



UNIVALI
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

MARIEL DE BARROS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLOGICO DE *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus***

Itajaí

2015

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

MARIEL DE BARROS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLOGICO DE *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus*

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Faloni de Andrade

Itajaí, Setembro de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

B2 Barros, Mariel de, 1991-
78c Composição química e avaliação do potencial farmacológico de
Solidago chinensis e tropaeolum majus / Mariel de Barros, 2015.
125f. ; il., tab. ; fig.

Cópia de computador (Printout(s)).
Dissertação (Mestrado) Universidade do Vale do Itajaí,
Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
“Orientador : Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho ”
“Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Faloni de Andrade”
Bibliografia : p.95-118

1. Flavonoides. 2. *Solidago chinensis*. 3. *Tropaeolum majus*.
4. Plantas medicinais. 5. Química Farmacêutica. I. Título.

CDU: 615.32

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
FARMACOLOGICO DE *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus***

MARIEL DE BARROS

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

Valdir Cechinel Filho, Dr.
Orientador

Clóvis Antonio Rodrigues, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Prof^o. Dr Valdir Cechinel Filho (UNIVALI)
Presidente

Prof^o. Dr Sérgio Faloni de Andrade (UNIVALI)
Co-orientador

Prof^o. Dr Rivaldo Niero (UNIVALI)
Membro

Prof^a. Dra Nara Lins Meira Quintão (UNIVALI)
Membro

Prof^a. Dra. Michele Debiasi Alberton (FURB)
Membro

Itajaí (SC), 18 de setembro de 2015

Dedicatória

Com muito amor esse trabalho é dedicado aos meus pais, meus tesouros inestimáveis, Luiz Carlos e Ilania. Obrigada por acreditarem em mim, pelo apoio ininterrupto e por me inspirarem ir além.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradecer à Deus, meu criador, pela vida que me proporcionou e pela saúde para buscar meus sonhos.

Minha gratidão eterna também a minha família, meus pais Luiz Carlos e Ilania, guerreiros incansáveis, que sempre me permitiram viver e buscar meus objetivos, com o maior zelo e apoio que se possa imaginar, muito obrigada, amo vocês com todo o meu coração.

Agradecimento especial ao meu marido Victor, pela paciência, encorajamento e amor.

Agradeço ao meu anjo Catarina, que mesmo pequena, soube entender minhas ausências e angústias. Filha, você transformou minha vida com sua luz, sou muito grata por tê-la e poder desfrutar de tanto amor.

À Rosa, minha grande amiga, por ter me amparado desde a época da graduação e por todo auxílio com a Catarina para que eu pudesse ir até a UNIVALI estudar.

Com muito carinho, agradeço ao meu orientador Cechinel, principalmente pelo ser humano incrível que é e que tive a graça de conviver. Obrigada professor por ter me aceitado como sua orientanda, pela paciência e compreensão no momento da minha gravidez e pelos ricos ensinamentos que partilhastes comigo. Foi uma honra trabalhar com o senhor.

Agradecimento especial também a Adriana Campos, colega de profissão que se tornou grande amiga e que contribuiu muito para a realização desta dissertação. Obrigada Adri por todo o auxílio no laboratório, pela realização do teste de atividade antiproliferativa e principalmente por ser essa amiga doce e divertida.

Agradeço ao meu Co-orientador, professor Sérgio Faloni, pelas ricas contribuições no trabalho e por ter aceitado participar do mesmo.

Agradeço com muito carinho às amigas que formei durante essa jornada e pela partilha de experiências científicas e pessoais. Foi um prazer tê-las por perto Adri, Fabile, Luísa, Luciane, Giovana, Camila e Angela.

Agradeço também a equipe que realizou os testes de atividade gastroprotetora, em especial Luísa Mota, Prof. José Roberto Santin, Prof. Sérgio Faloni, Thaise, Lincon.

Agradeço ao Luiz Gustavo Chagas (Guto) e professora Nara pela realização dos experimentos de antinocicepção.

À banca, professor Niero, professora Nara e professora Michele pelas contribuições no meu trabalho e pelo carinho em sugerir as alterações.

Ao apoio financeiro do FUMDES - Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior.

À todos que participaram direta ou indiretamente na realização desta dissertação e que tive a honra de conhecer e conviver.

GRATIDÃO!

