirão Preto.

A partição com DCM do hidrolato produziu um resíduo de 31,4 mg (rendimento de 0,00785%) que foi analisado por CG/EM.

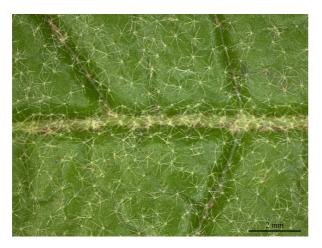
Os compostos majoritários, considerando-se os compostos com percentual de área maior que 2%, foram identificados por CG/EM (Tabela 21).

Tabela 21. Compostos presente no hidrolato das folhas de *S. cernuum* analisados por CG/MS.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Área (%)	IK calculado	IK literatura	Índice de similaridade (%)	
Ácido hexanóico	6,490	8,65	988	990	94	
$(C_6H_{12}O_2)$	0,430	0,00	300	330	54	
Álcool benzílico	7 005	6.76	1030	1033	96	
(C_7H_8O)	7,905	6,76	1030	1033	96	
Benzilacetaldeído	0.040	4.40	4044	4040	0.4	
(C_8H_8O)	8,219	4,43	1041	1043	94	
Ácido heptanóico	0.040		4004	1000	94	
$(C_7H_{14}O_2)$	9,649	3,29	1081	1083		
Nonanal	10 11	7,82	1103	1102	96	
$(C_9H_{18}O)$	10,44					
Álcool fenetílico	40.70	5,41	1111	1112	00	
(C ₈ H ₁₀ O)	10,73				98	
Acido nonanóico	47.70	44.50			0.5	
$(C_9H_{18}O_2)$	17,78	11,56	1281	1280	95	
2-Metoxil-4-vinilfenol	40.04	40.50	4007		00	
$(C_9H_{10}O_2)$	18,94	10,56	1307	1309	96	
Ácido nérico	24.02	2.40	1250	1047	01	
(ácido gerânico)	21,02	2,40	1350	1347	91	
$(C_{10}H_{16}O_2)$						
Total		60,83				

4.7 Tricomas das folhas de S. cernuum

Os tricomas identificados nas folhas de *S. cernuum*, tanto na parte adaxial como abaxial, são do tipo estrelado, majoritariamente (Figura 19).



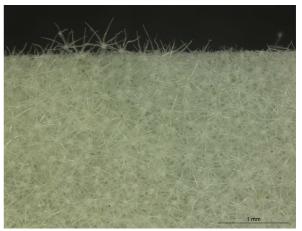


Figura 19. Tricomas presentes na folhas de *S. cernuum*. (a) face adaxial da folha. (b) face abaxial da folha.

Tricomas são estruturas externas da epiderme. Os tricomas estrelados encontrados nas folhas de *S. cernuum* são do tipo tectores. Tricomas tectores não produzem nenhum tipo de secreção. Acredita-se que possam, entre outras funções, reduzir a perda de água, por transpiração, das plantas que vivem em ambientes xéricos (secos), auxiliar na defesa contra insetos predadores e a diminuir a incidência luminosa (RAVEN et al., 2014).

Tricomas foram encontrados em grande quantidade em todos os órgãos vegetais na espécie *S. cernuum* nos trabalhos realizado por Alves et al. (2007) e por Machado (2001). Alves et al. (2007) descrevem que, nas folhas, os tricomas estrelados podem constituir de 1 a 3 estratos na superfície abaxial.

Trabalhos anteriores sobre anatomia estabeleceram que os tricomas em *Solanum* são muito diferentes em forma e tamanho (EDMONDS, 1982). Algumas destas estruturas podem se restringir a determinada espécie podendo ser usada para distinguir subgêneros, seções (SEITHE, ANDERSON, 1982) e grupos de *Solanum* (MENTZ et al., 2000).

A identicação botânica correta das plantas é muito importante constituíndo um dos passos que irá garantir o sucesso na produção de determinado fitoterápico. A identicação botânica é classicamente realizada com base em dados anatômicos e morfológicos da planta (ALVES et al., 2007).

Ensaios Biológicos

4.8 Avaliação da atividade gastroprotetora

4.8.1 Efeito do extrato hidroetanólico das folhas de *S. cernuum* em úlceras agudas induzidas por etanol/HCI

O ácido clorídrico presente no estômago, que é hipersecretado na úlcera gástrica induzida por etanol, acelera o processo de ulcerogênese e intensifica as lesões, reduzindo a proteção da mucosa gástrica contra agentes químicos (ANDRADE et al., 2007).

No modelo de úlceras agudas induzidas por etanol/HCI há a formação de lesões no tecido, contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia sub-epitelial e necrose, redução de muco aderido ao epitélio, infiltração de células inflamatórias, aumento da permeabilidade da mucosa, redução nos níveis totais de glutationa nas células da mucosa gástrica e geração de espécies reativas de oxigênio (EL-SHINNAWY et al., 2014; KLEIN-JÚNIOR et al., 2012; ZANATTA et al., 2009; LEE et al., 2006; KOUNTOURAS et al., 2001; HIRAISHI et al., 1993). A liberação de ânion superóxido (O2°) na lesão induzida pelo etanol, pode estar relacionada a produção de acetaldeído, formado pela ação da enzima álcool desidrogenase sobre o etanol. O acetaldeído serve como substrato para a xantina oxidase, a qual produz radicais livres (STEINBECK et al., 1993; HIRAISHI et al., 1993; KOCH, et al., 2004).

Neste experimento, houve redução da porcentagem de área lesada, nas doses de 250 e 500 mg/kg em comparação com o controle, promovendo um efeito citoprotetor com o pré-tratamento do extrato ESC (Figura 20).

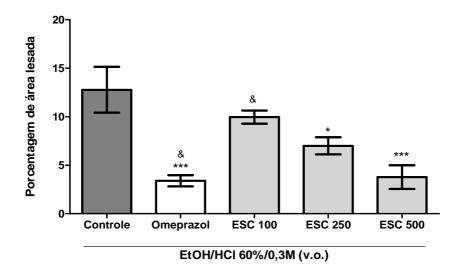


Figura 20. Gráfico do efeito da administração do extrato hidroetanólico das folhas de *S. cernuum* (ESC) (100, 250 e 500 mg/kg), omeprazol (30 mg/kg) e controle (veículo) por via oral no modelo de úlcera gástrica induzida por EtOH/HCI (60%/0,03M). Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Os grupos foram diferentes (F_{4,26} = 8,46; p<0,00051). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e ***p<0,001) e omeprazol (*p<0,05).

Na Tabela 22 podemos observar que os tratamentos com o extrato ESC apresentaram índice de cura de $25,49\pm4,99$; $47,62\pm6,64$ e de $71,75\pm9,07$ para as doses de 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente, e de $66,80\pm8,55$ para o fármaco de referência omeprazol. A DI₅₀ calculada para este teste foi de 206,1 mg/kg (164,8-257,9).

Tabela 22. Efeitos da administração oral de omeprazol (30 mg/kg) e do extrato ESC, nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	% de área lesada	Índice de cura (%)
Controle	-	42,28±7,45	12,77±2,36	-
Omeprazol	30	7,44±1,30 ***	4,43±1,14 **; &	66,80±8,55
	100	24,31±1,71 [*]	9,95±0,67 ^{&}	25,49±4,99
ESC	250	18,91±1,98 **	7,00±0,89 *	47,62±6,64
	500	7,62±2,44 ***	3,78±1,21 ***	71,75±9,07

Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6). Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01) e omeprazol (*p<0,05).

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que há compostos presentes no extrato ESC ativos para a atividade gastroprotetora. Assim, buscandose os possíveis metabólitos secundários responsáveis por tal atividade os compostos isolados das folhas de *S. cernuum* foram avaliados pelo modelo de úlcera aguda induzida por etanol/HCl na dose de 30 mg/kg cada. Essa dose foi determinada, pois é a mesma utilizada para o controle positivo omeprazol.

Dos compostos isolados testados apenas o alcaloide cernumidina não apresentou diferença estatística com o controle negativo (Figura 21).

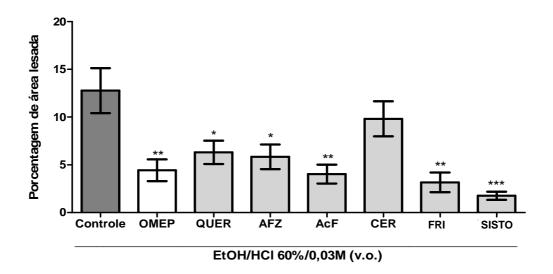


Figura 21. Gráfico do efeito da administração dos compostos isolados das folhas de $S.\ cernuum$ (dose de 30 mg/kg), omeprazol (dose de 30 mg/kg) e controle (veículo) por via oral no modelo de úlcera gástrica induzida por EtOH/HCI (60%/0,03M). Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Os grupos foram diferentes ($F_{7,42}=6,04$; p<0,0001). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p<0,01).

OMEP: omeprazol; QUER: quercitrina (dose: $6.7 \times 10^{-5} \,\text{M}$); AFZ: afzelina (dose: $6.9 \times 10^{-5} \,\text{M}$); AcF: ácido isoferúlico (dose: $1.5 \times 10^{-4} \,\text{M}$); CER: cernumidina (dose: $9.9 \times 10^{-5} \,\text{M}$); FRI: friedelina (dose: $7.0 \times 10^{-5} \,\text{M}$); SISTO: β -sitosterol (dose: $7.2 \times 10^{-5} \,\text{M}$).

Na Tabela 23 podemos observar que o índice de cura para o ácido trans-isoferúlico (70,01 \pm 5,51) e para os compostos apolares friedelina (76,37 \pm 7,77) e β -sitosterol (86,88 \pm 3,22) foram maiores do que para o controle positivo omeprazol (66,80 \pm 8,55).

Tabela 23. Efeitos da administração oral dos composto isolados de *S. cernuum* na dose de 30 mg/kg e omeprazol (30 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol/HCl em camundongos.

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	% de área lesada	Índice de cura (%)
Controle	-	42,28±7,45	12,77±2,36	-
Omeprazol	30	7,44±1,30 ***	4,43±1,14 **	66,80±8,55
Quercitrina	30	10,60±2,40***	6,31±1,21 [*]	56,68±4,03
Afzelina	30	9,79±3,02***	5,83±1,28 [*]	59,34±3,68
Ácido isoferúlico	30	6,75±2,97***	4,02±0,99**	70,01±5,51
Cernumidina	30	22,4±4,23 [*]	9,82±1,83	39,12±10,27
Friedelina	30	7,45±2,20 ***	3,16±1,04 **	76,37±7,77
$oldsymbol{eta}$ -sitosterol	30	4,64±1,42 ***	1,75±0,43 ***,&	86,88±3,22

Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6). Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e **p<0,001) e omeprazol (*p<0,05).

Compostos fenólicos, principlamente flavonoides, apresentam ação protetora em diversos modelos experimentais de úlcera gástrica, em geral, atribuída a sua atividade antioxidante (BATISTA et al., 2014; MOTA et al., 2009; BARROS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008; KAHRAMAN et al.; 2003; LA CASA et al.; 2000; LEWIS, HANSON, 1991). Além de capturarem radicais livres, os compostos fenólicos podem inibir atividade de enzimas oxidantes como a xantina oxidase, atuar como quelantes de metais de transição, diminuir a peroxidação lipídica, aumentar atividade de enzimas antioxidantes, reduzir secreção ácida gástrica, aumentar o fluxo sanguíneo, estimular a síntese de prostaglandinas e de muco (MOTA et al., 2009; YEH, YEN, 2006; ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988).

A atividade antiulcerogênica das folhas de *S. cernuum* foi testada por Grando et al. (2008) para o extrato diclorometânico no modelo de úlcera gástrica induzida pela administração de etanol. Nas concentrações do extrato de 500, 1000 e 2000 mg/kg, os índices de redução da lesão ulcerativa foram de 38,2; 61,0 e 81,9%, respectivamente. Os autores sugeriram que tal atividade poderia ser devido a compostos mais polares e não devido a compostos presentes no extrato diclorometânico. Porém, no presente trabalho foram isolados friedelina e β -sitosterol que são compostos de baixa polaridade, os quais apresentaram atividade para a

gastroproteção. Considerando que estes compostos estão em baixo teor em S. cernuum, sugere-se que a não obsrvância da atividade gastroprotetora no trabalho de Grando e colaboradores, pode ter sido em virtude da baixa concentração destes compostos no extrato avaliado. Destaca-se que diversos triterpenos, presentes em extratos de plantas comumente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diferentes doenças gástricas, tem sido relatados na literatura (MORIKAWA et al., 2006; JORGE et al., 2004; ARRIETA et al., 2003). A friedelina e o β -sitosterol são descritos na literatura possuindo atividade gastroprotetora (ANTONISAMY et al., 2015; NAVARRETE et al., 2002).

4.8.2 Efeito sobre úlceras agudas induzidas por AINEs (indometacina)

Está bem documentada na literatura a capacidade da indometacina de induzir úlceras em animais de laboratório e no próprio ser humano (RANG et al., 2012; BORRELLI, IZZO, 2000). Esse principal efeito colateral do AINE é decorrente da inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), diminuindo a síntese de prostaglandinas (PG) no estômago. A COX é a enzima chave que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos (RANG et al., 2012; CRYER, 2000; VANE, 1971).

As prostaglandinas do estômago, principalmente PGE₂, estimulam a produção de muco e bicarbonato, reduzem a secreção ácida, regulam o fluxo sanguíneo, estimulam a renovação epitelial contribuindo para a integridade da mucosa (SUGIMOTO et al., 2000; WALLACE, 2008). Existem duas isoformas conhecidas de COX: a COX-1, constitutiva, que está relacionada a síntese fisiológica de prostaglandina, e a COX-2, induzida, que está localizada principalmente nas células e tecidos envolvidos em processos inflamatórios, aumentando a síntese de prostanoides (KULKARNI et al., 2000; VANE et al., 1998; CROFFORD, 1997).

Os AINE inibem, de forma não seletiva, as enzimas COX e, consequentemente, a síntese de prostaglandinas (CRYER, DUBOIS, 1998). Assim, o uso frequente de AINE está relacionado ao desenvolvimento de gastrite e úlcera gástrica.

Todas as doses testadas do extrato ESC demonstraram potencial gastroprotetor. A figura 22 e Tabela 24 apresentam os resultados do modelo de úlcera gástrica induzida por AINE (indometacina). O extrato ESC exibiu atividade

gastroprotetora em todas as doses testadas (Figura 22) comparando-se com o controle negativo. A DI_{50} calculada para este teste foi de 104,4 mg/kg (85,50 – 127,4).

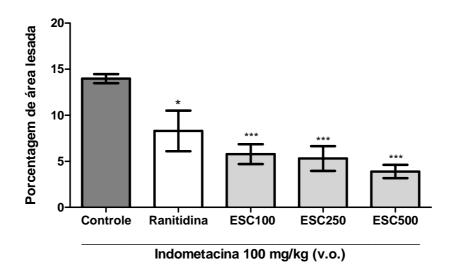


Figura 22. Gráfico do efeito da administração do extrato ESC (doses de 100, 250 e 500 mg/kg), omeprazol (dose de 30 mg/kg) e controle (veículo) por via oral no modelo de úlcera gástrica induzida por AINE em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Os grupos foram diferentes ($F_{4,28} = 10,31$; p<0,0001). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e ***p<0,001)

As porcentagens do índice de cura foram de 66,09±4,99, 67,94±9,73 e de 79,71±5,08 para as doses de 100, 250 e 500 mg/kg de extrato ESC, respectivamente. Para o controle positivo ranitidina (dose de 30 mg/kg) a porcentagem foi de 42,18±15,41 (Tabela 24).

Tabela 24. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e do extrato ESC (100, 250 e 500 mg/kg) em úlceras gástricas agudas induzidas por AINE (indometacina, 100 mg/kg) em camundongos.

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	% de área lesada	Índice de cura (%)
Controle	-	20,58±0,41	13,97±0,50	-
Ranitidina	100	14,45±4,01	8,29±2,21 *	42,18±15,41
	100	7,19±1,42 ***,#	6,09±1,33 ***	66,09±4,99
ESC	250	5,94±1,25 ***,##	5,77±1,08 ***	67,94±9,73
	500	4,69±1,09 ***,##	3,89±0,72 ***	79,71±5,08

Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6). Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e ***p<0,001) e ranitidina (*p<0,05 e ***p<0,01).

Em estudo realizado por Araujo et al. (2002), com indução de úlcera em ratos por administração de indometacina, o extrato hidroalcoólico 60% das folhas de *S. cernuum* provocou inibição de 50,4% no índice médio das lesões ulcerativas, quando administrado, por via oral, na dose de 1000 mg/kg. No presente trabalho foram avalidas três doses que forneceram resultados melhores. Tal fato pode ter ocorrido pela diferença nos teores dos constituintes dos extratos vegetais, bem como nos protocolos de extração e ensaio biológico utilizados.

Grando et al. (2008) utilizando o modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina em ratos, demonstrou que o extrato diclorometânico obtido das folhas de *S. cernuum* não apresentou atividade gastroprotetora. Esse mesmo extrato havia demonstrado alguma atividade quando testado pelo modelo de indução de úlcera por administração de etanol.

Diferentes flavonoides isolados de espécies vegetais apresentaram eficácia na proteção contra a ação ulcerogênica da indometacina (RAO et al., 1997; BEIL et al., 1995). Como o extrato ESC testado possui flavonoides em sua composição, tais compostos podem ser os responsáveis pela atividade gastroprotetora neste ensaio.

4.8.3 Efeito sobre úlceras crônicas induzidas por ácido acético

Avaliou-se também a atividade antiulcerogênica do extrato ESC em modelo de úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético. Este modelo é utilizado como o que mais se assemelha a úlcera em humanos, tanto em termos de características patológicas e localização, quanto aos mecanismos de cicatrização. É de difícil tratamento e requer um longo período para a cura (OKABE, AMAGASE, 2005; TAKAGI et al., 1969). Em contato com a mucosa, o ácido acético inicia a lesão com dano vascular e necrose isquêmica, além de destruir a barreira protetora gástrica, promover mudanças no padrão de aderência do muco, alterar a microcirculação, diminuir a liberação de fatores de crescimento tecidual e produção de prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas, promovendo a apoptose (JAINU, DEVI, 2006; OKABE, AMAGASE, 2005). Os extratos, neste ensaio, são utilizados de forma curativa com tratamento após a formação da úlcera, assemelhando a utilização na clínica (KLEIN-JÚNIOR et al., 2013).

A administração oral do extrato ESC (dose de 250 mg/kg) por sete dias consecutivos reduziu a área lesada da mucosa gástrica de camundongos quando comparado com o grupo controle (Figura 23), sugerindo que o extrato possui propriedades curativas podendo ser, futuramente, utilizado no tratamento de úlcera crônica.