EPÍGRAFE

Nada te perturbe
Nada te espante
Deus não muda
A paciência tudo alcança
Quem tem a Deus nada falta
Só Deus basta
Assim seja.

Santa Tereza D'Ávila

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus*

Mariel de Barros

Setembro/2015

Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Sérgio Faloni de Andrade.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

Número de Páginas: 125.

A descrição do poder curativo das plantas é antiga, visto a descoberta no uso empírico das mesmas pelas antigas civilizações. As plantas *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus* são amplamente distribuídas pelo Brasil e apresentam propriedades biológicas importantes e consolidadas no uso popular. O presente estudo objetivou avaliar a composição química e a atividade biológica (gastroprotetora, antinociceptiva e antiproliferativa) destas plantas. O material vegetal foi macerado em metanol por 7 dias, após evaporação do solvente os extratos foram particionados com clorofórmio e acetato de etila para obtenção das respectivas frações, usadas nos procedimentos cromatográficos convencionais. Para a identificação dos compostos isolados foram utilizadas técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H) e Carbono 13 (RMN-¹³C). Foram isolados dois compostos de *S. chilensis*, identificados como os flavonóides quercitrina e afzelina (uma rara substância natural). Para a *T. majus* isolou-se e identificou-se o composto majoritário epicatequina. A atividade gastroprotetora do extrato de *S. chilensis* foi avaliada através dos modelos de úlcera induzida por etanol/HCl e por indometacina em ratos e camundongos. O EMB de *S. chilensis* reduziu as lesões gástricas em até 64,55% e 98,22% nas doses de 100 e 300 mg/kg, estas ainda preveniram a depleção de muco a níveis basais. O extrato da planta (100 e 1000 µg/ml) foi capaz de reduzir em 23,30 e 86,92% a atividade do DPPH quando comparado com o veículo (91,11 ± 0,40 µg/ml). A dose de 300 mg/kg do extrato promoveu um aumento nos níveis de GSH em 84,82 % quando comparado com veículo (Vei: 984 ± 134,3 mm²) e diminuiu em 95,95% a MPO. Para o modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina o extrato (100 mg/kg) reduziu 76,40% a área de lesão em comparação com o veículo (Vei: 16,02 ± 2,79 mg/kg). Foi observado ainda que extrato (100 mg/kg) promoveu a diminuição do volume (45,56%) e acidez (72,13%), aumentou pH (63,63%) e muco aderido (72%). Os compostos reduziram área de lesão gástrica por indução de etanol/HCl, com 94,80% para quercitrina (1,68 mg/kg); e 52,16% (0,026 mg/kg) e 65,75% (0,078 mg/kg) para afzelina. O modelo de hiperalgisia induzida por carragenina foi utilizado para avaliar a antinocicepção do EMB de *T. majus* e *S. chilensis*, porém somente o último apresentou atividade anti-hiperalgésica promissora. A atividade antiproliferativa foi analisada *in vitro* contra células neoplásicas humanas: U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim) e NCI-H460 (pulmão) e não foram evidenciados resultados promissores para ambas as plantas. Os resultados químicos e biológicos evidenciados são relevantes e promissores, especialmente em relação à *S. chilensis*, que foi efetiva em modelos de gastroproteção e processos dolorosos.

Palavras-chave: *Solidago chilensis*. *Tropaeolum majus*. Flavonóides. Gastroproteção. Antinocicepção. Antiproliferativo.

CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF THE PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF *Solidago chilensis* and *Tropaeolum majus*

Mariel de Barros
September/2015

Supervisor: Prof. Valdir Cechinel Filho, PhD.

Co-Supervisor: Prof. Sérgio Faloni de Andrade, PhD.

Area of concentration: Natural Products and Bioactive Synthetic Substances

Number of pages: 125.

The curing properties of plants are as old as time itself, having been discovered through empirical use by ancient civilizations. The plants *Solidago chilensis* and *Tropaeolum majus* are widely distributed throughout Brazil, and have biological properties and widespread popular uses. This study evaluates the chemical composition and pharmacological (gastroprotective, antinociceptive and antiproliferative) activity of these plants. The plant material (leaves) was macerated in methanol for 7 days, and after evaporation of the solvent, the extracts were partitioned with chloroform and ethyl acetate to obtain the respective fractions for use in the conventional chromatographic procedures. Conventional spectroscopic techniques (RMN-¹H and RMN-¹³C) were used to identify the isolated compounds. Two flavonoids were obtained from *S. chilensis*, identified as quercitrin and afzelin, a rare natural substance. Epicatechin was isolated as the major compound from *T. majus*. The gastroprotective activity of the *S. chilensis* extract was evaluated through the ethanol/HCl-induced ulcer model and by indomethacin in rats and mice. The *S. chilensis* extract reduced gastric lesions by up to 64.55% and 98.22% at the doses of 100 and 300 mg/kg. It also prevented mucus depletion to basal levels. The plant extract (100 and 1000 µg/ml) was able to reduce 23.30% and 86.92% of DPPH activity compared with the vehicle. The dose of 300 mg/kg of the extract promoted an increase in GSH levels of 84.82% and a decrease in MPO activity of 95.95%. For the model of gastric ulcer induced by indomethacin, the extract (100 mg/kg) decreased the lesioned area by 76.40%, compared to the vehicle. It was also observed that the extract (100 mg/kg) induced a decrease in volume (45.56%) and acidity (72.13%), and an increase in pH (63.63%) and adhered mucus (72%). The compounds reduced the area of gastric damage induced by ethanol/HCl (94.80% for quercitrin (1.68 mg/kg); and 52.16% (0.026 mg/kg) and 65.75% (0.078 mg/kg) for afzelin). The model of hyperalgesia induced by carrageenan was used to assess antinociception of the extract *T. majus* and *S. chilensis*, but only *S. chilensis* showed promising anti-hyperalgesic activity. The antiproliferative activity was evaluated in vitro against human cancer cells: U251 (glioma), MCF-7 (breast), 786-0 (kidney) and NCI-H460 (lung), and no promising results were shown for either plant. The chemical and biological results are significant and promising, particularly in relation to *S. chilensis*, which was effective in gastroprotection and pain models.

Keywords: *Solidago chilensis*. *Tropaeolum majus*. Flavonoids. Gastroprotection. Antinociception. Antiproliferative

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia das Partes aéreas de <i>S. chilensis</i>	36
Figura 2. Substâncias químicas identificadas da <i>S. chilensis</i> Meyen (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012).	38
Figura 3. Planta <i>T. majus</i>	43
Figura 4. Estruturas químicas da planta <i>T. majus</i>	44
Figura 5. Fluxograma resumido da obtenção das frações de <i>S. chilensis</i> a partir do extrato metanólico.	55
Figura 6. Fluxograma resumido da obtenção das frações de <i>T. majus</i> a partir do extrato metanólico	56
Figura 7. Fluxograma explicativo o fracionamento fitoquímico das folhas de <i>S. chilensis</i>	68
Figura 8. Cromatograma de CLAE. Sobreposição das amostras: (a) extrato metanólico da folha de <i>Solidago chilensis</i> , (b) quercitrina e (c) branco metanol.	69
Figura 9. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ 300MHz) ampliado de 10 a 0.0 ppm do composto afzelina.	71
Figura 10. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ 75MHz) ampliado de 10 a 200 ppm do composto afzelina.	72
Figura 11. Fluxograma resumido do fracionamento fitoquímico das folhas de <i>T. majus</i>	74
Figura 12. Efeitos da administração oral de carbenoxolona (200mg/kg) e diferentes doses (30, 100 e 300mg/kg) do EMB das folhas de <i>S. chilensis</i> em camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol 60 %/HCl 0.03M.	75
Figura 14. Quantificação de DPPH (µM de DPPH) após incubação do extrato nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 µg/mL do extrato metanólico das folhas de <i>S. chilensis</i>	77
Figura 15. Quantificação de GSH (µg/g de tecido) após administração oral de carbenoxolona (200mg/kg) e diferentes doses do extrato metanólico das folhas de <i>S. chilensis</i> (100 e 300mg/kg) em estômagos de camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.	78
Figura 16. Quantificação de MPO (D.O./mg proteína) após administração oral de carbenoxolona (200mg/kg) e do extrato metanólico (300mg/kg) de <i>S. chilensis</i>	