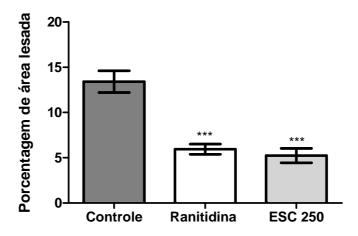


Figura 23. Gráfico do efeito da administração do extrato ESC na dose de 250 mg/kg e ranitidina (100 mg/kg) por via oral no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético (20 μ L, 20%) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Os grupos foram diferentes ($F_{2,17} = 25,56$; p<0,0001). Diferença significativa em relação ao grupo controle (***p<0,001).

O extrato ESC administrado na dose de 250 mg/kg por 7 dias consecutivos, favoreceu o processo de cicatrização diminuindo o diâmetro da lesão quando comparado ao grupo controle. O índice de cura do extrato foi de 81,83±2,62 (Tabela 25), valor maior do que encontrado para o controle positivo ranitidina (100 mg/kg), 59,57±7,31.

Tabela 25. Efeitos da administração oral de ranitidina (100 mg/kg) e do extrato ESC (250 mg/kg) em úlceras crônicas induzidas por ácido acético (20 μL, 20%) em camundongos.

Tratamentos (v.o.)	Dose (mg/kg)	Área total de lesão (mm²)	% de área lesada	Índice de cura (%)	
Controle	-	39,88±3,19	13,41±1,20	-	
Ranitidina	100	12,83±2,63 ***	5,94±0,56 ***	59,57±7,31	
ESC	250	6,50±0,94 ***	3,98±0,69 ***	81,83±2,62	

Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (***p<0,001).

4.8.4 Efeito sobre secreção gástrica e doseamento de muco gástrico (ligadura de piloro)

O ácido clorídrico é hipersecretado durante o processo de ulcerogênese gástrica, intensificando as lesões e reduzindo a proteção da mucosa (KWIECIEŃ et al., 2004). A redução da hipersecreção gástrica contribui para o processo de cicatrização, além de diminuir os episódios de recidiva. A terapia antiúlcera gástrica era focada em estratégias para diminuir a liberação do ácido gástrico. Porém, essas terapias não possuem mecanismos para reduzir o processo inflamatório e favorecer o processo de cicatrização. Atualmente, estudos investigam novas estratégias terapêuticas para a diminuição do processo inflamatório envolvido na fisiopatologia da úlcera gástrica (ALESSANDRI et al., 2013; LEE, SURH, 2012).

Devido aos resultados obtidos nos modelos utilizados anteriormente, que apresentaram potencial gastroprotetor do extrato ESC, passou-se então a investigar possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Dessa forma, foi realizado avaliação da secreção gástrica, através do modelo de ligadura de piloro. Tal modelo permite que a secreção gástrica seja acumulada no estômago, facilitando desta forma, a análise do conteúdo estomacal (SHAY, 1945).

Na avaliação de pH os grupos tratados com extrato (Tabela 26) não apresentaram diminuição da acidez estomacal, caracterizada pela diminuição do pH quando comparado ao grupo controle. Porém, todos os pré-tratamentos com extrato ESC foram eficazes em diminuir significativamente a concentração de íons hidrogênio ([H⁺] mEq.g⁻¹/L) na secreção gástrica, quando comparados ao grupo controle. No presente ensaio não se observou diferença estatística significativa de volume de suco gástrico para os animais tratados com o extrato ESC.

Tabela 26. Efeitos da administração intraduodenal de indometacina (100 mg/kg), ranitidina (100 mg/kg), carbenoxolona (200 mg/kg) e do extrato ESC (100, 250 e 500 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica ácida e na secreção de muco de camundongos submetidos à ligadura de piloro.

Tratamento v.o.	Dose (mg/kg)	рН	Volume de secreção (mL)	[H ⁺] (mEq/L/4h)	Quantidade de Alcian Blue ligado (mg/g tecido)
Controle	-	4,09±0,20	0,142±0,34	118,76±7,49	6,01±0,24
Indometacina	100	3,36±0.11**	0,134±0,45	96,434±9,27	5,77±0,38
Ranitidina	100	5,73±0,27 [*]	0,061±0,23***	32,78±4,61***	6,78±0,16
Carbenoxolona	200	5,78±0,27 [*]	0,166±0,16	57,63±9,65***	7,81±0,31 [*]
	100	4,11±0,21	0,213±0,25	63,89±6,81***	5,09±0,51
ESC	250	3,64±0,14**	0,188±0,29	38,95±6,03 ^{***}	5,27±0,26
	500	3,63±0,14**	0,114±0,20	37,22±3,43***	5,31±0,41

Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=6). Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001). Curva Alcian Blue: y = 0,0017x - 0,0059; $R^2 = 0,9979$

A via de administração utilizada no modelo de ligadura de piloro é a intraduodenal, que permite investigar as ações do extrato por via sistêmica, não havendo interações do contato direto com a mucosa gástrica. Nesse modelo é possível avaliar alterações nos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico podendo ser considerada como atividade anti-secretória as substâncias que afetam a acidez gástrica (TOMA et al., 2004).

A secreção ácida gástrica é regulada por vias interdependentes que incluem o sistema nervoso central, o sistema nervoso entérico e uma rede de células neuroendócrinas e imunes, que atuam na modulação parácrina e hormonal

(SCHUBERT, 2004). Acredita-se que a secreção ácida seja liberada por reflexo vagal em decorrência da distensão gástrica. Este procedimento estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretar ácido clorídrico (BAGGIO et al., 2005).

Com relação aos resultados obtidos (Tabela 26) observa-se que o extrato ESC (100, 250 e 500 mg/kg) e a ranitidina (100 mg/kg), não foram capazes de promover aumento na produção de muco na mucosa gástrica (Alcian Blue ligado) quando comparado ao grupo controle negativo. A carbenoxolona (200 mg/kg) mostrou-se efetiva, pois promoveu o aumento de muco.

O muco gástrico é um componente protetor importante no restabelecimento da integridade da mucosa. Ele tem um importante papel na prevenção da agressão mecânica ao epitélio além de fornecer um microambiente sobre a área lesionada que contribui significativamente para o reparo do dano. O muco consiste em um gel viscoso, elástico e transparente, formado por água (95%) e glicoproteínas (5%) (mucinas) sendo a primeira linha de defesa contra o ácido. Através da ligação da mucina ao corante Alcian Blue o muco pode ser quantificado (CORNE et al., 1974). O muco aderido juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio serve como uma barreira contra a autodigestão (PHILLIPSON et al., 2008; ALLEN, FLEMSTROM, 2005). As propriedades protetoras da barreira de muco dependem não somente da estrutura do gel, como também da quantidade ou espessura da parede que recobre a superfície da mucosa (WALLACE, 2006).

4.8.5 Participação do óxido nítrico e de grupos sulfidrilas (SH) na atividade gastroprotetora in vivo.

Substâncias vasodilatadoras liberadas pelo endotélio como o óxido nítrico (NO) e prostaciclinas protegem a mucosa gástrica contra a ação lesiva de vasoconstritores. Embora haja outras substâncias endógenas, a proteção gástrica mediada por modulação da circulação na mucosa tem sido atribuída principalmente ao NO (LAINE et al., 2008; KAWANO, TSUJI, 2000). A ação do NO pode ser bloqueada por inibidores de sua síntese como o L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster) (MATSUDA et al., 1999). Estudos demonstram que o pré-tratamento com L-NAME, acentua as lesões gástricas induzidas por etanol, pois a inibição pode resultar em distúrbios no fluxo de sangue, na secreção gástrica, entre outros fatores

(WALLACE 2001; MATSUDA et al., 1999). Quando os animais foram pré-tratados com L-NAME e tratados posteriormente com o extrato ESC (250 mg/kg) observou-se diminuição da gastroproteção (Figura 24 e Tabela 27). Ou seja, quando administrado L-NAME aos animais, o extrato perde parte de sua atividade gastroprotetora evidenciando que o NO pode estar envolvido na resposta protetora.

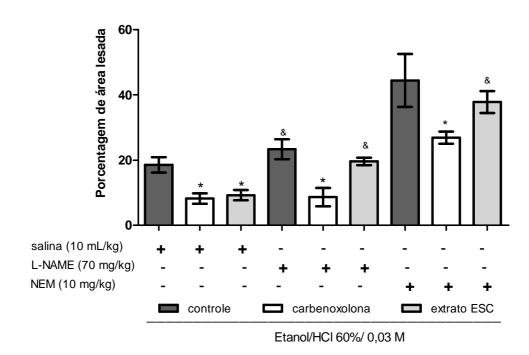


Figura 24. Gráfico do efeito da administração de extrato ESC (250 mg/kg) e carbenoxolona (200 mg/kg) por v.o. no modelo de úlceras gástricas induzidas por EtOH/HCI (60%/0,03N), associado a inibição da NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.) em camundongos. Cada barra representa a média dos experimentos seguida dos E.P.M.s. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Os grupos foram diferentes ($F_{8,52} = 31,90$; p<0,0001). Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e **p>0,01), carbenoxolona (8 p<0,05).

Tabela 27. Efeito da administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) do extrato ESC (250 mg/kg) em úlceras gástricas por etanol/HCl associado a inibição da NO-sintase (administração de L-NAME, 70 mg/kg, i.p.) e alquilação de grupamentos sulfidrilas (administração de NEM, 10 mg/kg, i.p.).

Tratamento	Dose	Tratamento	Área total de	Área relativa	Índice de
(v.o.)	(mg/kg)	(i.p.)	lesão (mm²)	lesada (%)	cura (%)
		Salina	38,41±8,62	18,53±2,36	-
Controle	-	L-NAME	40,632±5,80	23,32±3,06	-
		NEM	99,13±20,80	44,4±8,09	-
		Salina	10,83±3,22**	8,21±1,59*	57,24±6,81
Carbenoxolona	200	L-NAME	16,59±5,67*	8,65±2,81*	63,65±12,86
		NEM	38,65±4.94***	32,95±6,07	30,14±5,99
		Salina	12,04±3,63**	9,26±2,57*	54,16±5,08
ESC	250	L-NAME	37,23±4,86	19,42±1,70	18,90±5,34
		NEM	89,07±9,32 ^{&&}	37,29±3,81*	17,78±8,52

Os dados representam a média ± E.P.M. (n=6). Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (*p<0,05 e ***p<0,001), carbenoxolona (*p<0,05).

Altas concentrações de glutationa reduzida estão presentes na mucosa gástrica, representando o principal componente do conjunto de sulfidrilas nãoprotéicos endógenos (SZABO et al., 1981). O principal efeito da citoproteção por compostos sulfidrílicos é a preservação da microcirculação da mucosa através do sequestro de radicais livres (KONTUREK, 1990). Compostos sulfidrílicos não protéicos são capazes de ligar-se a radicais livres reativos bloqueando seus efeitos lesivos podendo influenciar as propriedades físicas do muco, visto que estes são unidos por pontes dissulfeto (SZABO et al., 1981). O gel mucoso é dissolvido através da redução por agentes tióis que destroem a estrutura da mucina, sendo que a glutationa pode proteger as pontes dissulfetos da redução (ALLEN; FLEMSTROM, 2005; AVILA et al., 1996). A administração de agentes bloqueadores de sulfidrilas reduz os níveis de sulfidrilas não-protéicos na mucosa gástrica (SZABO et al., 1981). Portanto, com o objetivo de avaliar o envolvimento de compostos sulfidrílicos na gastroproteção utilizou-se o N-etilmaleimida (NEM), um quelante das pontes dissulfetos, antes do tratamento com o extrato. Desta forma foi avaliada a participação de compostos sulfidrílicos no efeito gastroprotetor exercido pelo extrato ESC. Verificou-se que na presença do bloqueador dos compostos sulfidrílicos o

extrato ESC diminuiu seu efeito gastroprotetor, indicando que tal efeito é dependente de compostos sulfidrílicos endógenos (Figura 24 e Tabela 27). A pré-administração de NEM provocou um significativo aumento das lesões gástricas em todos os grupos experimentais, quando comparados aos grupos pré-tratados com salina (Figura 24).

O grupo tratado com a carbenoxolona, utilizada como controle positivo, apresentou diferenças estatísticas com os grupos controles. A carbenoxolona atua promovendo aumento da síntese de muco gástrico e dessa forma auxilia na proteção da mucosa contra as lesões gástricas (NAGAYAMA et al., 2001).

O extrato ESC exerceu gastroproteção tanto através do envolvimento de NO quanto de SH, indicando que seus efeitos sobre a mucosa gástrica estão dependentes, em parte, destes compostos para exercer seu mecanismo de ação.

4.9 Ensaio de citotoxidade

Para o ensaio de citotoxidade foram avaliados o extrato hidroetanólico (ESC), as frações FHex, FDCM, FAcOEt, FBuOH e Faq obtidas da partição do ESC e os compostos isolados cernumidina, friedelina e β -sitosterol.

O ensaio de XTT (Tabela 28) demonstrou que o ESC e as frações FHex e FDCM reduzem a viabilidade das células MCF-10A (linhagem normal) em concentrações acima de 156,6 μg/mL, enquanto que a viabilidade das células MCF-7 (linhagem cancerígena) é reduzida em concentrações a partir de 16,6 μg/mL demonstrando atuar mais sobre a linhagem cancerígena.

Tabela 28. Concentração Inibitória (CI₅₀) e Índice de Seletividade (IS) em linhagem de células de mama (MCF-10A e MCF-7) tratadas com diferentes concentrações das amostras.

	Cl ₅₀ (μg/mL)				
-	MCF-10A (normal)	MCF-7 (câncer)	VTT		
Amostras	хтт	XTT	XTT		
ESC	883,6±0,01	290,1±0,08	3,0		
FHEX	164,9±0,06	139,7±0,04	1,2		
FDCM	156,6 ±0,02	16,6±0,02	9,4		
FAcOEt	>1000	100,5±0,06	NC		
FBuOH	>1000	100,1±0,5	NC		
FAq	>1000	>1000	NC		
Cernumidina	121±0,01	82±0,02	1,47		
Friedelina	587,5±0,03	124,9±0,03	4,7		
β -sitosterol	22,3±0,05	34,8±0,03	0,64		

NC: não calculado/ IS: indice de seletividade = Cl₅₀ normal/ Cl₅₀ linhagem de câncer

As frações em FAcOEt, FBuOH e Faq, não exercem efeito citotóxico sobre a linhagem MCF-10A (> 1000 μg/mL) enquanto para a linhagem MCF-7, as frações em FAcOEt e FBuOH demonstram diminuir a viabilidade celular acima de 100 μg/mL.

Os resultados encontrados demonstram que as células neoplásicas MCF-7 exibem maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos das amostras testadas que as células MCF-10A. Suffness e Pezzuto (1990) descrevem que extratos são considerados promissores agentes citotóxicos quando ativos na concentração de até 30 µg/mL. Os valores encontrados são considerados elevados (>100 µg/mL) para o extrato e frações, exceto para a fração diclorometânica que demonstrou ser seletiva para células MCF-7 na concentração de 16,6 µg/mL com índice de seletividade (IS) de 9,4.

Grando et al. (2008) testaram dois triterpenos, cicloeucalenona e 24-oxo-31-norcicloartanona, isolados do extrato diclorometânico das folhas de *S. cernuum* sobre as seguintes linhagens tumorais: UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon), 786-O (renal) e NCI-ADR/RES (células de ovário expressando resistência a múltiplas drogas). O triterpeno cicloeucalenona não demonstrou atividade sobre nenhuma das linhagens

testadas e o composto 24-oxo-31-norcicloartanona, foi ativo apenas para a linhagem NCI-H460, atuando de forma seletiva.

O extrato ESC e o composto isolado cernumidina também foi testado frente as linhagens de melanoma (B16F10), adenocarcinoma cervical humano (HeLa), glioblastoma humano (MO59J) e fibroblastos (GM07492A) (Tabela 29).

Tabela 29. Concentração Inibitória (CI₅₀) e índice de seletividade (IS) para o extrato de *S. cernuum* e compostos isolados em linhagens celular normal e tumorais pelo ensaio de XTT.

1 : !	S. cernuum	S. cernuum	Cernumidina	Cernumidina
Linhagens	Cl ₅₀ (µg/mL)	IS	CI_{50} (µg/mL)	IS
GM07492A (fibroblasto)	777,47 ± 7,64		3586,00 ± 1,41	
B16F10	1196,00 ± 1,41	0,65	2521,00 ± 1,41	1,42
HeLa	$765,45 \pm 5,73$	1,01	ND	-
MO59J	$905,63 \pm 0,84$	0,85	ND	-

NC: não calculado/ IS: indice de seletividade = Cl₅₀ normal/ Cl₅₀ linhagem de câncer

O extrato ESC e o alcaloide cernumidina não apresentaram atividade frente as linhagens testadas na Tabela 29. Os indices de seletividade apresentados foram pequenos (IC < 3).

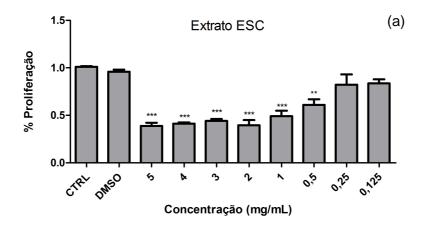
No trabalho de Lopes et al. (2011) o alcaloide cernumidina foi testado para diferentes linhagens tumorais: U251(glioma); UACC-62(melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário); 768-0, (renal); NCI-H460 (pulmão); PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon) e K562 (células leucêmicas). Porém, não foi citotóxico para nenhuma das linhagens testadas.

Alcaloides guanidínicos produzidos por espécies vegetais com diferentes origens biossintéticas são descritos na literatura apresentando atividade citotóxica: nitensidina A isolada de Pterogyne nitens (Fabaceae) demonstrou atividade contra linhagens de células do carcinoma cervical (BOZETO, 2011; BOLZANI et al., 1995); celogentinas produzidas pela espécie Celosia argentea (Amaranthaceae) impedir a formação dos microtúbulos durante a demonstrou (SUZUKI et al., 2004); galegina e seus derivados que atuam como agentes citotóxicos estão presentes nas espécies Schoenus asperocarpus (Cyperaceae), S. rigens (Cyperaceae) e Crassula argêntea (Crassulaceae) (REGASINI, 2008). Porém,

tais alcaloides guanidínicos apresentam estruturas bem diferentes do alcaloide cernumidina isolado no presente trabalho.

4.10 Ensaio com cultura de células de músculo liso de HPB

Nas figuras 25a e 25b apresentam-se o efeito, após 96 h de exposição, do extrato ESC e do alcaloide cernumidina, respectivamente, na proliferação da cultura primária de músculo liso de HPB. Para o extrato ESC, as concentrações de 5 à 0,5 mg/mL avaliadas apresentaram efeito significativo na redução da proliferação das células (p<0,05) comparando-se com o grupo controle, sendo o efeito máximo de inibição observado de 60%. Para o alcaloide cernumidina as concentrações de 1 à 0,4 mg/mL reduziram significativamente a proliferação (p<0,05) inibindo até 62% do crescimento celular. Além disso, observou-se o efeito concentração-resposta, ou seja, a medida que aumenta-se a concentração do alcaloide há maior morte celular (Figura 25).