em estômagos de camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol 60 %/HCl 0.03M.....	79
Figura 17. Efeitos da administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) e 100 mg/kg do EMB das folhas de <i>S. chilensis</i> em camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por indometacina.....	80
Figura 18. Efeitos da administração oral de carbenoxolona (100mg/kg), quercitrina (0,56 e 1,68 mg/kg) e afzelina (0,026 e 0,078 mg/kg) isolados do extrato metanólico das folhas de <i>S. chilensis</i> em camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol/HCl.	82
Figura 19. Frequência de resposta de retirada da pata traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com EMB das folhas de <i>S. chilensis</i> (100 mg/kg) em diferentes intervalos de tempo após a injeção i.pl. de carragenina 300 µg/pata.	83
Figura 20. Frequência de resposta de retirada da pata traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com EMB das folhas de <i>T. majus</i> (100 mg/kg) em diferentes intervalos de tempo após a injeção i.pl. de carragenina 300 µg/pata.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento do extrato e das frações das plantas <i>S. chilensis</i> e <i>T. majus</i>	67
Tabela 2. Dados de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C do composto afzelina em comparação com dados da literatura*.	73
Tabela 3. Efeito do extrato de <i>S. chilensis</i> em parâmetros de secreção ácida gástrica e na aderência de muco, após ligadura do piloro.	81
Tabela 4. Valores de GI ₅₀ (µg/mL) do controle (Doxorrubicina) e dos extratos metanólicos das plantas <i>S. chilensis</i> e <i>T. majus</i>	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico
AE – Acetato de etila
AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
ATC - Ácido tricloroacético
CAT - Catalase
CC – Coluna cromatográfica
CCD – Cromatografia em camada delgada
CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência
COX – Cicloxigenase
DI₅₀ – Dose inibitória mediana
DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy
DMSO – Dimetilsulfóxido
EMB – Extrato metanólico bruto
EROs – Espécies reativas de oxigênio
GSH – Glutathiona reduzida
GPx – Glutathiona peroxidase
HCl - Ácido clorídrico
LOX – Lipoxigenase
LT – Leucotrieno
MPO - Mieloperoxidase
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
NIQFAR – Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas
PG – Prostaglandina
PKC – Proteína quinase C
PLA2 – Fosfolipase A2
PPGCF – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
RIBECANCER – Rede Iberoamericana de Investigação em Câncer
RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN-¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral:	29
2.2 Objetivos Específicos:	29
3 REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 Plantas medicinais	31
3.2 Flavonoides	32
3.3 A planta: <i>Solidago chilensis</i>	35
3.3.1 <i>Família Asteraceae</i>	35
3.1.2 <i>Características e uso popular de S. chilensis</i>	35
3.1.3 <i>Características químicas e atividade biológica de S. chilensis</i>	37
3.2 A planta: <i>Tropaeolum majus</i>	42
3.2.1 <i>Família Tropaeolaceae</i>	42
3.2.2 <i>Características e uso popular de Tropaeolum majus</i>	42
3.2.3 <i>Características químicas e atividade biológica de T. majus</i>	44
3.4 Úlcera péptica	45
3.5 Dor e inflamação	47
3.6 Câncer	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Material	53
4.1.1 <i>Materiais vegetais</i>	53
4.2 Métodos	54
4.2.1 <i>Obtenção dos extratos</i>	54
4.2.2 <i>Preparo das frações</i>	54
4.2.3 <i>Isolamento e purificação</i>	56
4.2.3.1 <u><i>Colunas Cromatográficas das frações de S. chilensis</i></u>	57
4.2.3.2 <u><i>Coluna cromatográfica das frações de T. majus</i></u>	57
4.4 Elucidações estruturais	58
4.4.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	58
4.5 Estudo farmacológico	59

4.5.1 Atividade gastroprotetora.....	59
4.5.1.1 <u>Animais</u>	59
4.5.1.2 <u>Estudo de resposta à dose e fixação de dosagem do composto isolado</u>	60
4.5.1.3 <u>Lesões gástricas induzidas por etanol 60 %/HCl 0.03M.</u>	60
4.5.1.4. <u>Lesões gástricas induzidas por indometacina</u>	60
4.5.1.5. <u>Indução de hipersecreção por ligadura do piloro em ratos</u>	61
4.5.1.6 <u>Estimativa da atividade de pepsina</u>	61
4.5.1.7 <u>Determinação de muco na parede gástrica</u>	62
4.5.1.8 <u>Preparação de frações subcelulares de estômagos</u>	62
4.5.1.9 <u>Ensaio de proteínas</u>	62
4.5.2. <u>Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor de <i>Solidago chilensis</i></u>	62
4.5.2.1. <u>Atividade da MPO</u>	63
4.5.2.2 <u>Estudo in vitro da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH)</u> ..	63
4.5.2.3. <u>Determinação de (GSH) de glutatona reduzida</u>	63
4.6 Atividade antinociceptiva	63
4.6.1 Animais	64
4.6.2 <u>Análise do limiar mecânico através de von Frey mecânico</u>	64
4.6.3 <u>Hiperalgisia mecânica induzida pela carragenina</u>	65
4.7 Atividade antiproliferativa.....	65
4.8 Expressão dos dados e análise estatística.....	66
5 RESULTADOS.....	67
5.1 Análise fitoquímica.....	67
5.1.1 <u>Isolamento e identificação das substâncias presentes nas folhas de <i>S. chilensis</i></u>	67
5.1.1.1 <u>Identificação do composto Afzelina</u>	69
5.1.2 <u>Isolamento e identificação das substâncias presentes na folha de <i>T. majus</i></u>	73
5.2 Atividade biológica.....	74
5.2.1 Atividade gastroprotetora.....	74
5.2.1.1 <u>Modelo de úlcera induzida por etanol 60 %/HCl 0.03M.</u>	74
5.2.1.2 <u>Efeito do extrato de <i>S. chilensis</i> sobre os níveis de muco aderido na mucosa após lesão induzida por etanol/HCl.</u>	76

<u>5.2.1.3 Efeito do extrato de <i>S. chilensis</i> na atividade sequestradora de radicais livres (DPPH)</u>	77
<u>5.2.1.4 Efeito o extrato de <i>S. chilensis</i> sobre os níveis de GSH após lesão gástrica induzida por etanol/HCl</u>	77
<u>5.2.1.5 Efeito do extrato de <i>S. chilensis</i> sobre os níveis de MPO após indução de lesão por etanol/HCl</u>	78
<u>5.2.1.6 Modelo de indução de úlcera induzida por indometacina</u>	79
<u>5.2.1.6 Efeito do extrato de <i>S. chilensis</i> na secreção ácida gástrica</u>	80
<u>5.2.1.7 Modelo de indução de úlcera em etanol avaliando os compostos isolados de <i>S. chilensis</i></u>	81
5.2.3 Atividade antinociceptiva	82
5.2.4 Atividade antiproliferativa	84
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICE A – Espectro de RMN ¹H do composto quercitrina	119
APÊNDICE B – Espectro de RMN ¹³C do composto quercitrina	121
APÊNDICE C – Espectro de RMN ¹H do composto epicatequina	123
APÊNDICE D – Espectro de RMN ¹³C do composto epicatequina	125

1 INTRODUÇÃO

A descrição do poder curativo das plantas é tão antiga quanto o aparecimento da espécie humana na terra. Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, princípios ativos os quais ao serem experimentados no combate às doenças revelavam empiricamente seu poder curativo (BADKE *et al.*, 2011; AKRAM *et al.*, 2014).

A história de muitos medicamentos que são utilizados atualmente poderia ser rastreada até a civilização helênica; drogas como o óleo de rícino, ópio, azeitona, erva-doce, hortelã-pimenta, açafraão, acácia e leveduras são mencionados no Papiro de Ebers (1500 a.C). Babilônios e assírios relataram grande número de medicamentos à base de plantas, como, coentro, canela e alcaçuz. O médico chinês Chou Kung, escreveu *Thya* em 1100 a.C., o livro menciona o uso de inúmeras drogas vegetais. Igualmente, os livros de Sustruta, escritos na Índia, no início da era cristã, reportam aproximadamente setecentos medicamentos fitoterápicos (AL-ASMARI *et al.*, 2014).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos se constituíam em sua maioria por plantas e extratos vegetais. O seu emprego com fins terapêuticos era alicerçado no conhecimento popular e científico. Desta forma, as plantas medicinais eram empregadas de modo generalizado de múltiplas formas: como fornecedoras de substâncias ativas isoladas, como extratos totais, como extratos purificados ou selecionados, como droga íntegra na preparação de infusos ou decoctos (SIMÕES *et al.*, 2000).

No Brasil, tem aumentado o interesse pelo estudo das plantas medicinais em resposta a recente tendência mundial de preocupação com a biodiversidade, pautada na ideia de desenvolvimento sustentável (MOSCA; LOIOLA, 2009; MESSIAS *et al.*, 2015). Observa-se no comércio brasileiro a venda de uma quantidade expressiva de espécies vegetais que se destinam ao tratamento de diversas enfermidades, e, recentemente aparecem como componentes de muitos produtos industrializados, comercializados como drogas vegetais e/ou fitoterápicos (MELO, 2007; GADELHA *et al.*, 2015).