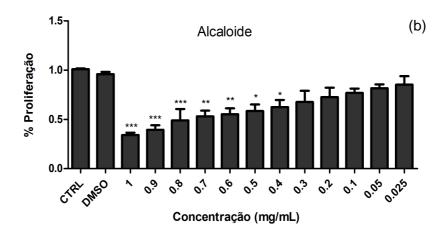


Figura 25. Efeito inibidor do extrato ESC **(a)** e do alcaloide cernumidina **(b)** na proliferação de células musculares de hiperplasia prostática benigna. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (CTRL) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ***p<0,001.

Entretanto, no presente estudo, não houve diferença estatística significativa na proliferação celular nos ensaios realizados nos tempos de 48 e 76 h para o extrato ESC e o alcaloide testado (dados não apresentados).

Nos ensaios de ciotoxidade com XTT, testando-se o extrato ESC e o alcaloide cernumidina, demonstram que tais amostras são seletivas para células de câncer. Pois, os valores encontrados de IC₅₀ para as linhagens de fibroblastos (GM07492A) e de mama (MCF-10 normal) foram altos.

Lopes et al. (2011) testaram o alcaloide cernumidina para a linhagem tumoral de próstata PC-3, porém tal composto não apresentou atividade. Na literatura, a maioria dos produtos naturais são testados frente a linhagens de células de câncer, pois essas são de fácil crescimento e exigem condições de cultura mais econômicas. Porém, as culturas primárias, principalmente para avaliação da HPB,

fornecem vantagens por representarem melhor os aspectos associados com a biologia da doença (RUSSEL et al., 2015; WHITTLE et al., 2015; GILLETA et al., 2011; ELLIS, FIDLER, 2010).

Uma revisão da literatura realizada por Allkanjari e Vitalone (2015) descreve o uso da fitoterapia no tratamento da HPB. Diversas partes vegetais de diferentes espécies, como por exemplo, *Serenoa repens* (Aricaceae), *Pygeum africanum* (Rosaceae), *Curcubita pepo* (Cucurbitaceae) e *Urtica dioica* (Urticaceae) tem sido utilizadas em pacientes com sintomas leves a moderados. Com base em estudos pré-clínicos, utilizando tais espécies, vários mecanismos de ação têm sido propostos, incluindo a inibição 5α -reductase, o antagonismo α -adrenérgico e a inibição do receptor de estrógeno. Ensaios clínicos randomizados indicam significativa eficácia na melhora dos sintomas urinários e efeitos adversos da HPB quando utilizado espécies vegetais.

De acordo com os resultados encontrados de redução na proliferação celular de cultura primária de músculo liso de HPB pode-se sugerir que o extrato ESC e o alcaloide cernumidina poderiam agir por meio da redução do volume prostático na HPB, melhorando os sintomas relatados no uso popular.

4.10.1 Efeito do extrato ESC e do alcaloide na indução de apoptose

Para avaliar se os efeitos citotóxicos encontrados não apresentavam somente diminuição da proliferação celular, foi avaliada a porcentagem de células apoptóticas após 96 h com o tratamento do extrato ESC (concentrações de 2; 0,5 e 0,125 mg/mL) e com o alcaloide cernumidina (concentrações de 1 mg/mL (3,3 x 10⁻⁶ M); 0,5 mg/mL (1,6 x 10⁻⁶ M) e 0,05 mg/mL (1,6 x 10⁻⁷ M)). Tais concentrações foram selecionadas baseando-se no teste preliminar de proliferação celular e para verificar se o extrato e o alcaloide apresentariam efeito concentração-resposta.

Para o extrato ESC foi observada uma indução significativa de apoptose nas concentrações de 2 e 0,5 mg/mL e essa indução alcançou um efeito máximo de 53% na maior concentração (p<0,05) (Figura 26a).

Nas células tratadas com o alcaloide cernumidina foi possível observar elevada indução de morte celular por apoptose em todas as concentrações

comparando-se com o controle: 52,93%, 44,06% e 32,05% para as concentrações de 1; 0,5 e 0,05 mg/mL, respectivamente (Figura 26b).

Foi possível observar nos gráficos da Figura 26 que a morte celular por apoptose apresentaram efeito concentração-resposta.

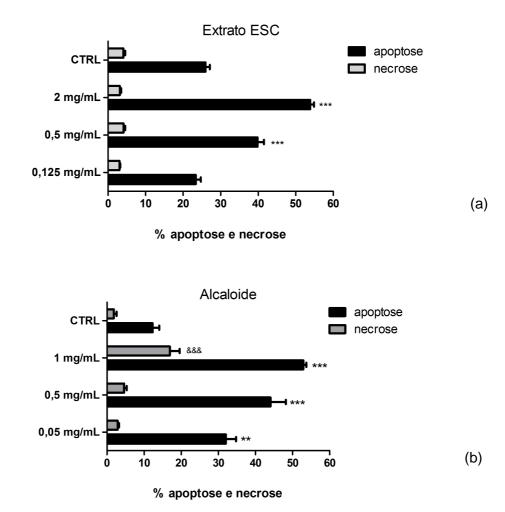


Figura 26. Efeito do extrato ESC e do alcaloide em diferentes concentrações na indução de apoptose. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao grupo controle (CTRL) **p<0,01 e ***p<0,001.

Estímulos tóxicos ou deletérios à célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares. A apoptose é um processo fisiológico regulado de morte celular programada e desempenha um papel importante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos (BRAS et al., 2005). É caracterizada por alterações que incluem condensação da cromatina e fragmentação do DNA, formação de prolongamentos na membrana plasmática formando corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos e

removidos sem causarem resposta inflamatória (LIAO et. al., 2005; YASUHARA et al., 2003). Já a necrose é definida como uma forma violenta de morte celular (BRAS et al., 2005). Durante a necrose, as células sofrem uma transformação que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular (citólise) (BOUJRAD et al., 2007; HAIL et al., 2006; KERR et al., 1995).

Na maior concentração testada do alcaloide, 1 mg/mL, observou-se diferença significativa de morte celular por necrose comparando-se com o controle: 16,94% (Figura 26b). Tal processo de morte não é controlado afetando grandes áreas teciduais, logo, não desejado para a célula. Sendo assim, pode-se sugerir que concentrações menores do alcaloide, que provocam apenas morte por apoptose, sejam mais vantajosas para uma possível aplicação clínica.

O alcaloide guanidínico nitensidina A foi avaliado por Bozeto (2011) quanto ao seu potencial efeito indutor de apoptose em linhagens SiHa (linhagem de carcinoma cervical imortalizada pelo HPV-16) e C33A (linhagem não imortalizada pelo HPV) tratadas com 0,25; 0,74; 2,22; 6,66 e 20,0 μg/mL do composto. Para referidas linhagens foi possível detectar elevada indução de morte celular por apoptose nos tempos de 24 e 48 h, sendo que, na maior concentração de tratamento, 20 μg/mL, observou-se uma menor taxa de morte celular por apoptose e subsequente aumento de morte por necrose, como ocorrido na maior concentração do alcaloide guanidínico cernumidina avaliado em nossos testes.

A atividade na indução de apoptose em linhagem de carcinoma epitelial (ZR 7531) foi avaliada para os alcaloides guanidínicos, pteroginina e pteroginidina, isolados de *Pterogyne nitens* (Fabaceae-Caesalpinioideae). Tais compostos induziram, principalmente, morte celular por necrose após 24 h de exposição (DUARTE et al., 2010).

Diante do exposto, a cernumidina é um composto promissor na indução de morte celular. Porém, são necessários outros estudos para confirmar o mecanismo de ação desses no organismo humano.

4.11 Inibição de angiogênese

O ensaio de inibição da angiogênese, realizado em células HUVEC, demonstrou que a fração FBuOH (50 μg/mL) e o alcaloide cernumidina (50 μg/mL;

160 nM) inibiram a formação de vasos endoteliais em 62,75% e 77,73%, respectivamente, ao passo que o controle positivo, docetaxel, inibiu 80,33% (Figura 27).

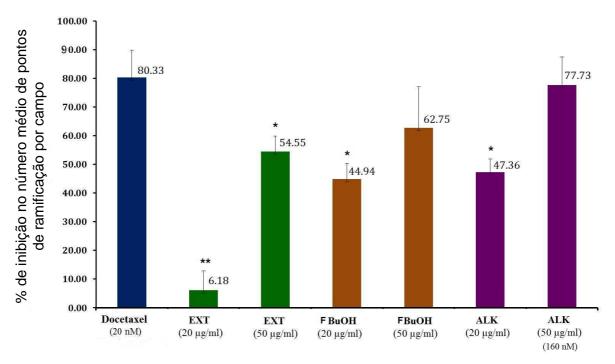


Figura 27. Gráfico da porcentagem de inibição no número de pontos de ramificação por campo. Análise estatística ANOVA seguida de teste de Tukey. Diferença significativa em relação ao controle positivo (*p<0,05 e ***p<0,001).

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência revelam a diminuição da formação de ramificações pela marcação com calceína AM (Figura 28). As imagens obtidas apresentam os controles e as concentrações de extratos e fração butanólica testadas.

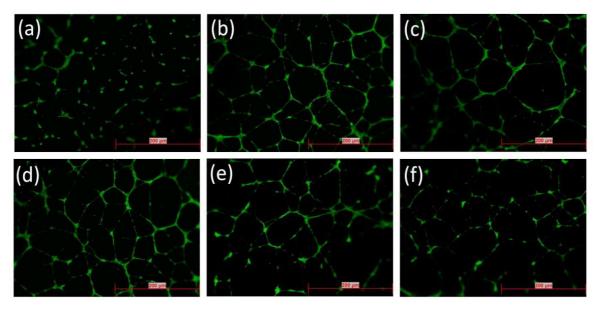


Figura 28. Imagens de microscópio de fluorescência de células HUVEC marcadas com calceína AM após 18 h de tratamento. (a) Docetaxel 20 nM; (b) EXT 20 μg/mL; (c) FBuOH 20 μg/mL; (d) controle (e) EXT 50 μg/mL; (f) FBuOH 50 μg/mL.

A fração butanólica, analisada por CLAE-UV pelo método descrito no item 3.2, apresentou, entre outros compostos, o alcaloide cernumidina, podendo inferir que tal atividade possa ser devida a presença de tal composto, sendo ele promissor para estudos futuros no tratamento de cânceres.

Sugerindo um possível mecanismo de ação, o alcaloide cernumidina poderia estar atuando na inibição do VEGF, reduzindo a proliferação de células endoteliais e sua migração. Outra proposta pode ser sugerida, a partir do trabalho realizado por Viana (2012), que observou a superexpressão do gene MAP3K3 (*mitogen-actived protein kinase 3*) bem como a presença do produto proteico desse gene, inferindo que eles podem ser responsáveis pela angiogênese resultando na proliferação celular irregular que ocorre na HPB. Como a espécie *S. cernuum* é utilizada popularmente para a prevenção e tratamento da HPB pode-se sugerir que a inibição da angiogênese nessa patologia poderia ocorrer pela inativação da MAP3K3. Porém, outros testes precisam ser realizados para se confirmar tal hipótese.

Alcaloides, derivados de diferentes espécies vegetais, são descritos na literatura apresentando atividade de inibição da angiogênese. O alcaloide quinolizidínico punarnavina, isolado da espécie *Boerhaavia diffusa* inibiu a migração de células endoteliais e a formação capilar em células HUVEC. Além de inibir a expressão de metaloproteinase (MMP)-2 e MMP-9 em tais células na concentração de 50 µM (SARASWATI et al., 2013). Piperina, alcaloide majoritário presente em

Piper nigrum, também inibiu, após 72 h de exposição ao composto, a migração e formação de vasos em células HUVEC na concentração de 100 μg/mL (DOUCETTE et al., 2013). Os alcaloides harmina (derivado de *Peganum harmala*) e brucina (derivado de *Strychnos nux-vomica*) também são relatados apresentando atividade de inibição de angiogênese (SARASWATI, AGRAWAL, 2013; HAMSA, KUTTAN, 2010).

O extrato hidroalcoolico de própolis testado nas concentrações de 100 e 200 µg/mL inibiu a formação de vasos em células endoteliais em placa com Matrigel™ na porporção de 16,2 e 69,9%, respectivamente. Em ensaio realizado *in vivo*, testando-se extrato de própolis na dose de 450 mg/kg em ovo de galinhas fertilizados, houve inibição da angiogênese em 82,3% nas membranas do saco vitelino dos embriões. Essa atividade foi atribuída aos flavonoides e compostos fenólicos detectados no extrato de própolis (MENEGHELLI et al., 2013). Na fração butanólica, analisada por CLAE-UV, também foram detectados os flavonoides isolados da espécie *S. cernuum*, podendo tais compostos contribuir para tal atividade.

4.12 Atividade antimicrobiana

Foram testados o extrato ESC e as frações FHex, FDCM, FAcOEt, FBuOH e Faq, obtidas da partição do ESC nas concentrações de 400 a 0,195 µg/mL frente aos isolados de fungos e linhagens de bactérias propostas. Os valores obtidos neste ensaio para tais amostras estão descritos na Tabela 30.

Tabela 30. Valores de CIM e CBM das amostras testadas para atividade antimicrobiana.

Bactérias	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	Antibióticos CIM e CBM (µg/mL)
S. aureus	> 400	>400	Penicilina: 0,625
E. coli	> 400	> 400	Estreptomicina: 0,3125
P. aeruginosa	> 400	> 400	Estreptomicina: 0,781
S. choleraesuis	> 400	> 400	Estreptomicina: 1,562
H. pylori	100 (amostras D; A);	> 400	Claritromicina: 0,625
	200 (amostras E; H; B; Aq)		
N. gonorrhoeae	100 (amostras H; D);	> 400	Penicilina: 0,625
	200 (amostras E; A; B);		
	>400 (amostra Aq)		
Fungos			
C. albicans	> 400	>400	Fluconazol: 20
C. tropicalis	> 400	> 400	Fluconazol: 40
C. parapsilosis	50 (amostras H; D);	>400	Fluconazol: 2,5
	200 (amostras B; Aq);		
	>400 (amostra E; A)		
C. glabrata	100 (amostras D; H; A);	>400	Fluconazol: 20
	>400 (amostra B; Aq; E)		
C. krusei	>400	>400	Fluconazol: 20

^{*}H = fração hexânica; D = fração diclorometano; A = fração acetato; B = fração butanólica; Aq = fração aquosa; E= ESC.

Segundo o artigo de Ríos e Recio (2005) extratos e frações podem ser considerados promissores para a atividade antimicrobiana quando ativos na concentração menor ou igual a 100 µg/mL e os compostos isolados quando em concentração menor que 1 µg/mL. No ensaio realizado as frações FHex, FDCM e FAq demonstraram atividade frente a algumas linhagens testadas em diferentes concentrações.

No trabalho de Oliveira et al. (2007) não foi observado atividade para o extrato metanólico das folhas de *S. cernuum* frente a *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Os composto isolados cernumidina, friedelina e β -sitosterol foram testados frente às linhagens de bactérias H. pylori e N. gonorrhoeae e frente aos fungos

C. parapsilosis e C. glabrata nas concentrações de 100 a 0,049 μg/mL. Tais compostos avaliados apresentaram CIM e CBM maior que 100 μg/mL frente às linhagens testadas.

O alcaloide cernumidina também não apresentou atividade frente as linhagens *Bacillus cereus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Escherichia coli, Salmonella enterica, Pseudomonas aeruginosa* em ensaio realizado por Lopes et al. (2011). Diante desse relato e pelos resultados encontrados no presente trabalho, pode-se sugerir que os compostos ativos para a atividade antimicrobiana na espécie *S. cernuum* podem estar relacionados a outra classe de constituintes presentes na espécie e não identificado em nosso estudo.

Outro dado encontrado na literatura relata que extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de folhas e caules de diferentes indivíduos de *S. cernuum* demonstraram atividade antimicrobiana. De um total de 265 extratos de fungos obtidos, 64 (26,01%) demonstraram ser ativos. Dezoito extratos (28,12%) apresentaram atividade antibacteriana frente às linhagens de *E. coli* (ATCC 25922), *Bacteroides fragilis* (ATCC25285) e *S. aureus* (ATCC 12600) e 4 (6,25%) dos extratos de fungos endofíticos exibiram atividade antifúngica contra *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. krusei* (ATCC 2159) (VIEIRA et al., 2012). Diante desses dados pode-se levantar a hipótese que a atividade antimicrobiana para a espécie *S.cernuum* possa ser atribuída aos fungos endofíticos nela presentes e não relacionada aos seus compostos do metabolismo secundário.

4.13 Secagem do extrato ESC em *spray dryer*

Após a escolha dos adjuvantes (celulose microcristalina:aerosil (8:2)) e proporções desses com o extrato (1:1) realizou-se a secagem dos pós variando-se os fatores selecionados (temperatura, vazão e porcentagem de adjuvante) em diferentes níveis (item 3.11, Tabela 12) de acordo com o planejamento Box-Behnken.

Na Tabela 31 foram descritos os valores dos rendimentos obtidos em cada secagem. Pode-se notar que houve grande variação, porém, tais rendimentos ainda são considerados altos para a escala laboratorial (MARTINS, 2012; AMERI, MAA, 2006).

Tabela 31. Valores dos rendimentos do processo de secagem

Teste	Rendimento (%)
1	48,08
2	57,94
3	73,89
4	67,82
5	70,87
6	64,01
7	59,62
8	54,51
9	51,57
10	52,71
11	45,52
12	45,78
13	55,31
14	51,90
15	52,89

A precisão dos resultados no processo de secagem pode ser avaliada através das observações obtidas no nível central do planejamento experimental (testes 13, 14 e 15) em que os valores para as respostas estudadas não apresente grande variação. Em nosso trabalho os valores de rendimento para os testes de 13 a 15 variaram em até 6%, o que é considerado uma variação pequena.

A Tabela 32 descreve a análise estatística para o rendimento do processo de secagem. Como podemos observar somente a temperatura (T°C) ao quadrado exerceu influência no rendimento no nível de significância de 5%.

Tabela 32.	Análise	estatística	do	rendimento	dos	pós	obtidos	pelo	processo	de
secagem.										