O uso de plantas medicinais e da fitoterapia, encontram-se em ascensão mundial e endossam um mercado promissor (NASCIMENTO *et al.*, 2006), com cerca

de 50% de plantas utilizadas na alimentação, 25% na indústria cosmética, 20% na indústria farmacêutica e 5% em outras atividades, estimando-se em 10.000 o número de espécies vegetais medicinais (MELO, 2007). Globalmente, o setor movimenta US\$ 21,7 bilhões por ano. No entanto, não existem no Brasil dados oficiais atualizados, embora, estima-se que esse mercado movimente cerca de US\$ 160 milhões por ano. As vendas internas de fitoterápicos tem crescido 15% anuais, contra 4% das vendas dos medicamentos sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor de medicamentos fitoterápicos movimenta anualmente em torno de R\$ 1 bilhão (CARNEIRO *et al.*, 2014).

O Brasil apresenta a maior diversidade genética do mundo, aproximadamente 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Contudo, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% ao ano (CARNEIRO *et al.*, 2014).

Considerando a importância socioeconômica de pesquisas na área de produtos naturais ativos, espera-se ainda que o desenvolvimento deste projeto proporcione a formação de recursos humanos especializados de alto nível, de extrema importância para o desenvolvimento da indústria nacional.

Diante do exposto, o presente trabalho visou avaliar a atividade farmacológica e a composição química de *S. chilensis* e *T. majus* com intuito de esclarecer cientificamente os resultados clínicos obtidos diariamente com os indivíduos que adotam o uso de plantas medicinais em suas condutas terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a composição química e a atividade biológica das folhas de *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus*.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Obter extratos e frações das folhas das plantas *S. chilensis* e *T. majus*
2. Proceder estudos fitoquímicos para isolamento dos princípios ativos majoritários por meio de técnicas cromatográficas convencionais;
3. Identificar as substâncias isoladas usando técnicas espectrométricas convencionais e cromatográficas convencionais;
4. Verificar a atividade gastroprotetora do extrato e compostos através do modelo de úlcera induzida por etanol e indometacina em camundongos e ratos.
5. Verificar a atividade antinociceptiva do extrato por meio do modelo de hiperalgesia induzida por carragenina
6. Verificar a atividade antiproliferativa do extrato contra as células neoplásicas humanas: U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

As plantas têm sido a base da medicina tradicional, que por milhares de anos é empregada na China e Índia. Estes tratamentos por meio de plantas continuam a ter um papel imprescindível no cuidado à saúde, sendo estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que aproximadamente 80% dos habitantes mundiais confiam na medicina tradicional para o cuidado primário de sua saúde (CRAGG; NEWMAN, 2014).

Inicialmente, é importante diferenciar planta medicinal de fitoterápico. Para Veiga Junior e colaboradores (2005) a planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. O fitoterápico, por sua vez, é um medicamento tecnicamente obtido, com formulação específica, empregando-se apenas matéria prima de fonte vegetal, cujo efeito tenha sido comprovado cientificamente (KALLUF, 2008).

Verifica-se que droga vegetal é a planta inteira, ou suas partes, que após a coleta, secagem, estabilização e conservação, passam a ser utilizadas na preparação de medicamentos, considerando que o princípio ativo é o responsável pelos efeitos terapêuticos, tanto das plantas *in natura*, na forma de droga vegetal ou nas diferentes formas farmacêuticas (KALLUF, 2008; BRASIL, 2010).

A pesquisa fitoquímica com base na etnofarmacologia, aliada a química medicinal e a medicina, utilizam plantas consagradas pela medicina popular na frequente procura de princípios ativos e na obtenção de fitofármacos (compostos puros extraídos de plantas) (BRUSOTTI, 2013; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). Exemplos de fitofármacos empregados extensamente na terapêutica são a codeína, a efedrina, a quinina, a morfina, a atropina, a emetina (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). Obstante a investigação intensiva das plantas medicinais, estima-se que somente 6% de aproximadamente 300.000 espécies de plantas têm sido investigadas farmacologicamente e cerca de 15% fitoquimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013).

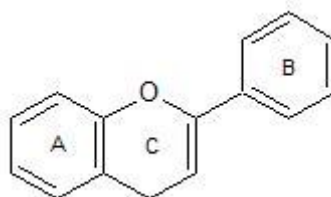
Em relação a composição fitoquímica das plantas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são fundamentais para seu

desevolvimento, os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os primeiros são encontrados em todos os seres vivos, imprescindíveis ao crescimento e a vida, são alguns deles aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos e lipídeos. Os metabólitos secundários reportam ao termo “produto natural”, pois são biossintetizados dos metabólitos primários, apresentam distribuição restrita a certas plantas e microorganismos, caracterizam-se por uma enorme diversidade química, como os alcalóides, esteróides, terpenóides, flavonóides (NIERO *et al.*, 2003).

3.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma classe de metabólitos secundários com ampla distribuição no reino vegetal sendo que mais de 9000 flavonoides já foram documentados nos últimos anos. Encontram-se nas plantas na forma de glicosídeos, apresentando-se como pigmentos amarelo, laranja, azul e roxo das flores, deste modo servem como atrativos para pássaros e insetos responsáveis pela polinização, protegem contra o excesso de radiação luminosa e raios ultravioleta, herbívoros e infecções fungo-patogênicas (DAMETTO, 2014; MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

Flavonoides são constituídos de baixo peso molecular derivados de fenilbenzopironas. Sua estrutura é composta por 15 átomos de carbonos e apresentam um anel aromático (anel A) ligado a um anel pirano (anel C) que está ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (anel B) (ZUANAZZI, 2002; MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).



Existem distintas subclasses de flavonoides, como: flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, antocianidinas, catequina, leucoantocianidina, isoflavona, chalcona e aurona, que variam de acordo com as substituições devido a reações de oxigenação, metilação, prenilação e glicosilação, estas catalisadas por diversas enzimas orientadas para a posição específica do substrato. Os flavonoides, podem ainda diferenciar-se em variadas classes de acordo com o número e natureza dos

grupos substituintes, ligados aos anéis. Contabilizando todas as suas modificações, os flavonoides incluem mais de 10000 estruturas (CORRADINI, 2011; AGATI *et al.*, 2012).

Os flavonoides são normalmente encontrados em vegetais, frutas, cereais e vinho, e podem ser usados como constituintes de suplementos alimentares, pois possuem potencial antioxidante, anti-inflamatório, de redução do LDL-colesterol, aumento de insulina, redução de mediadores de expressão associados à aterosclerose, além de potencial anti-hipertensivo, anticâncer, atividade neuroprotetora contra neurotoxinas, e de promoção do aumento da memória, do aprendizado e das funções cognitivas e proteção contra doenças cardiovasculares (DAMETTO, 2014; CÓRDOBA *et al.*, 2015).

Um dos flavonoides mais estudados é a quercetina, a qual pertence à classe dos flavonóis (flavonas com grupo 3-OH). A quercetina possui cinco grupos hidroxila, das quais dois estão no grupo fenil nas posições 3' e 4', e os três restantes estão nas posições 3, 5 e 7 do benzopirano. É encontrada na cebola, maçã e brócolis. Às vezes a quercetina aparece naturalmente em sua forma glicosilada, a qual é conhecida como Quercitrina. A Quercitrina possui adicionalmente um resíduo ramnosideo na posição 3 do benzopirano (LOPEZ AYME, 2014). Descreve-se efeitos terapêuticos da quercitrina em doenças inflamatórias como a colite (*in vivo*) (COMALADA *et al.*, 2005) e proteção de pele UVB (YIN *et al.*, 2013).

São descritas numerosas atividades biológicas sobre os flavonoides, mas há três atividades principais pelas quais esses compostos são bem conhecidos: atividade antioxidante, antiproliferativa e anti-inflamatória (MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

As flavonas e catequinas parecem ser os melhores flavonoides para a proteção do corpo contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) (NIJVELDT *et al.*, 2001). O mecanismo mediante o qual o flavonoide atua como antioxidante é direto, a que na presença de radicais livres de oxigênio os grupos hidroxila dos flavonoides são oxidados resultando em um radical mais estável e menos reativo (LOPEZ AYME, 2014).