Efeitos gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	8,36	8,36	0,2075	0,667826
Temperatura ²	386,29	386,28	9,5836	0,026983
Adjuvante	171,96	171,96	4,2662	0,093776
Adjuvante ²	36,15	36,15	0,8970	0,387085
Vazão	142,21	142,21	3,5283	0,119125
Vazão ²	29,14	29,14	0,7229	0,434012
Temperatura*Adjuvante	63,41	63,44	1,5740	0,265084
Temperatura*Vazão	0,766	0,766	0,0190	0,895759
Adjuvante*Vazão	0,194	0,194	0,0048	0,947433

Graus de liberdade =1

A Figura 29 apresenta a influência quadrática da temperatura. Observa-se que quanto maior a temperatura maior o rendimento do processo. Nota-se ainda que não foi observado efeito significativo da vazão (VAZ mL/min).

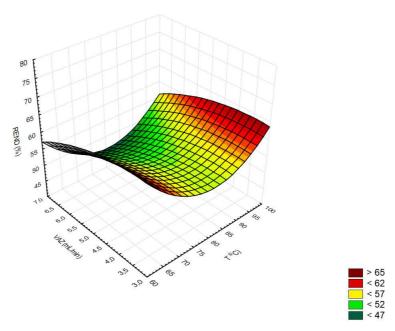


Figura 29. Gráfico da superfície de resposta do rendimento em função da temperatura e da vazão.

A temperatura é considerada um parâmetro que tem grande interferência no processo de secagem, por isso o motivo da escolha desse efeito. Na maioria dos

processos a temperatura e o rendimento são diretamente proporcionais (JANGAM, THORAT, 2010; ZHANG et al., 2010).

A equação resultante do ajuste do fator significante, temperatura ao quadrado, para o rendimento (REND (%)) do processo, com um R=0,9012, é descrita na Equação 7:

REN (%) =
$$54.83 + 10.23 [(T-80)/20]^2$$
 Equação 7

4.13.1 Caracterização dos extratos secos

A análise de propriedades farmacotécnica de pós é de grade importância no desenvolvimento de um medicamento seja ele de origem vegetal ou sintética (AULTON, 2005).

A caracterização dos pós obtidos compreendeu as análises de teor de umidade (TU), densidade aparente (da), densidade compacta (dc), fator de Hausner (FH), índice de Carr (IC), ângulo de repouso (AR), tamanho de partícula (D₅₀) e teor de cernumidina.

As características analisadas dos pós obtidos no processo de secagem por *spray dryer* e os valores obtidos nos diferentes testes foram descritos na Tabela 33.

Tabela 33. Características dos pós obtidos por *spray dryer*.

Amostra	TU	da	dc	FH	IC	AR	D ₅₀	Teor
	(%)					(°)	(µm)	
1	8,47	0,218	0,319	1,46	31,66	25	58,12	4,60
2	4,51	0,179	0,269	1,50	33,45	24	43,93	4,57
3	6,35	0,176	0,290	1,65	39,31	24	14,23	4,39
4	2,46	0,198	0,297	1,50	33,33	25	13,91	4,38
5	6,14	0,264	0,387	1,47	31,78	26	48,73	4,44
6	6,89	0,183	0,366	2,00	50	33	21,67	4,48
7	3,53	0,192	0,299	1,56	35,79	28	25,34	4,45
8	1,78	0,203	0,339	1,67	40,12	25	14,01	4,48
9	5,5	0,185	0,370	2,00	50	26	55,30	4,54
10	1,67	0,192	0,316	1,65	39,24	35	13,72	4,40
11	5,21	0,197	0,338	1,72	41,72	25	34,76	4,56
12	2,40	0,182	0,277	1,52	34,29	29	17,22	4,42
13	3,20	0,180	0,295	1,64	36,61	35	15,23	4,52
14	3,46	0,179	0,288	1,61	37,84	27	17,03	4,50
15	3,10	0,170	0,270	1,59	37	26	19,55	4,51

O IC pode ser definido como percentual de compactação de um pó, medida da resistência dos arranjos formados por um pó. O FH também relaciona a compactabilidade dos pós.

Na Tabela 33 pode-se observar que a *d*a variou de 0,170 a 0,264 g/cm³ e a *d*c de 0,269 a 0,387 g/cm³. Os valores obtidos para *d*a e *d*c foram utilizados para calcular o FH e o IC. Na Tabela 34, foram descritas as classificações dos pós segundo esses índices (USPXXX, 2007).

Tabela 34. Pro	opriedade do fluxo	dos pós rela	acionados ad	o FH e IC.
----------------	--------------------	--------------	--------------	------------

Propriedade de fluxo	FH	IC
Excelente	1,00-1,11	<10
Bom	1,12-1,18	11-15
Razoável	1,19-1,25	16-20
Tolerável	1,26-1,34	21-25
Ruim	1,35-1,45	26-31
Muito ruim	1,46-1,59	32-37
Extremamente ruim	>1,60	>38

Analisando estes índices para as partículas obtidas (Tabela 34), observa-se que a propriedade de fluxo dos pós pode ser classificada de muito ruim a extremamente ruim, uma vez que o FH variou de 1,46 a 2,00 e o IC de 31,66 a 50. Deve-se ressaltar que estas são medidas pontuais e relacionam-se a compactação do pó e dependem muito do método empregado (HEBERLÉ et al., 2000; USPXXX, 2007).

Além disso, pós derivados de extratos de plantas, secos por *spray dryer*, tendem a possuir uma baixa compactabilidade, isto ocorre devido ao pequeno tamanho de partícula formada, devido às altas pressões utilizadas para realização da atomização (formação das pequenas gotículas) (SOLLOHUB, CAL, 2010).

4.13.2 **Densidade aparente (***d***a)**

Como pode ser observado na Tabela 35, a Temperatura*Vazão influenciam de forma significativa, nível de significância de 5%, na densidade aparente.

Tabela 35. Análise estatística da densidade aparente dos pós obtidos pelo processo de secagem por *spray dryer*.

Efeitos gerais	SS	MS	F	P
Temperatura	0,000946	0,000946	5,3248	0,069118
Temperatura ²	0,001169	0,001169	6,5779	0,050356
Adjuvante	0,000120	0,000120	0,6761	0,448366
Adjuvante ²	0,000051	0,000051	0,2858	0,615854
Vazão	0,000313	0,000313	1,7587	0,242129
Vazão ²	0,000728	0,000728	4,0972	0,098845
Temperatura*Adjuvante	0,000930	0,000930	5,2354	0,070817
Temperatura*Vazão	0,002116	0,002116	11,9088	0,018220
Adjuvante*Vazão	0,000121	0,000121	0,6810	0,446817

Graus de liberdade =1

Na Figura 30 observa-se que o efeito dessas duas variáveis são lineares, mas se interagem, sendo que apenas se aumentarmos ambas, a vazão e temperatura, teremos uma menor da, ou seja, menor será a massa de pó que ocupará um determinado volume.

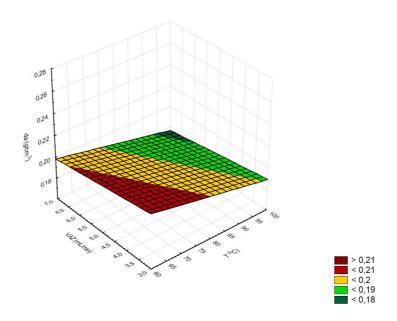


Figura 30. Gráfico de superfície de resposta da densidade aparente em função da temperatura e vazão.

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para a *da*, com um R=0,8654, é descrita na Equação 1.2:

$$da = 0.18 + 0.023 \{ [(VAZ-5)/2] \times [(T-80)/20] \}$$

Equação 8

4.13.3 **Densidade compacta (***d***c)**

Analisando a Tabela 36 nota-se que a Vazão e Vazão ao quadrado influenciam a densidade compacta no nível de significância de 5%.

Tabela 36. Análise estatística da densidade compacta dos pós obtidos pelo processo de secagem por *spray dryer*.

Efeitos gerais	SS	MS	F	Р
Temperatura	0,000072	0,000072	0,1343	0,728968
Temperatura ²	0,000940	0,000940	1,7545	0,242618
Adjuvante	0,001682	0,001682	3,1385	0,136671
Adjuvante ²	0,000158	0,000158	0,2948	0,610465
Vazão	0,004324	0,004324	8,0691	0,036220
Vazão ²	0,008316	0,008316	15,5172	0,010969
Temperatura*Adjuvante	0,000812	0,000812	1,5156	0,273035
Temperatura*Vazão	0,000930	0,000930	1,7358	0,244816
Adjuvante*Vazão	0,000012	0,000012	0,0229	0,885739

Graus de liberdade =1

Na Figura 31 observa-se que à medida que a vazão diminui haverá aumento da *d*c.

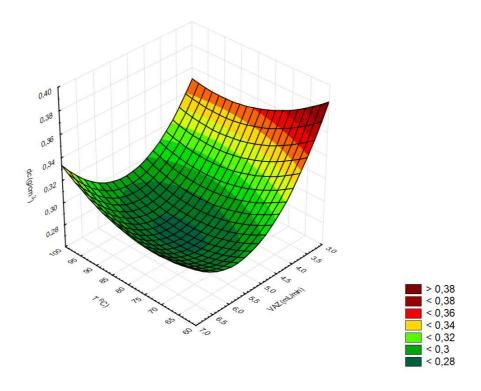


Figura 31. Gráfico de superfície de resposta da densidade compacta em função da temperatura e da vazão.

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para a *dc*, com um R=0,9301, é descrita na equação 9:

$$dc = 0.28 - 0.023 [(VAZ-5)/2] + 0.047 [(VAZ-5)/2]^2$$
 Equação 9

4.13.4 Ângulo de repouso (α)

O ângulo de repouso está diretamente ligado às propriedades de fluxo de um sólido. Valor pequeno para o ângulo de repouso corresponde a um bom fluxo do sólido e baixo atrito entre as partículas do mesmo (AULTON, 2005).

Os valores obtidos nesse estudo para o ângulo de repouso variaram de 24 a 35° (Tabela 33). Tais valores indicam que o fluxo d as micropartículas produzidas por *spray dryer* foram de excelente a boa, conforme classificação feita pela USPXXX (2007) (Tabela 37).

Tabela 37. Relação entre ângulo de repouso e fluidez (USP XXX, 2007).

Ângulo de repouso (α)	Fluidez
25-30°	excelente
31-35°	bom
36-40°	moderado
41-45°	tolerável
46-55°	ruim
56-65°	muito ruim

Não foi possível ajustar um modelo correlacionando os fatores estudados e o ângulo de repouso (R²=0,000). Assim, nenhum dos fatores foi significativo para esta resposta.

4.13.5 Teor de umidade (TU)

O teor de umidade de um produto seco pode ser considerado como um indicador de qualidade do pó e do processo de secagem, além de ser importante para manter a estabilidade química, microbiológica e influenciar nas propriedades físicas como compactação, fluidez, densidade, aglomeração e distribuição de tamanho de partícula do pó. Para extratos secos por *spray dryer* é considerada adequada umidade entre 3 e 7% (COUTO et al., 2011). Como pode-se observar na Tabela 33 apenas o pó obtido no teste 1 apresentou teor de umidade maior que 7%. Os valores obtidos para os testes foram satisfatórios, considerando ainda, que todos os experimentos de secagem foram realizados em temperaturas iguais ou abaixo de 100°C (JANGAM, THORAT, 2010; ZHANG et al., 2010).

Na análise estatística da umidade nenhum fator influenciou de forma significante (p<0,05).

4.13.6 Tamanho das partículas (D₅₀)

O tamanho de partícula também é de fundamental importância na caracterização de um pó. Os resultados do diâmetro médio (D_{50}) obtidos para as micropartículas produzidas por *spray dryer* utilizando planejamento fatorial Box-

Benhken foram apresentados na Tabela 33. Os valores de D_{50} das partículas variaram de 13,72 a 58,12 μm .

Partículas muito pequenas não são desejadas, uma vez que tendem a se aglomerar prejudicando a liberação do ativo e as propriedades de fluxo do pó, influenciando negativamente a produção de comprimidos e cápsulas (AULTON, 2005).

A análise estatística feita para o tamanho médio de partícula, D₅₀, encontra-se na Tabela 38. Como pode ser observado, quatro são os fatores que influenciam de forma significativa, nível de significância de 5%, no tamanho de partícula.

Tabela 38. Análise estatística do tamanho médio de partícula dos pós obtidos pelo processo de secagem por *spray dryer*.

Efeitos gerais	SS	MS	F	Р
Temperatura	349,80	349,80	13,19234	0,015027
Temperatura ²	143,42	143,42	5,40907	0,067569
Adjuvante	2212,12	2212,12	83,42757	0,000264
Adjuvante ²	302,07	302,07	11,39241	0,019776
Vazão	289,08	289,08	10,90235	0,021431
Vazão ²	57,17	57,17	2,15619	0,201930
Temperatura*Adjuvante	48,09	48,09	1,81382	0,235873
Temperatura*Vazão	61,85	61,85	2,33291	0,187198
Adjuvante*Vazão	144,48	144,48	5,44891	0,066853

Graus de liberdade =1

Nas Figuras 32a e 32b observa-se que a temperatura e vazão atuam de forma linear, ao passo que a porcentagem de adjuvante influencia tanto linearmente quanto de forma quadrática.

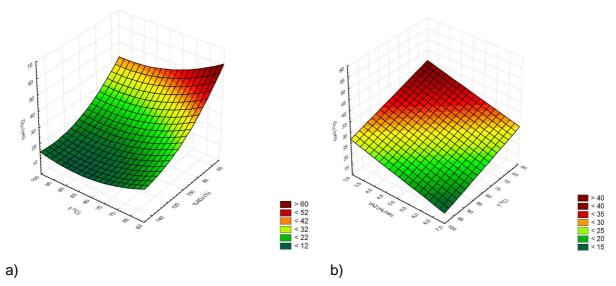


Figura 32. Gráfico de superfície de resposta para o D_{50} : a) em função da temperatura e porcentagem de adjuvante; b) em função da temperatura e da vazão.

Pelos gráficos (Figura 32) apresentados podemos observar que para obter menor D_{50} deve-se utilizar maior temperatura e menor vazão, ao passo que para o adjuvante quanto maior sua porcentagem, menor serão as partículas.

A equação resultante do ajuste dos fatores significantes para o D_{50} , com um R=0,9818, é descrita na equação 10:

$$D_{50} = 17,27 - 6,61 [(T-80)/20] - 16,63 [(ADJ-100)/50] + 9,05 [(ADJ-100)/50]^2 - 6,01[(VAZ-5)/2]$$
 Equação 10

4.13.7 Quantificação do marcador cernumidina

A Resolução-RDC 14 de 31 de março de 2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos define marcardor como: composto ou classe de compostos químicos (ex: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento fitoterápico (BRASIL, 2010). Como a espécie em questão apresenta compostos comuns a outras espécies vegetais, como a afzelina e quercitrina, optou-se por utilizar o alcaloide cernumidina como marcador uma vez que tal composto só foi descrito na literatura para *S. cernuum*, podendo ser utilizado dessa forma como um identificador da espécie.

Os resultados obtidos para o teor de cernumidina variaram de 4,38 a 4,60 % (Tabela 33) demonstrando que os valores obtidos experimentalmente estão próximos da quantificação de tal composto no extrato bruto (4,8%). A proximidade dos valores indica que não houveram muitas perdas durante o processo e ainda comprovam a eficiência da técnica de *spray dryer*.

A análise estatística das variáveis estudadas no processo de *spray dryer* e os resultados obtidos para o teor de cernumidina presente nas micropartículas estão descritos na Tabela 39.

Tabela 39. Análise estatística do teor de cernumidina presente nos pós obtidos pelo processo de secagem por *spray dryer*.

Efeitos gerais	SS	MS	F	Р
Temperatura	0,00011	0,00011	0,16	0,709879
Temperatura ²	0,00167	0,00167	2,30	0,189839
Adjuvante	0,05780	0,05780	79,72	0,000294
Adjuvante ²	0,00005	0,00005	0,07	0,799684
Vazão	0,00031	0,00031	0,43	0,540491
Vazão ²	0,00254	0,00254	3,51	0,119903
Temperatura*Adjuvante	0,00010	0,00010	0,14	0,725564
Temperatura*Vazão	0,00002	0,00002	0,03	0,859982
Adjuvante*Vazão	0,00000	0,00000	0,00	1,000000

Graus de liberdade =1

A Tabela 39 demonstra que o fator porcentagem de adjuvante influencia de forma linear (nível de significância de 5%) no teor de cernumidina. O aumento da concentração de adjuvante pode aumentar o teor do marcador, como observado na Figura 33.

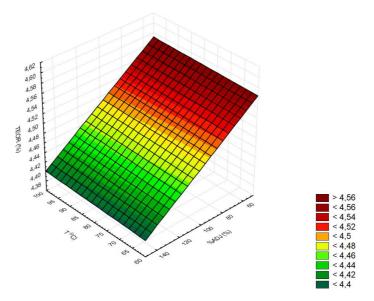


Figura 33. Gráfico de superfície de resposta para o teor (%) de cernumidina em função da temperatura e da porcentagem de adjuvante.

A equação resultante do ajuste do fator porcentagem de adjuvante para o teor de cernumidina, com um R= 0,9721, é descrita na Equação 11:

Teor (%) =
$$4,51 - 0,085$$
 [(ADJ-100)/50] Equação 11

4.13.8 Otimização das condições de secagem

O planejamento fatorial é uma ferramenta importante para orientar quais características deseja-se obter e quais fatores podem ser melhorados (BOX et al., 1978; PERALTA et al., 2005). O método matemático da desejabilidade pode fornercer as melhores combinações dos parâmetros escolhidos que permitam as respostas mais desejáveis (COLOMBARI, 2004).

Neste tipo de análise, escolhe-se quais variáveis deseja-se otimizar e qual o peso de cada uma na resposta global. Assim, quanto maior for o coeficiente de resposta (mais próximo de 1), denominado de índice de desejabilidade global, mais otimizada será a resposta.

No presente trabalho selecionou-se o rendimento e o teor de marcador (cernumidina) como respostas mais relevantes. Os valores das respostas para se obter o ponto ótimo das condições de secagem foram selecionados a partir dos resultados encontrados no planejamento Box-Behnken. Os valores selecionados como baixo, alto e a resposta desejada para cada fator estão descritas na tabela 40.

Tabela 40. Valores estabelecidos para as respostas estudadas no processo de secagem para realizar a função desejabilidade.

Pagnagtas	Valores					
Respostas	Objetivo	Baixo	Alto	Alvo	- Peso	
Rendimento	maximizar	50	70	70	1	
Teor de marcador	maximizar	4,00	4,50	4,50	1	

Na Figura 34 podemos observar que o índice de desejabilidade global foi de 0,877 e que os níveis das variáveis codificados foram: -0,8491(codT) para a temperatura; 0,7263 (codADJ) para a porcentagem de adjuvante e -0,8281 (codVAZ) para a vazão. Para descodificar os níveis utilizou-se as equações abaixo:

Temperatura: codT = (T-80)/20 Equação 12

% de adjuvante: codADJ = (ADJ-100)/50 Equação 13

Vazão: codVAZ = (VAZ-5)/2 Equação 14

Os valores reais, de acordo com as equações, corresponderam a 63°C para a temperatura, 136,3% de adjuvante e de 3,34 mL/min da vazão.

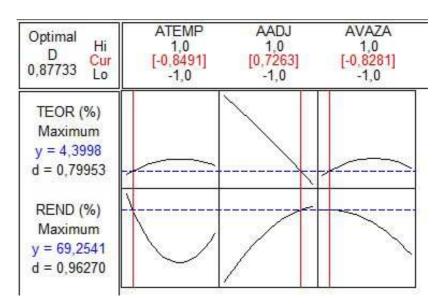


Figura 34. Gráfico da desejabilidade com os níveis das variáveis

Na análise de otimização de resposta, além do índice de desejabilidade global é possível estimar também os valores propostos e calculados pelo programa *Minitab*[®] das respostas escolhidas. Na Figura 34 observa-se que o valor proposto para o teor foi de 4,4% e para o rendimento de 69,3%.

Dessa forma realizou-se uma secagem no *spray dryer* do extrato utilizando-se os valores reais para se obter o máximo de resposta. Do pó obtido determinou-se o rendimento, o teor de umidade (TU), a densidade aparente (da) e compacta (dc), o Fator de Hausner (FH), o índice de Carr (IC), o ângulo de repouso (AR), o D₅₀, o teor de marcador e a estabilidade preliminar. Na Tabela 41 são apresentados os valores obtidos para alguns itens avaliados.

Tabela 41. Caracterização do pó otimizado obtido por spray dryer.

Rendimento	TU	da dc	dc	FH	IC	AR (°)	D ₅₀	Teor
	(%)	ua	uc i	• • •	10		(µm)	
67, 21	4,38	0,219	0,318	1,46	31,13	26	14,79	4,12

Observando as Tabelas 40 e 41 nota-se a proximidade dos valores preditos para rendimento do pó e teor de cernumidina com os valores reais, evidenciando a confiabilidade do método matemático da desejabilidade. Dessa forma, demonstra-se que tal ferramenta pode ser utilizada em diferentes tipos de experimentos e processos, incluindo ambientes industriais (COLOMBARI, 2004).

Essa ferramenta possibilita uma maior abrangência dos resultados e pode ajudar a tomar decisões quando se depara com processos em que há uma grande variedade de respostas através do auxílio matemático (TACON, 2012).

4.13.9 Ensaio de estabilidade

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado para o pó otimizado pela função desejabilidade.

Como pode-se observar na Figura 35 houve uma redução muito pequena do teor de cernumidina durante o ensaio de estabilidade. Os teores encontrados para o marcador variaram de 4,07 a 4,09 µg/mL no decorrer do experimento.

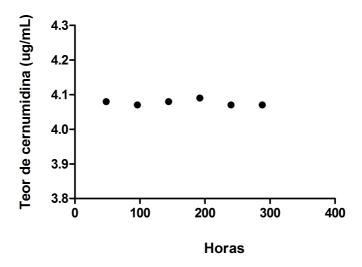


Figura 35. Teor de cernumidina durante o teste de estabilidade preliminar do pó otimizado pela função desejabilidade.

Pode-se concluir que o teor do alcaloide cernumidina apresentou-se estável no teste. Tal fato pode sugerir que trabalhos futuros utilizando formulações contendo tal extrato possam apresentar boa estabilidade desse marcardor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados pode-se concluir que:

A partir dos diversos fracionamentos do extrato hidroetanólico foram isolados e identificados quatro compostos presentes nas folhas de *S. cernuum*: ácido transisoferulico, cernumidina, quercitrina e afzelina.

Da fração em heptano, obtida da partição do extrato em acetato de etila das folhas de *S. cernuum*, formam isolados dois compostos: o esteroide β -sitosterol e o o triterpeno friedelina.

O teor de constituintes isolados presentes no extrato ESC foram: 1,5% de acido trans-isoferúlico, 4,8% de cernumidina; 1,3% de quercitrina e 1,6% de afzelina.

Não foi possível obter óleo das folhas de *S. cernuum*. Porém, o hidrolato foi particionado em diclorometano e sua composição determinada por CG/EM.

Os tricomas de *S. cernuum* são majoritariamente estrelados do tipo tectores.

Nos ensaios antimicrobianos realizados, apenas as frações FHex, FDCM e Faq apresentaram atividade frente a algumas linhagens de micro-organismos em diferentes concentrações.

No ensaio do XTT a fração diclorometânica (FDCM) e o composto friedelina foram seletivos para as células MCF-7 na concentração de 16,6 e 124,9 μ g/mL, respectivamente.

O extrato hidroetanólico das folhas de *S. cernuum* (ESC) apresentou atividade gastroprotetora nos ensaios de indução de úlcera por etanol/HCl e por anti-inflamatório não esteroidal (AINE), além de apresentar efeito curativo, na dose de 250 mg/kg, no ensaio de úlcera crônica induzida por ácido acético.

Os composto isolados, exceto o alcaloide cernumidina, apresentaram atividade gastroprotetora pelo ensaio de indução de úlcera por etanol/HCl na dose de 30 mg/kg.

Na avaliação de pH, pelo ensaio de ligadura de piloro, todos os grupos tratados com extrato não apresentaram diminuição da acidez estomacal. Porém, houve diminuição da concentração de íons hidrogênio ([H⁺] mEq.g⁻¹/L) na secreção gástrica nos grupos tratados com o extrato ESC. Observou-se, ainda, que não houve aumento na produção de muco na mucosa gástrica dos grupos tratados com o extrato ESC.

A avaliação da ação gastroprotetora por inibição da enzima iNOS e alquilação de grupos sulfidrilas permitiu inferir que na atividade gastroprotetora do extrato podem estar envolvidos o óxido nítrico e grupos sulfidrilas.

No ensaio de proliferação celular em cultura primária de músculo liso de HPB houve inibição o crescimento celular em 60% para o extrato ESC na concentração de 3 mg/mL e de 62% para o alcaloide cernumidina na concentração de 1 mg/mL (3,3 x 10⁻⁶ M) após 96 h de exposição. Com o intuito de avaliar o potencial efeito indutor de apoptose, foi realizado também o ensaio de anexina por citometria de fluxo. Tanto para o extrato ESC como para o acaloide cernumidina observou-se que a morte ocorreu mais por apoptose. Apenas para o alcaloide, na concentração de 1 mg/mL, houve significativa morte por necrose.

O ensaio de inibição da angiogênese, realizado em células HUVEC, demonstrou que a fração FBuOH (50 μg/mL) e o alcaloide cernumidina (50 μg/mL; 160 nM) inibiram a formação de vasos endoteliais em 62,75% e 77,73%, respectivamente.

Na secagem do extrato por *spray dryer* o rendimento, a densidade aparente, a densidade compacta, o tamanho das partículas (D_{50}) e o teor sofrem inlfuência de algum dos fatores avaliados: temperatura, vazão e porcentagem de adjuvante, linearmente ou na forma quadrática.

Na otimização da secagem por *spray dryer* utilizando a função desejabilidade observou-se a proximidade dos valores preditos para rendimento do pó e teor de cernumidina com os valores reais, evidenciando a confiabilidade desse método matemático.

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perpectivas para o estudo do potencial de *S. cernuum* com vistas ao desenvolvimento de novos fitoterápicos.

6 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, A.; LIPSON, K.E.; SCKELL, A.; ZIEHER, H.; KLENKE, F.; POERSCHKE, D. Combined therapy with direct and indirect angiogenisis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. **Cancer Research**. v. 63, p. 8890-8898, 2003.

ADENLEA, A.A.; STEVENS, C.; BRIDGEWATER, P. Global conservation and management of biodiversity in developing countries: An opportunity for a new approach. **Environmental Science & Policy**. v. 45, p. 104-108, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia de Estabilidade de produtos Cosméticos, 1ª ed. Brasília. 2004.

AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. 1 ed. The Netherlands, Elsevier, p. 336-337, 1989.

AKHAVAN, M.; JAHANGIRI, S.; SHAFAGHAT, A. Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonosciadium brachytaenium* (Boiss.) **Industrial Crops and Products**. v. 63, p. 114-118, 2015.

AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; TAMURA, T. Cycloartane triterpenes from the fruit peel of *Musa sapientum*. **Phytochemistry**. v. 47, p. 1107-1110, 1986.

ALESSANDRI, A.L.; SOUSA, L.P.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology Cell Physiology**. v. 288, p.1-19, 2005.

ALLKANJARI, O.; VITALONE, A. What do we know about phytotherapy of benign prostatic hyperplasia? **Life Sciences**. v. 126, p. 42-56, 2015.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species. Journal of **Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALMANÇA, C.C.J.; SALDANHA, S.V.; SOUSA, D.R.; TRIVILIN, L.O.; NUNES, L.C.; PORFÍRIO, L.C.; MARINHO, B.G. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 138, p. 508-512, 2011.

AMERI, M.; MAA, Y.-F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Drying Technology**. v. 24, p. 763-768, 2006.

AMERICAN UROLOGICAL ASSOCIATION (AUA). Practice Guidelines Committee. AUA guideline on management of benign prostatic hyperplasia. Chapter 1: Diagnosis and treatment recommendations. **The Journal of Urology**. v. 170, p. 530-547, 2003.

ALVES, T.M.A.; MARENGO, S.; MACHADO, C.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.; ISAIAS, R.M.S.; STEHMANN, J.R.; ZANI, C. Morphological, anatomical, macro and micromolecular markers for *Solanum cernuum* identification. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 542-548, 2007.

ALVES, T.M.A.; LABANCA, L.; STEHMANN, J.R.; ZANI, C.L. Chemical constituents of the water calyx of *Solanum cernuum*. Brief Communications. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 42, n. 3, p. 345-346, 2006.

ANDERSEN, O.M., MARKHAM, K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Taylor & Francis: Flórida. 2006.

ANDRADE, S. F. DE; LEMOS, M.; COMUNELLO, E.; NOLDIN, V. F.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, n. 2, p. 252-257, 2007.

ANTHONY, T.; RAJESH, T.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 2, p. 872-877, 2009.

ANTONISAMY, P.; DURAIPANDIYAN, V.; ARAVINTHAN, A.; AL-DHABI, N.A.; IGNACIMUTHU, S.; CHOI, K.C.; KIM, J.H. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**. v. 750, p. 167-175, 2015.

ARAUJO, C.E.P.; RODRIGUES, R.F.O.; OLIVEIRA, F.; SCHREINER, L. Análise preliminar da atividade antiulcerogênica do extrato hidroetanólico de *Solanum cernuum* Vell. **Acta Farmaceutica Bonaerense.** v. 21, p. 283-286, 2002.

ARAUJO, R. R.; TEIXEIRA, C.C.C.; FREITAS, L.A.P. The preparation of ternary solid dispersions of an herbal drug via spray drying of liquid feed. **Drying Technology**. v. 28, n. 3, p. 412-421, 2010.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILLO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicinsensitive neurons. **Planta Medica**. v. 69, p. 905-909, 2003.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

AVILA, J.R.; LASTRA, A.D.L.; MARTIN, M.J.; MOTILVA, V.; LUQUE, I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**. v. 45, p. 83-88, 1996.

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, n 1, p. 117-120, 2010.

BAGGIO, C.H.; DE MARTINI-OTOFUJI, G.; SOUZA, W.M.; DE MORAES SANTOS, C.A.; TORRES, L.M.; RIECK, L.; DE ANDRADE MARQUES, M.C.; MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta Medica**. v. 71, p.733-738, 2005.

BARNABAS, C.G.G.; NAGARAJAN, S. Chemical and pharmacological studies on the leaves of *Solanum melongena*. **Fitoterapia**. v. 60, p. 77-78, 1989.

BARSTCH, G.; MULLER, H.R.; OBERHOLZER, M.; ROHR, H.P. Light microscopic stereological analysis of the normal human prostate and benign prostatic hyperplasia. **Journal of Urology**. v. 122, p. 487-491, 1979.

BARROS, M. P. DE; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. DE. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p. 372-377, 2008.

BATISTA, L.M.; DE ALMEIDA, A.B.; LIMA, G.R.; FALCÃO, H.S.; MAGRI, L.P.; LUIZ-FERREIRA, A.; DOS SANTOS, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R. Gastroprotective effects (in rodents) of a flavonoid rich fraction obtained from *Syngonanthus macrolepsis*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 66, n. 3, p. 445-452, 2014.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry.** v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K.F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittel Forschung - Drug Research**. v. 45, p. 697-700, 1995.

BERLINCK, R.G.S.; TRINDADE-SILVA, A.E.; SANTOS, M.F.C. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Product Reports**. v. 29, n. 12, p. 1369-1484, 2012.

BILLIS, A. Uropatologia da Próstata. 1ª Ed. Goiânia: UFG. 1997.

BLANKEMEYER, J.T.; MCWILLIAMS, M.L.; RAYBURN, J.R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology.** v. 36, p. 383-389, 1998.

BOLZANI, V.S.; GUNATILAKA, A.A.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**. v. 58, n. 11, p.1683-1688, 1995.

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

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**. v. 6, n. 21, p. 2612-2619, 2007.

BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.; KONNO, T.U.P., DUARTE, G.G.; SCIO, E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**. v. 47, p. 44-52, 2009.

BOX, M.; HUNTER, W.G; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York. 1978.

BOZETO, J.M.S. Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos nude BALB/c com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa). 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

BRASIL. Congresso. Senado. Resolução nº 14, de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, resolução nº 14, de 2010. **Coleção de leis da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, março. 2010.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry.** v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 99, p. 575-586, 2010.

CARDOSO, I.C.R.A.; BENFICA, M.G.A.; CHAMONE, C.B.; CASTRO, G.F.; PEIXOTO, K.B. Utilização do antígeno prostático específico (PSA livre/total) como indicador tumoral no diagnostico de câncer de próstata e hiperplasia benigna prostática. **Revista Brasileira de Análises Clinicas**. v. 32, n. 1, p. 3-6, 2000.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Parte C. v. 146, v. 60-78, 2007.

CHAM, B.E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Antitumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. **Planta Medica**. v. 53, p. 34-36, 1987.

CHAM, B.E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: Pre-clinical and clinical studies. **Journal of Pharmacology**. v. 9, p.113-118, 1994.

CHAM, B.E.; CHASE, T.R. Solasodine rhamnosyl glycosides cause apoptosis in cancer cells. Do they also prime the immune system resulting in long-term protection against cancer? **Planta Medica**. v.78, p. 349-353, 2012.

CHANG, Z.; CHOON, A.; FRIEDL, A. Endostatin binds to blood vessels *in situ* independent of heparin sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2-binding. **American Journal of Pathology**. v. 155, p. 71-76, 1999.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute (2006) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. Approved standard M7–A7.Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

COLOMBARI, R.R. Aplicação de delineamento de experimentos para o processo de solda a projeção. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Faculdade de Engenharia de Produção. Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2004.

CORNE, S.J.; MORRISSEY, S.M.; WOODS, R.J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier muçus. **Journal of Physiology**. v. 242, n. 2, p.116-117, 1974.

CORRÊA, M.P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro. 1984.

COUTO, R.O.; ARAÚJO, R.R.; TACON, L.A.; CONCEIÇÃO, E.C.; BARA, M.T.F.; PAULA, J.R.; FREITAS, L.A.P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via *spray drying*. **Drying Technology**. v. 29, p. 709-718, 2011.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**. v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**. v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CROFFORD, L.J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. **The Journal of Rheumatology**. v. 24, p. 15-19, 1997.

CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 16, n. 6, p. 495-502, 2000.

CRYER, B.; DUBOIS, A.The advent of highly selective inhibitors of cyclooxigenase. A review. **Prostaglandins**. v. 56, p. 341-361, 1998.

DAUNTER, B.; CHAM, B.E. Solasodine glycosides. *In vitro* preferential cytotoxicity for human cancer cells. **Cancer Letters**. v. 55, p. 209-220, 1990.

DEERING, R.E.; CHOONGKITTAWORN, M.; BIGLER, S.A.; ARAMBURU, E.; KING, J.; BRAWER, M.K. Morphometric quantitation of stroma in human bening prostatic hyperplasia. **Urology.** v. 44, p. 64-70, 1994.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**. v. 12, p. 214-219, 1980.

DING, X.; ZHU, F.; YANG, Y.; LI, M. Purification, antitumor activity *in vitro* of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*Solanum nigrum* L.). **Food Chemistry**. v. 141, p. 1181-1186, 2013.

DIVYA, K.; RAMALAKSHMI, K.; MURTHY, P.S.; RAO, L.J.M. Volatile oils from *Ferula asafoetida* varieties and their antimicrobial activity. **LWT - Food Science and Technology**. v. 59, n. 2, p. 774-779, 2014.

DOUCETTE, C.D.; HILCHIE, A.L.; LIWSKIA, R.; HOSKIN, D.W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 24, n. 1, p. 231-239, 2013.

DUARTE, R.A.; MELLO, E.R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D. H. S.; REGASINI; L. O.; SILVA, T. G. A.; MORAIS, M. C. C. XIMENES, V. F.; SOARES, C. P. Alkaloids extracted from Pterogyne nitens induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biology**. v. 31, n. 5, p. 513-522, 2010.

EDMONDS, J.M. Epidermal hair morphology in *Solanum* L. section *Solanum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 85, p. 153-167, 1982.

ELLIS, L.M.; FIDLER, I.J. Between bedside and bench. Finding the tumor copycat. **Nature**. v. 16, n. 9, p. 974-975, 2010.

EL-SAYED, K.A.; HAMANN, M.T.; EL-RAHMAN, H.A.A.; ZAGHLOUL, A.M. New pyrrole alkaloids from *Solanum sodomaeum*. **Journal Natural Product.** v. 61, p. 848-850, 1998.

EL-SEEDI, H.R.; SATA, N.; TORSSELL, K.B.; NISHIYAMA, S. New labdene diterpenes from *Eupatorium glutinosum*. **Journal of Natural Products**. v. 65, p. 728-729, 2002.

EL-SHINNAWY, N. A.; ABD-ELMAGEID, S. A.; ALSHAILABI, E. M. A. Evaluation of antiulcer activity of indole-3-carbinol and/or omeprazole on aspirin-induced gastric ulcer in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 4, p. 357-375, 2014.

EMBERTON, M.; ANDRIOLE, G.L.; ROSETTE, J.; DJAVAN, B.; HOEFNER, K.; VELA, N.R.; NORDLING, J.; ROEHRBORN, C.; SCHULMAN, C.; TEILLAC, P.; TUBARO, A.; NICKEL, J.C. Benign prostatic hyperplasia. A progressive disease of aging men. **Urology**. v. 61, n. 2, p. 267-273, 2003.

EVANS, W.C.; SOMANABANDHU, A. Nitrogencontaining non-steroidal secondary metabolites of *Solanum, Cyphomandra, Lycianthes* and *Margaranthus*. **Phytochemistry**. v. 19, p. 2351-2356, 1980.

FARJANA, A.; ZERIN, N.; KABIR, M.D.S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 4, Supplement 2, p. S920-S923, 2014,

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. São Paulo, Atheneu, 1988.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 597, p. 179-186, 2007.

FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action. **Experimental Cell Research**. v. 312, p. 594-606, 2005.

FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**. v. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J.; WATSON, K.; INGBER, D.; HANAHAN, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**. v. 339, p. 58-61, 1989.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenese: Therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**. v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FRANCO-SALINAS, G.; ROSETTE, J.J.M.H.C., MICHEL, M.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tamsulosin in its modified-release and oral controlled absorption system formulations. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 49, n. 3, p. 177-188, 2010.

FREITAS, L.A.P.; ANDRADE, T.C.; TEIXEIRA, C.C.C.; TACON, L.A.; TSUKADA, M. Innovative applications of *spray drying*. In: JOSÉ, M.J.S. **Advances in chemical engineering**, Kerala, Editora: Transworld Research Network, 2010. Cap. 1, p. 1-13.

FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; FINAU, J.; ANGINONI, M.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; MARQUEZ, M.C.A. Inhibition of H⁺/K⁺ ATPase in the gastroprotective effect of *Baccharis illinita* DC. **Journal of Pharmacology & Pharmacoterapeutics**. v. 60, p. 1105-1110, 2008.

FREITAS, J.C.; SATO, S.; OGATA, T.; KODAMA, M. Guanidine neurotoxins are released with the digestive fluid of crabs (*Crustacea*, Brachyura). **Toxicon**. v. 33, n. 2, p. 201-208, 1995.

GILLETA, J.P.; CALCAGNO, A.M.; VARMA, S.; MARINO, M.; GREEN, L.J.; VORA, M.I.; PATEL, C.; ORINA, J.N.; ELISEEVA, T.A.; SINGAL, V.; PADMANABHAN, R.; DAVIDSON, B.; GANAPATHI, R.; SOOD, A.K.; RUEDA, B.R.;. AMBUDKAR, S.V.; GOTTESMAN, M.M. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the

study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. **PNAS**. v. 108, n. 46, p. 18708-18713, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GORMELY, G.J.; STONER, E.; BRUSKEWITZ, R.C. IMPERATO-MCGINLEY, J.; WAISH, P.C.; MCCONNEL, J.D.; ANDRIOLE, G.L.; GELLER, J.; BRACKEN, B.R.; TENOVER, J.S.; VAUGHAN, D.; PAPPAS, F.; TAYLOR, A.; BINKOWITZ, B.; NG, J. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. **The New England Journal of Medicine**. v. 327, n. 17, p. 1185-1191, 1992.

GRANDO, R.; ANTÔNIO, M.A.; ARAÚJO, C.E.P.; SOARES, C.; MEDEIROS, M.A.; CARVALHO, J.E.; LOURENÇO, A.M.; LOPES, L.C. Antineoplastic 31-norcycloartanones from *Solanum cernuum* Vell. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 63, p. 507-514, 2008.

GRASER, G.; HARTMANN, T. Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. **Planta**. v. 211, p. 239-245, 2000.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: Farmacognosia-da planta ao medicamento. 5°ed. Porto Alegre-RS. Editora: UFRGS, p. 13-25, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2011. 1216 p.

HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**. v. 11 p. 889-904, 2006.

HAMSA, T.P.; KUTTAN, G. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both *in vivo* and *in vitro*. **European Journal of Pharmacology**. v. 649, n. 1-3, p. 64-73, 2010.

HEBERLÉ, G.; WEHRMANN, L.; PETROVICK, P. R. Caracterização do Produto Seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth. (Cecropiaceae). Acta Farmaceutica Bonaerense. v. 19, n. 3, p. 203-210, 2000.

HIRAISHI, H.; TERANO, A.; OTA, S.; MUTOH, H.; SUGIMOTO, T.; HARADA, T.; RAZANDI, M.; IVEY, K.J. Role for mucous glycoprotein in protecting cultured rat gastric-mucosal cells against toxic oxygen metabolites. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 121, p. 570-578, 1993.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; BRITO, A.R. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Medica**. v. 65, n. 4, p. 325-330, 1999.

IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; HONBU, T.; NOHARA, T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, p. 1198-1201, 2003.

JANGAM, S.V.; THORAT, B.N. Optimization of spray drying of *Ginger* extract. **Drying Technology**. v. 28, p. 1426-1434, 2010.

JAINU, M.; DEVI, C.S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 104, p. 156-163, 2006.

JORGE, R.M.; LEITE, J.P.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**. v. 183, p. 133-142, 2003.

KATERERE, D.R.; GRAY, A.I.; NASH, R.J.; WAIGH, R.D. Anti-microbial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**. v. 63, p. 81-88, 2003.

KATSURA Y.; TOMISHI, T.; INOUE, Y.; SAKANE, K.; MATSUMOTO, Y.; MORINAGA, C.; ISHIKAWA, H.; TAKASUGI, H. Anti-*Helicobacter pylori* agents. 1. 2-(Alkylguanidino)-4-furylthiazoles and related compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 40, n. 16, p. 2462-2465, 1997.

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

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods Cell Biology**. v. 46, p. 1-27, 1995.

KIKUCHI, E.; MENENDEZ, S.; OHORI, M. Inhibition of orthotopic human bladder tumor growth by lentiviral gene transfer of endostatin. **Clinical Cancer Research**. v. 10, p. 1835-1842, 2004.

KLEINER, D.; STELER-STEVENSON, W. Matrix metalloproteinases and metastasis. **Cancer Chemother Pharmacology**. v. 43, p. 42-51, 1999.

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

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; SANTIN, J. R.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. The therapeutic lead potential of metabolites obtained from natural sources for the treatment of peptic ulcer. **Phytochemistry Reviews**. v. 11, n. 4, p. 567-616, 2012.

KOCH, O.R.; PANI, G.; BORRELLO, S.; COLAVITTI, R.; CRAVERO, A.; FARRE, S.; GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 25, p. 191-198, 2004.

KONG, C. H.; CHEN, L. C.; XU, X. H.; WANG, P.; WANG, S. L. Allelochemicals and Activities in a Replanted Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook) Tree Ecosystem. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 11734-11739. 2008.

KONGKATHIP, N.; DHUMMA-UPAKORN, P.; KONGKATHIPK, B.; CHAWANANORASET, K.; ANGCHOMKAEO, P.; HATTHAKITPANICHAKUL, S. Study on cardiac contractility of cycloeuclonol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, p. 95-99, 2002.

KONTUREK, S.J. Mechanisms of gastroprotection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 174, p. 15-28, 1990.

KOUNTOURAS, J.; CHATZOPOULOS, D.; ZAVOS, C. Reactive oxygen metabolites and upper gastrointestinal diseases. **Hepatogastroenterology**. v. 48, p. 743-751, 2001.

KOVGANKO, N.V.; KASHKAN, N.Z.; BORISOV, E.V. 13 C NMR Spectra of functionally substituted 3-chloroderivatives of cholesterol and *β*-sitosterol. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 36, n. 6, p. 324-332, 2000.

KULKARNI, S.K.; JAIN, N.K.; SINGH, A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**. v. 22, p. 291-298, 2000.

KUMAR, A.; DEWAN, B.; RAMA, T. Evaluation of anti-ulcerogenic properties from the root of *Flemingia strobilifera*. **Journal of Basic Clinical Pharmacy**. v. 2, n. 1, p.33-39, 2011.

KUO, K.; HSU, S.; LI, Y.; LIN, W.; LIU, L.; CHANG, L.; LIN, C.; LIN, C.; SHEU, H. Anticancer activity evaluation of Solanum glycoalkaloid solamargina: triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 60, p. 1865-1873, 2000.

KWIECIEŃ, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; PAWLIK, M.W.; PAWLIK, W. W.; KWIECIEŃ, N.; KONTUREK, S.J. Gastroprotection by pentoxyfilline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 55, n. 2, p. 337-355, 2004.

LABMAQ do Brasil Ltda. **Manual de Operações do Mini-Spray Dryer MSD 0.5**. Depto de Engenharia, 2003.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ARCON DE LA, L.C.; MOTILVA, V.; MARTIN CALERO, M.J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 45-53, 2000.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Reviews in basic and clinical. **Gastroenterology**. v.135, p.41-60, 2008.

LAM, J.R.; SCHNEIDER, J.L.; ZHAO, W.; CORLEY, D.A. Proton Pump Inhibitor and Histamine 2 Receptor Antagonist Use and Vitamin B12 Deficiency. **Journal of the American Medical Association**. v. 310, n 22, p. 2435-2442, 2013.

LEE, H.N.; SURH, Y.J. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. **Biochemical Pharmacology**. v. 84, n. 10, p. 1340-1350, 2012.

LEE, J.H.; LEE, S.J.; CHOI, Y.H.; CHUNG, K.T.; JEONG, Y.K.; CHOI, B.T. Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Phytotherapy Research**. v. 20, p. 396-402, 2006.

LEPOR, H. The evolution of alpha-blockers for the treatment of benign prostatic hyperpalsia. **Reviews in Urology**. v. 8, suppl. 4, p. S3-S9, 2006.

LEWIS, D.A.; HANSON, D. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**. v. 28, p. 201-231, 1991.

LI, J. Factorial Designs. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**. v.1, p. 364-378, 2003.

LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 4, n. 4, p. 505-515, 2005.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience, Biotechonogy and Biochemistry**. v. 67, p. 2154-2159, 2003.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. Phytopharmaceutical technology. Londres, 1989.

LOPES, L.C.; DE CARVALHO, J.E.; KAKIMORE, M.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; MEDEIROS, M.A.; SPINDOLA, H.M.; ÁVILA-ROMÁN, J.; LOURENÇO, A.M.; MOTILVA, V. Pharmacological characterization of *Solanum cernuum* Vell.: 31-norcycloartanones with analgesic and anti-inflammatory properties. **Inflammopharmacology**. v. 22, n. 3, p. 179-185, 2014.

LOPES, L.C.; ROMAN, B.; MEDEIROS, M.A.; MUKHOPADHYAY, A.; UTRILLA, P.; GÁLVEZ, J.; MAURIÑO, S.G.; MOLTIVA, V.; LOURENÇO, A.; FELICIANO, A.S. Cernumidine and isocernumidine, new type of cyclic guanidine alkaloids from *Solanum cernuum*. **Tetrahedron Letters.** v. 52, p. 6392-6395, 2011.

LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa - Instituto Plantarum. 2ª ed. 2008. 576 p.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum. 2ª ed. 1992. 382p.

MACHADO, M.O. Obtenção de mircopartículas contendo dispersões sólidas de praziquantel por spray congealing. 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MACHADO, C.C.S. Determinação de marcadores anatômicos morfológicos micro e macromoleculares para a identificação de *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). 2001. 200 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, 2001.

MAKARIEVA, T.N.; TABAKMAHER, K.M.; GUZII, A.G.; DENISENKO, V.A.; DMITRENOK, P.S.; KUZMICH, A.S.; LEE, H.; STONIK, V.A. Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra*. **Tetrahedron Letters**. v. 53, n. 32, p. 4228-4231, 2012.

MARKHAM, K.R.; TERNAJ, B., STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T.J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids – III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivates. **Tetrahedron**. v. 34, p. 1389-1397, 1978.

MARTIN, M. J.; COELLO, L.; FERNANDEZ, R.; REYES, F.; RODRIGUEZ, A.; MURCIA, C.; GARRANZO, M.; MATEO, C.; SANCHEZ-SANCHO, F.; BUENO, S.; DE EGUILIOR, C.; FRANCESCH, A.; MUNT, S.; CUEVAS, C. Marine-sourced anticancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Journal of the American Chemical Society**. v. 135, p. 10164-10171, 2013.

MARTINS, R.M.; SIQUEIRA, S.; TACON, L.A.; FREITAS, L.A.P. Microstructured ternary solid dispersions to improve carbamazepine solubility. **Powder Technology**. v. 215, p. 156-165, 2012.

MASTERS, K. Spray Drying Handbook. 5th ed. New York, USA: Wiley, 1991.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats. **Life Science**. v.65, p. 27-32, 1999.

McCHESNEY, J.D.; VENKATARAMANA, S.K.; HENRIA, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**. v.68, p. 2015-2022, 2007.

McNEAL, J.E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. **Investivative Urology**. v. 15, p. 340-345, 1978.

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L.S.; FÉLIX, G.L.; SOMENSI, A.; TOMAZZOLI, M.; DA SILVA, D.A.; BERTI, F.V.; VELEIRINHO, M.B.; RECOUVREUX, D.O.S.; ZERI A.C.M.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An *in vitro* and *in vivo* study. **Microvascular Research**. v. 88, p. 1-11, 2013.

MENTZ, L.A.; OLIVEIRA, P.L.; SILVA, M.V. Tipologia dos tricomas das espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **Iheringia**. v. 54, p. 75-106, 2000.

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

MORIKAWA, T.; LI, N.; NAGAMOTO, A.; MATSUDA, H.; LI, X.; YOSHIKAWA, M. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). **Journal of Natural Products**. v. 69, p. 185-190, 2006.

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

MYERS, W.R. Response surface methodology. **Enciclopedia of Biopharmaceutical Statistics**. v. 1, p. 858-869, 2003.

NAGAYAMA, P.A.; OKWUASABA, F.K.; BINDA, L.G. Antidiarrhoel and antiulcerogenic effects of metanholic extract of *Asparagus pubescens* root in rats. **Journal of Ethopharmacology**. n. 72, p. 421-427, 2001.

NASCIMENTO, R.F.; SALES, I.R.P.; FORMIGA, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOBRAL, M.V.; TAVARES, J.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M. Activity of Alkaloids on Peptic Ulcer: What's New? **Molecules**. v. 20, p. 929-950, 2015.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J.L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, p. 383-388, 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Curr Cancer Drug Targets**. v. 2, p. 279-308, 2002.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras. Norma Aprovada. 2ª Ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Disponível em http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>. Acesso em: 23 nov. 2014.

NUGROHO, A.; CHOI, J.K.; PARK, J.H.; LEE, K.T.; CHA, B.C.; PARK, H.J. Two new flavonol glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their *in vitro* free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. **Planta Medica**. v. 75(4), p. 364-366, 2009.

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

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**. v. 48, n.1, p. 170-179, 2012.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, A.B. Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae. 2007. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curtiba, 2007.

OLIVEIRA, D.F.; PEREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, H.C.; CARVALHO, D.A.; SILVA, G.; NUNES, A.S.; ALVES, D.S.; CARVALHO, H.W. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**. v. 78, p. 142-145, 2007.

OMOSA, L. K.; AMUGUNE, B.; NDUNDAA, B.; MILUGO, T.K.; HEYDENREICH, M.; YENESEWA, A.; MIDIWOA, J.O. Antimicrobial flavonoids and diterpenoids from *Dodonaea angustifólia*. **South African Journal of Botany**. v. 91, p. 58-62, 2014.

ONDEYKA, J.G.; JAYASURIYA, H.; HERATH, K.B.; GUAN, Z.; SCHULMAN, M.; COLLADO, J.; DOMBROWSKI, A.W.; KOWN, S.S.; MCCALLUM, C.; SHARMA, N.; MMECNAUL, K.; HAYES, N.; MENKE, J.; SINGH, S.B. Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver x receptors. **Journal of Antibiotic.** v. 58, p. 559-565, 2005.

ONO, M.; NISHIMURA, K.; SUZUKI, K.; FUKUSHIMA, T.; IGISHI, K.; YOSHIMITSU, H.; IKEDA, T.; NOHARA, T. Steroidal glycosides from the underground parts of *Solanum sodomaeum*. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**. v. 54, p. 230-233, 2006.

O'REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R. FOLKMAN J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell Press**. v. 88, p. 277-285, 1997.

PAGUIGAN, N.D.; CASTILLO, D.H.B; CHICHIOCO-HERNANDEZ, C.L. Anti-ulcer activity of leguminosae plants. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 51, n. 1, p. 815-829, 2014.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M.E.V.; HENRIKSNÄS, J.; PETERSSON, J.; GENDLER, S.J.; SANDLER, S.; PERSSON, A.E.G.; HANSSON, G.C.; HOLM, L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **American Journal of Physiology**. v. 295, n. 4, p. 806-812, 2008.

PINTO, D.M.L. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PISCO, L.; KORDIAN, M.; PESEKE, K.; FEIST, H.; MICHALIK, D.; ESTRADA, E.; CARVALHO, J.; HAMILTON, G.; RANDO, D.; QUINCOCES, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, p. 401-407, 2006.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules.** v. 14. p. 850-867, 2009.

PUNJABI, S; COOK, L. J.; KERSEY, P.; MARKS, R. Solasodine glycoalkaloids: a novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebocontrolled, parallel group, multicenter study. **International Journal of Dermatology**. v. 47, p. 78-82, 2008.

PURI, R.; WONG, T.C.; PURI, R.K. ¹H- and ¹³C-Nmr Assignments and Structural Determination of a Novel Glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. **Journal of Natural Products**. v. 57, n 5, p. 587-596, 1994.

RAINSFORD, K. D.; WHITEHOUSE, M. W. Biochemical gastroprotection from acute ulceration induced by aspirin and related drugs. **Biochemical Pharmacology**. v. 29, n. 9, p. 1281-1289, 1980.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012. 808 p.

RAO, V.S.; SANTOS, F.A.; SOBREIRA, T.T.; SOUZA, M.F.; MELO, C.L. SILVEIRA, E.R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**. v. 63, n. 2, p. 146-149. 1997.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.

RAVEN, P.H.; EICHCHORN, S.E.; EVERT, R.F. **Biologia Vegetal**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2014. 876 p.

REGASINI, L.O. Estudo químico de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae), síntese e potencial farmacológico de alcaloides guanidínicos e análogos. 2011. 120 f. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 80-84, 2005.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**. v. 37, p. 837-841, 1988.

RODINO, S.; BUTU, A.; NEGOESCU, C.; PETRACHE, P.; CONDEI, R.; NICOLAE,I.; CORNEA, C.P. Antimicrobial activity of *Humulus lupulus* extract. **Journal of Biotechnology**. v. 185, Supplement, p. S66, 2014.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Revista Ciência e Agrotecnologia.** v. 25, p. 102-123, 2001.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. v. 6, nº 3, p. 317-320, 2003.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 9, p. 267-285, 2005.

RUSSEL, P.J.; RUSSEL, P.; RUDDUCK, C.; TSE, B.W.; WILLIAMS, E.D.; RAGHAVAN, D. Establishing prostate cancer patient derived xenografts: lessons learned from older studies. **The prostate**. V. 75, p. 628-636, 2015.

SARASWATI, S.; AGRAWAL, S.S. Brucine, an indole alkaloid from *Strychnos nux-vomica* attenuates VEGF-induced angiogenesis via inhibiting VEGFR2 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Letters**. v. 332, n. 1, p. 83-93, 2013.

SARASWATI, S.; ALHAIDERB, A.A.; AGRAWAL, S.S. Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa* exhibits anti-angiogenic activity via downregulation of VEGF *in vitro* and *in vivo*. **Chemico-Biological Interactions**. v. 206, n. 2, p. 204-213, 2013.

SAÚDE DA PRÓSTATA. Disponível em http://www.saudedaprostata.org.br/. Acesso em 14 abril 2015.

SCHMIDT, A.; SOMMER, F.; OZGUR, E.; KLOTZ, T.; ENGELMANN, U.; ADDICKS, K.; BLOCH, W. Vessels in benign prostatic hyperplasia contain more binding sites for endostatin than vessels in normal prostate tissue. **European Urology**. v. 46, p. 765-767, 2004.

SEITHE, A.; ANDERSON, G.J. Hair morphology and the relationships of species in *Solanum* sect. **Plant Systematics and Evolution**. v. 139, p. 229-258, 1982.

SEUPEL, R.; ROTH, A.; STEINKE, K.; SICKER, D.; SIEHL, H.; ZELLER, K.; BERGER, S. Friedelin aus Kork. **Chemie in Unserer Zeit**. p. 1-16. 2014. SHAY, H.; KOMAROV, S.A.; FELS, S.E.; MERAZE, D.; GRUENSTEIN, M.; SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHIRODE, D.; PATEL, T.; PAL ROY, S.; JYOTHI, T.M.; RAJENDRA, S.V.; PRABHU, K.; SETTY, S.R. Anti-ulcer properties of 70% ethanolic extract of leaves of Albizzia lebbeck. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, p. 228-231, 2008.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 20, p. 519-525, 2004.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGIN, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 4, p. 1-16. 2007.

SILVA, T.M.S.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M.F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosideos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**. v. 26, p. 517-522, 2003.

SINGH, B.; SHARMA, R.A. Anti-inflammatory and antimicrobial properties of pyrroloquinazoline alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees. **Phytomedicine**. v. 20, n. 5, p. 441-445, 2013

SINGH, S.B.; BARRET, J.F. Empirical antibacterial drug discovery – Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**. v. 71, n. 7, p. 1006-1015, 2006.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometria**. New York: W. H. Freeman and Company. 1995. 887p.

SOLLOHUB, K.; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 99, n. 2, p. 587-597, 2010.

SOUZA, J.P.B.; TACON, L.A.; CORREIA, C.C.; BASTOS, J.K.; FREITAS, L.A.P. Spray-dried propolis extract, II: Prenylated components of green propolis. **Pharmazie**. v. 62, n. 7, p. 488-492, 2007.

STEINBECK, M.J.; KHAN, A.U.; KARNOVSKY, M.J. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p. 15649-15654, 1993.

STRUM, S.B.; FALOON, W. *β*-Sitosterol and the Aging Prostate Gland. **Life Extension**. 2005. http://www.lef.org/magazine/2005/6/report_prostate/Page-01. Acesso em: 01 jan. 2015.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. **Progress in Lipid Research**. v. 39, n. 4, p. 289-314, 2000.

SUN, X.B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 10, p. 699-704, 1991.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. (Ed.) **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. v. 6, Academic Press, London, p. 71-133. 1990.

SUZUKI, H.; MORITA, H.; SHIRO, M.; KOBAYASHI, J. Celogentin K, a new cyclic peptide from the seeds of *Celosia argentea* and X-ray structure of moroidin. **Tetrahedron**. v. 60, p. 2489-2495, 2004.

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

TACON, L. A. Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae. 2012. 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 19, n. 3, p. 418-426, 1969.

TAKAHASHI, J.A.; CASTRO, M.C.M.; SOUZA, G.G.; LUCAS, E.M.F.; BRACARENSE, A.A.P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, M.S.; FLOREANO, M.B.; OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Streptococcus pyogenes* and Listeria monocytogenes. **Journal of Medical Mycology**. v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.

TATYANA, I.; DIPTIMAN, C.; LISA, K. Effects of sustained anti-angiogenic therapy in multistage prostate cancer in tramp model. **Cancer Research**. v. 67, p. 5789-5797, 2007.

TIOSSI, R.F.J.; MIRANDA, M.A.; PRAÇA, F.S.G.; SOUSA, J.P.B.; BENTLEY, M.V.B.; MCCHESNEY, J.D.; BASTOS, J. K. A validated reverse phase HPLC analytical method for quantitation of glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and its extracts. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 2012, p. 1-8, 2012.

TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; ANDRADE, F.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic activity of four extracts from the barks wood of *Quassia amara* L. **Biological Pharmaceutical Bulletim**. v. 25, n. 9, p.1151-1155, 2004.

USPXXX. **American Pharmacopeia** – United States Pharmacopeial Convention. Rockville, USA: 2007.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 38, p. 97-120, 1998.

VANE, J.R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. **Nature**. v. 231, p. 232-235, 1971.

VASCONCELOS, P.C.P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.K.; PELLIZZON, C.H. Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 115, p. 293-301, 2008.

VEHRING, R.; FOSS, W. R. e LECHUGA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. **Aerosol Science**, v. 38, p. 728 -746, 2007.

VIANA, N.I. O papel dos micro RNAs 143 e 145 e seus genes alvo na etiopatogenia da hyperplasia prostática benigna. 2012. 141f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo São Paulo, 2012.

VIEIRA, M.L.A.; HUGHES, A.F.S.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Canadian Journal of Microbiology**. v. 58, p. 54-66, 2012.

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

WALLACE, J. L. COX-2: A pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. **The Scientific World Journal**. v. 6, p. 577-588, 2006.

WALLACE, J.L. No steroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**. v. 110, p. 19-23, 2001.

WALTENBERGER, J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. **Biochemical Society Transactions**. v. 37, p. 1167-1170, 2009.

WHITTLE, J.R.; LEWIS, M.T.; LINDEMAN, G.J.; VISVADER, J.E. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. Breast Cancer Research. v. 17, n. 17, p. 1-13, 2015.

YAN, Z.; LI, T.; LV, P.; LI, X.; ZHOU, C.; YANG, X. Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography B.** v. 928, p. 22-31, 2013.

YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A.. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 51, p. 873-885, 2003.

YEH, C.T.; YEN, G.C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. **Journal of Nutrition**. v. 136, p. 11-15, 2006.

ZANATTA, F.; GANDOLFI, R. B.; LEMOS, M.; TICONA, J. C.; GIMENEZ, A.; CLASEN, B. K.; CECHINEL-FILHO, V.; ANDRADE, S. F. DE. Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae). **Chemico-Biological Interactions**. v. 180, n. 2, p. 312-317, 2009.

ZHANG, C.H.; HUANG, L.X.; WANG, C.P.; MUJUMDAR, A.S. Experimental and numerical investigation os spray drying parameters on the dried powder properties of *Ginkgo biloba* seeds. **Drying Technology**. v. 28, n. 3, p. 380-388, 2010.

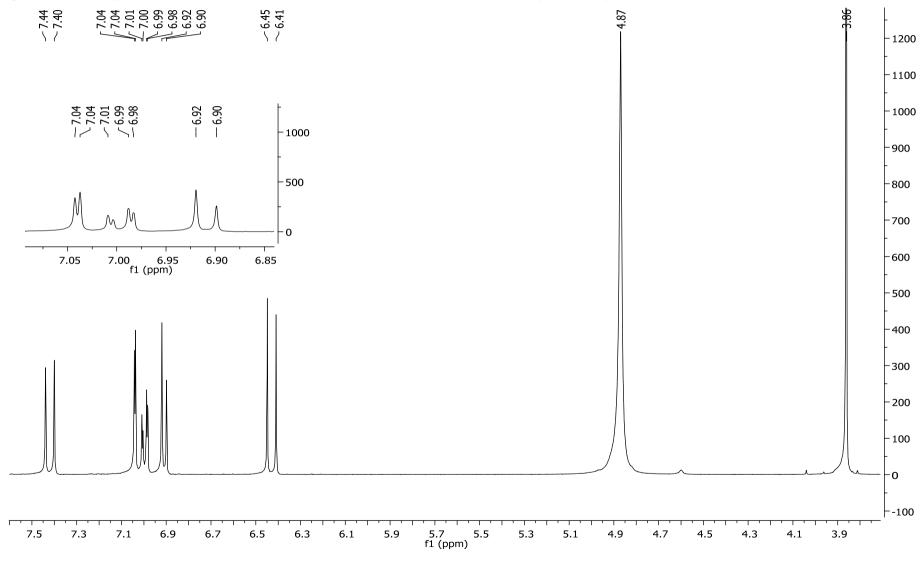
ZHANG, X.; CAMBRAI, A.; MIESCH, M.; ROUSSI, S.; RAUL, F.; AOUDE-WERNER, D.; MARCHIONIJ, E. Separation of Δ^5 - and Δ^7 -phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 4, p. 1196-1202, 2006.

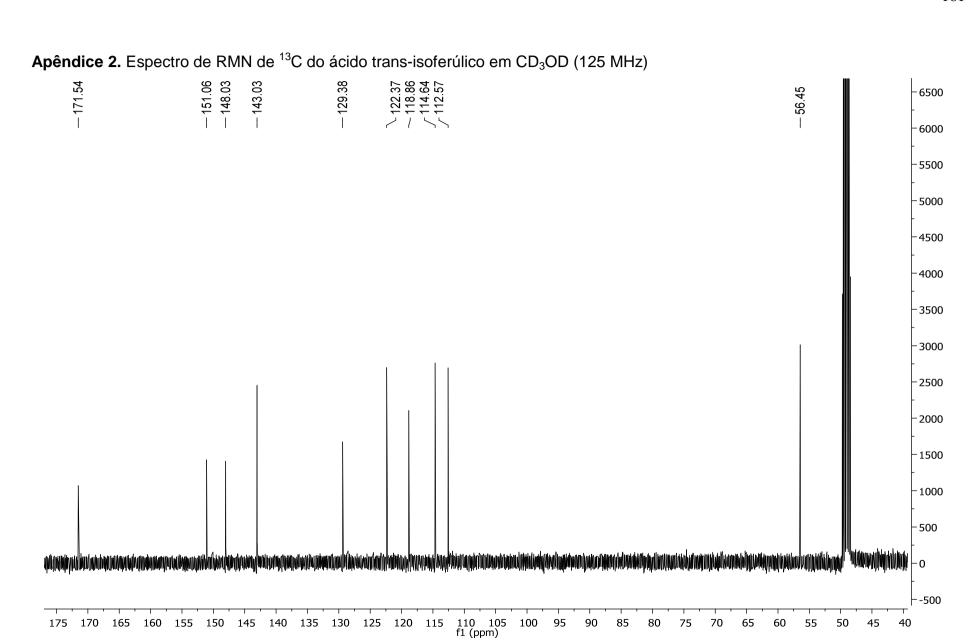
ZHOU, Y.; TANG, Q.; ZHAO, S.; ZHANG, F.; LI, L.; WU, W.; WANG, Z.; HANN, S. Targeting signal transducer and activator of transcription 3 contributes to the solamargine inhibited growth and induced apoptosis of human lung cancer cells. **Tumor Biology**. v. 35, n. 8, p. 8169-8178. 2014.

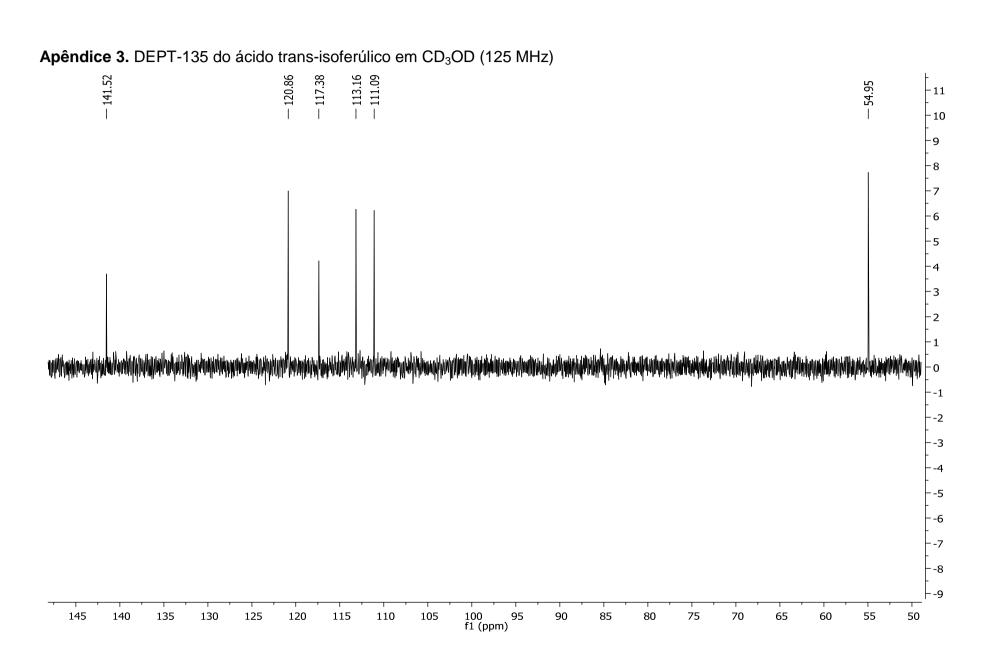
ZHU, M.; BI, X.; JIA, Q.; SHANGGUAN, S. The possible mechanism for impaired angiogenesis after transient focal ischemia in type 2 diabetic Gk rats: Different expressions of angiostatin and vascular endothelial growth factor. **Biomedicine Phamacother**. v. 64, p. 208-213, 2009.

APÊNDICES

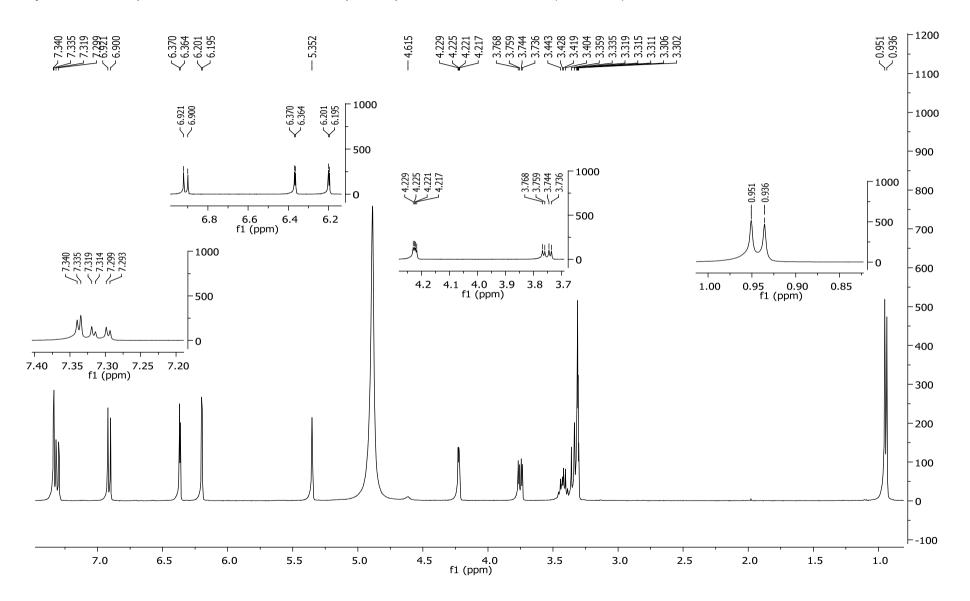
Apêndice 1. Espectro de RMN de ¹H do ácido trans-isoferúlico em CD₃OD (400 MHz)

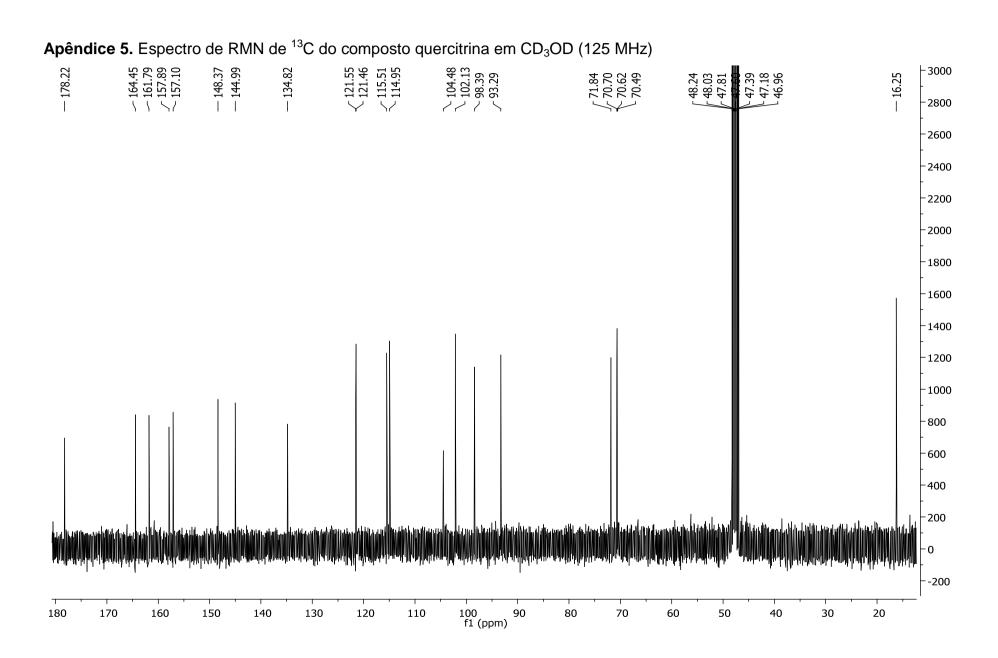


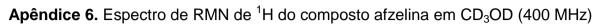


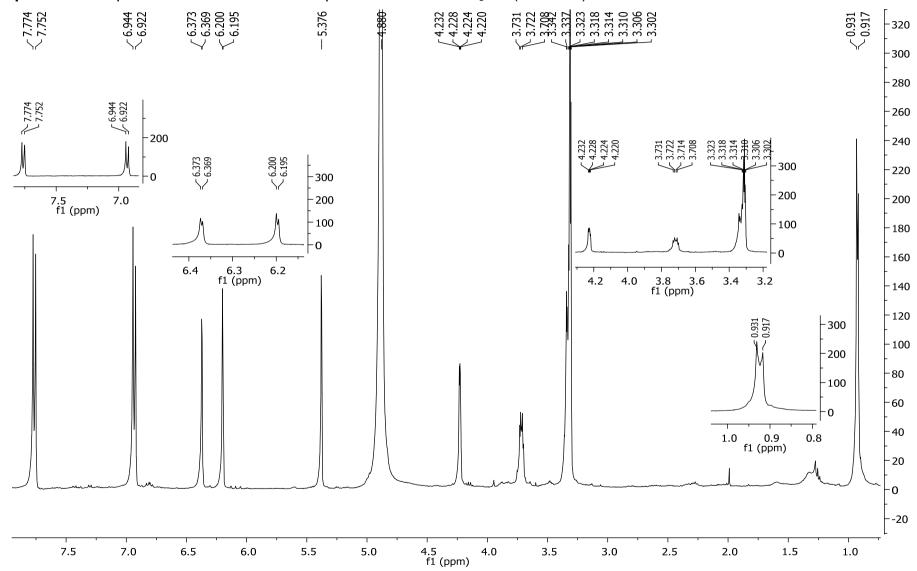


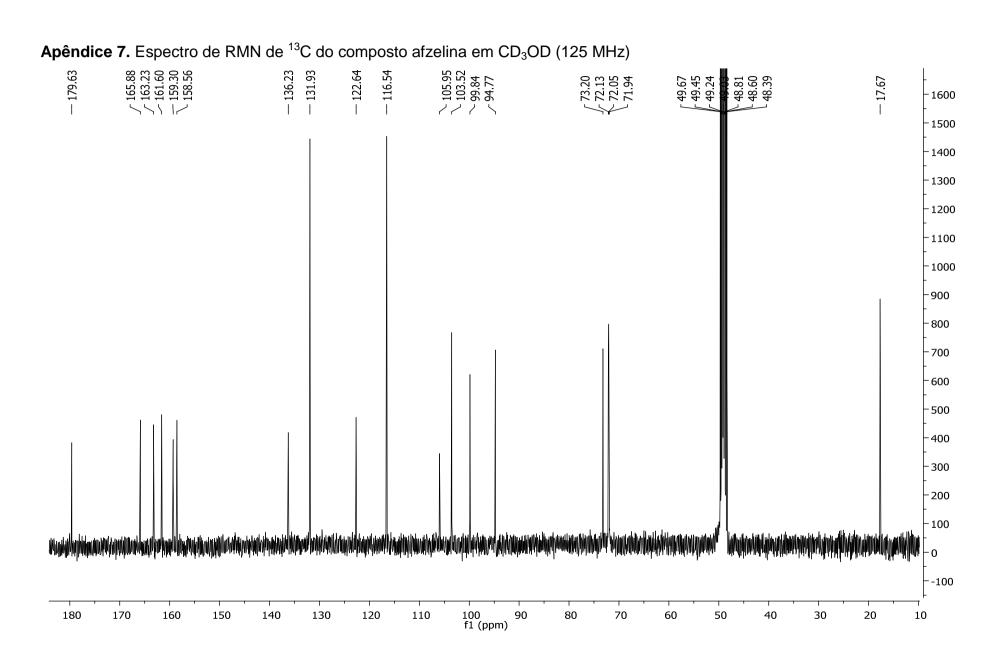
Apêndice 4. Espectro de RMN de ¹H do composto quercitrina em CD₃OD (400 MHz)



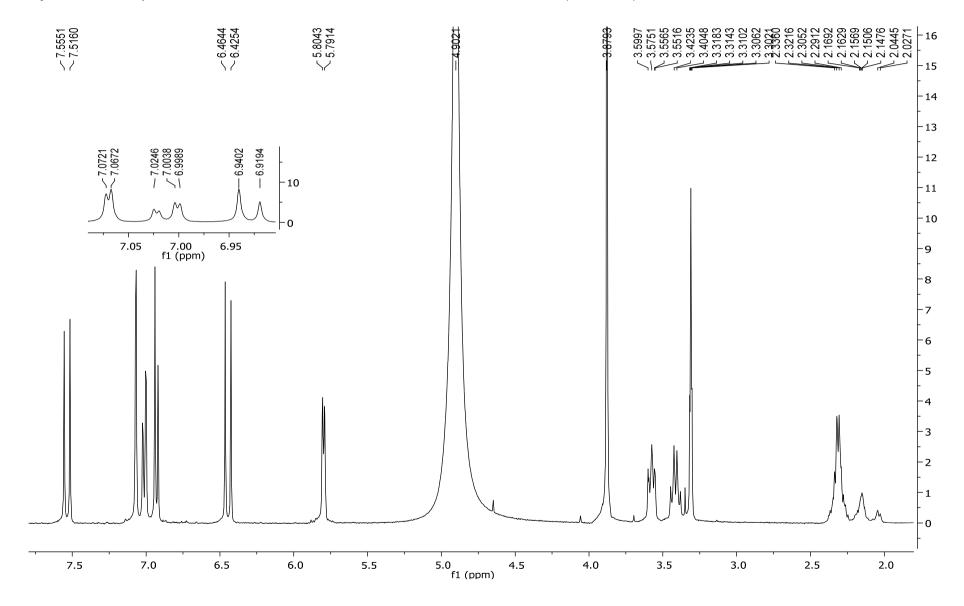




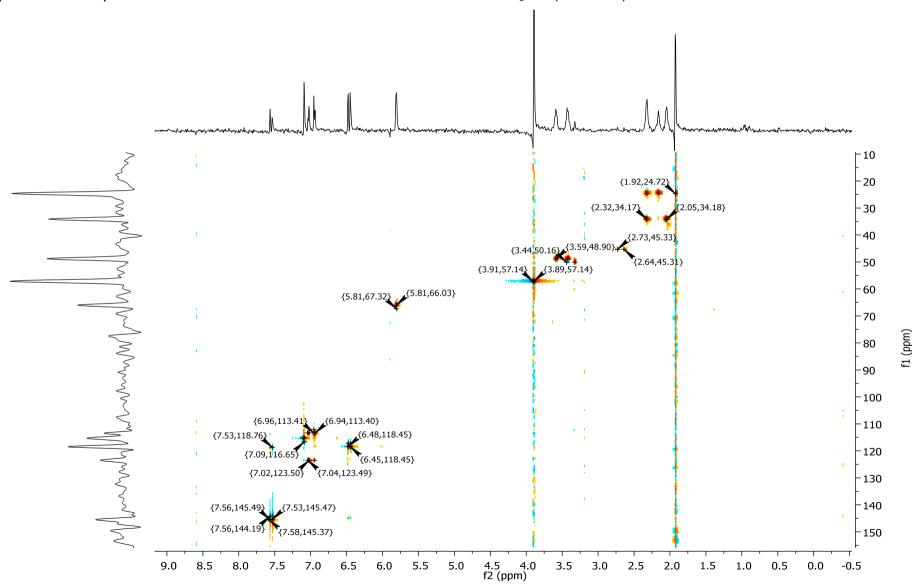


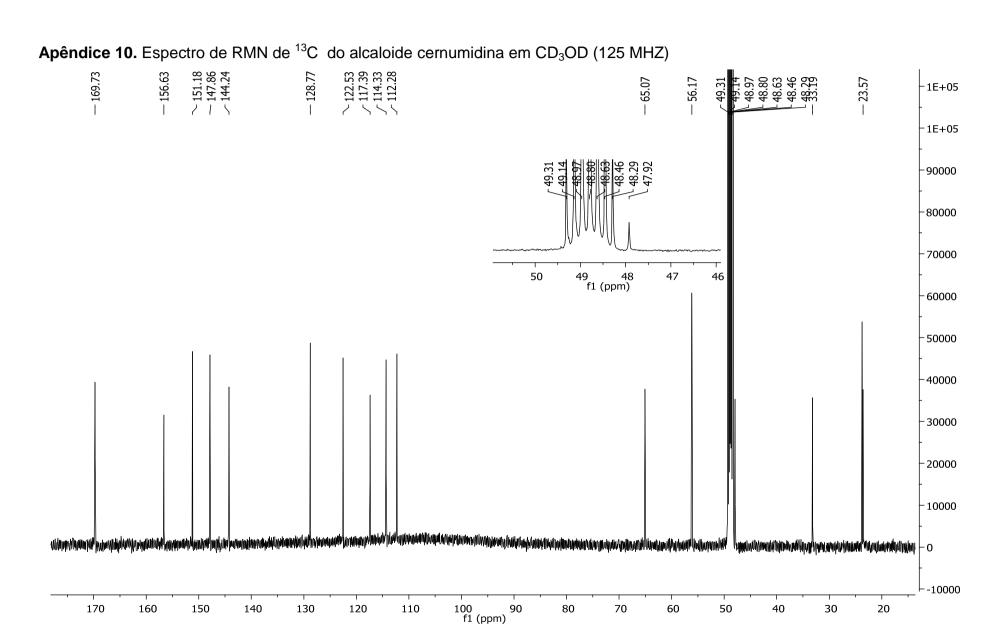


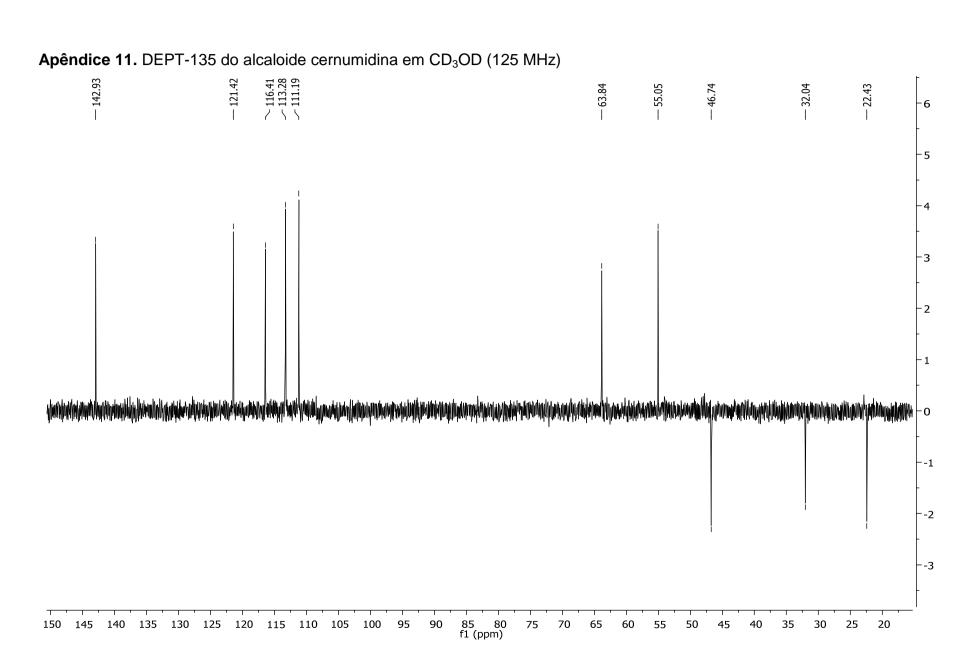
Apêndice 8. Espectro de RMN de ¹H do alcaloide cernumidina em CD₃OD (400 MHz)



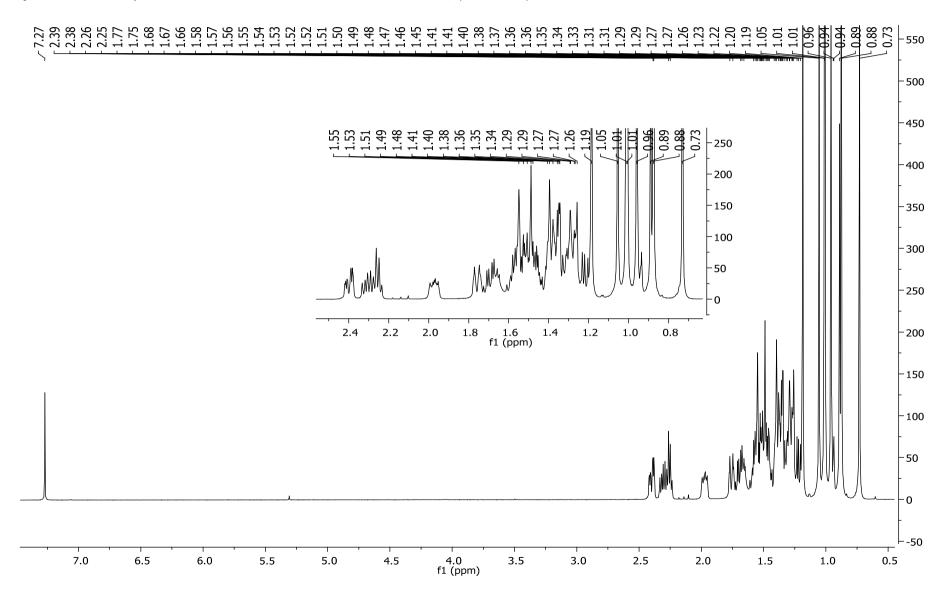
Apêndice 9. Mapa de contorno de HSQC do alcaloide cernumidina em CD₃OD (400 MHz)



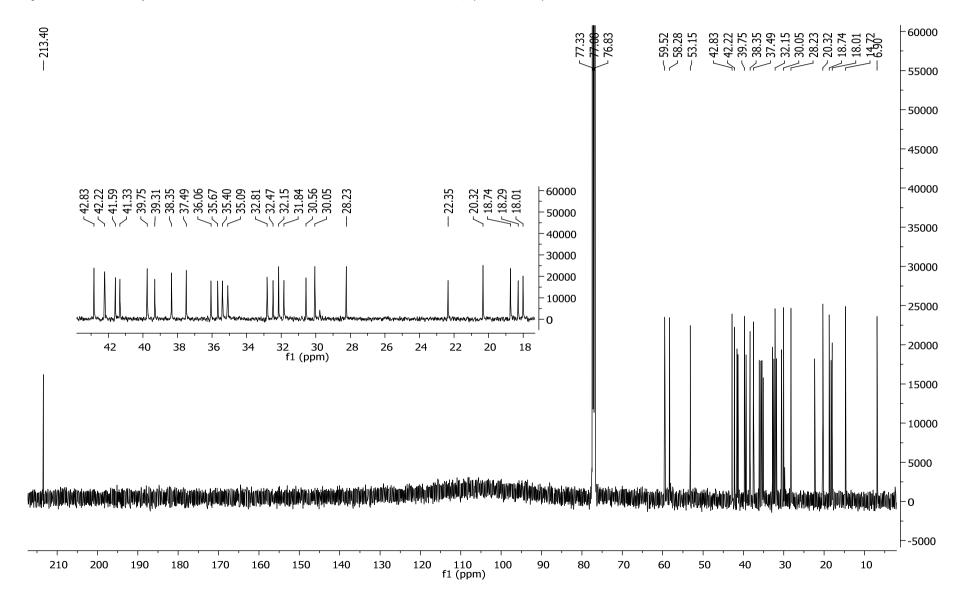


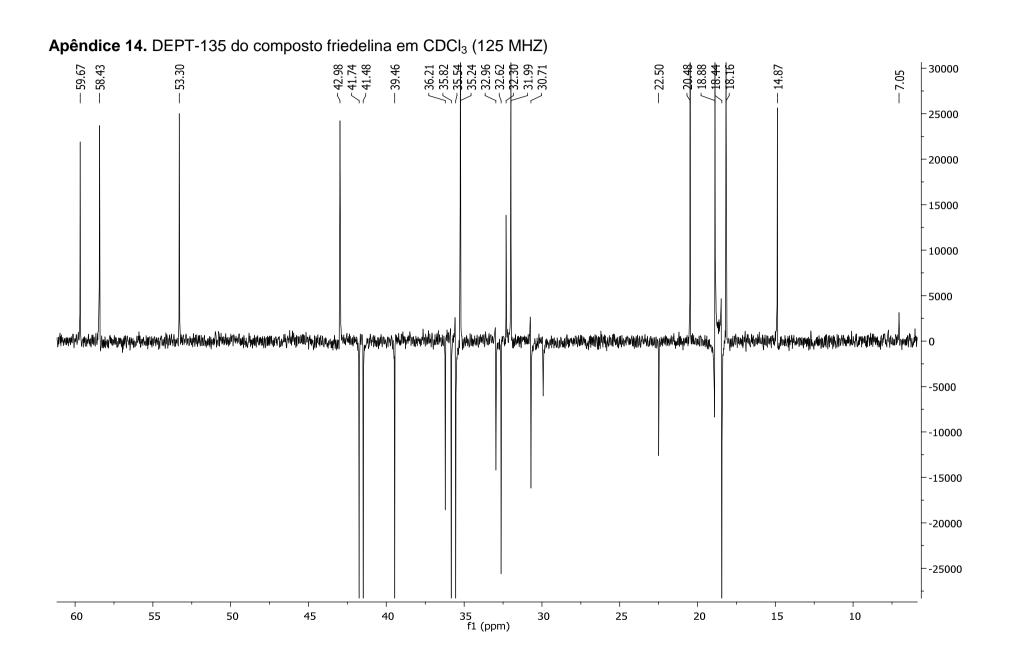


Apêndice 12. Espectro de RMN de ¹H da friedelina em CDCI₃ (400 MHz)

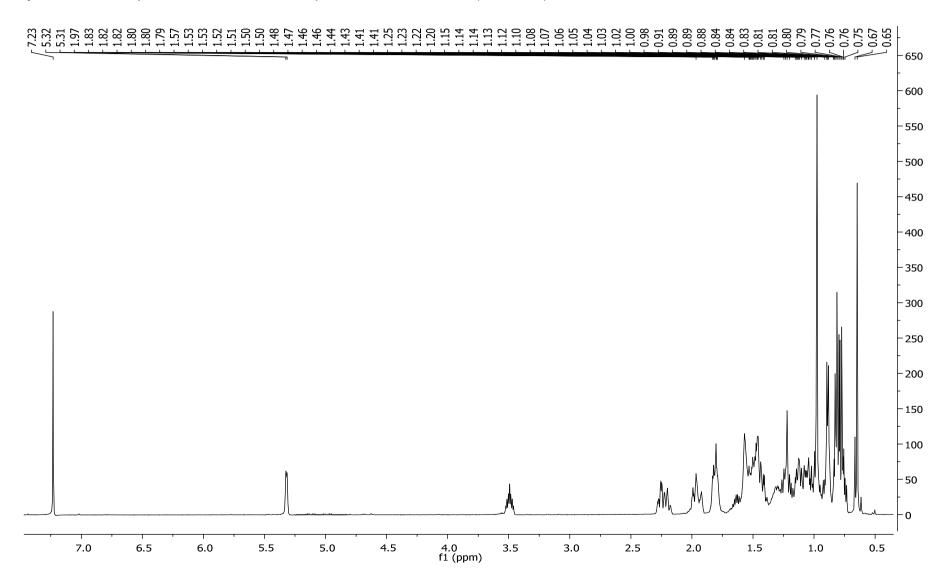


Apêndice 13. Espectro de RMN de ¹³C da friedelina em CDCl₃ (125 MHZ)





Apêndice 15. Espectro de RMN de ¹H do β-sitosterol em CDCl₃ (400 MHz)



Apêndice 16. Espectro de RMN de 13 C do β -sitosterol em CDCl₃ (125 MHZ)