Os efeitos antioxidantes já descritos para os flavonoides são exercidos por meio dos seguintes mecanismos:

- Como inibidores das enzimas responsáveis pela produção de O_2 , como a xantina oxidase, proteína quinase C (PKC), cicloxigenase (COX), lipoxigenase (LOX), monoxigenase microssomal, glutathiona S-transferase, succinodase mitocondrial e a NADH oxidase, todas envolvidas na geração de EROs;
- Como quelantes de metais divalentes, os quais executam um rol importante no metabolismo do oxigênio;
- Como coletores de EROs;
- Como participantes da *up-regulation* das defesas antioxidantes (MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

Visto a investigação dos flavonoides como agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos, os mecanismos de ação antiproliferativa incluem; a inativação de carcinógenos, efeito antiproliferativo, prisão da divisão celular, indução da apoptose e diferenciação, inibição da angiogênese, efeito antioxidante, reversão da resistência a multidroga e uma combinação entre esses mecanismos (MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

A capacidade anti-inflamatória dos flavonoides tem sido amplamente utilizada na medicina chinesa e na indústria de cosméticos. Distintas investigações provaram que inúmeras moléculas de flavonoides possuem atividade anti-inflamatória em vários modelos animais de inflamação, visto o grau de segurança que eles apresentam, sem efeitos ulcerogênicos de outras drogas anti-inflamatórias, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (KIM *et al.*, 2004; MUSCHIETTI; MARTINO, 2014).

Diversos mecanismos de ação celulares foram propostos explicando a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos flavonoides. Estes apresentam atividade antioxidante e de eliminação de radicais; regulam atividades celulares das células relacionadas com inflamação: mastócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos; modulam as atividades enzimáticas de ácido araquidônico (AA) que metabolizam enzimas, tais como a fosfolipase A2 (PLA2), COX, LOX, óxido nítrico sintase (NOS). A inibição destas enzimas por flavonóides reduz a produção de AA, as prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), que são mediadores cruciais da inflamação. Assim, a inibição destas enzimas exercida pelos flavonoides é definitivamente um dos mecanismos celulares importantes de anti-inflamação. Além disso, nos últimos anos, várias linhas de evidência apoiam a ideia de que certos flavonoides são os moduladores da expressão de genes, especialmente os moduladores da expressão de genes pró-

inflamatórios, conduzindo assim à atenuação da resposta inflamatória (KIM et al., 2004).

3.3 A planta: *Solidago chilensis*

3.3.1 Família Asteraceae

A família Asteraceae compreende cerca de 1100 gêneros e 25.000 espécies, é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas. Apresentam-se como plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Aproximadamente 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de *habitats*, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul. As plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm propiciado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas (VERDI; BRIGUENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Diversos trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae permitiram o isolamento de distintos metabólitos secundários com destaque aos flavonóides, designados como importantes marcadores quimiotaxonômicos, além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção de várias doenças (VERDI; BRIGUENTE; PIZZOLLATI, 2005; CONDE *et al.*, 2011; FIGUEREDO *et al.*, 2011; STOLZ *et al.*, 2014).

3.1.2 Características e uso popular de *S. chilensis*

As plantas do gênero *Solidago* pertencem à família Asteraceae (*Compositae*) (LORENZI *et al.*, 2002), considerada uma das maiores do reino vegetal. A espécie *S. chilensis* é a única espécie do gênero registrada no Brasil, é considerada invasora e substitui a espécie *Arnica montana*, pois as propriedades medicinais são similares (CORREIA *et al.*, 1998).

A espécie *S. chilensis* Meyen apresenta como sinônimos os seguintes nomes: *Solidago linearifolia* DC., *Solidago microglossa* DC. var. *linearifolia* (DC.) Baker., *Solidago polyglossa* DC., *Solidago marginella* DC., *Solidago odora* Hook., *Solidago vulneraria* Mart., *Solidago nitidula* Mart. (RUSSO; GARBARINO, 2008).

A sinonímia mais conhecida no Brasil é *Solidago microglossa*, nome que lhe foi atribuído por De Condole em 1836. Em virtude das regras de nomenclatura botânicas estabelecidas, quando ocorrerem sinônimos emprega-se sempre o nome mais antigo em conformidade e, nesse caso, *S. chilensis* foi nome dado ao vegetal por Meyen em 1834 e por isso é o nome válido (KISSMANN; GROTH, 1999).

Os nomes populares da planta são representados no Brasil, como: arnica, arnica-brasileira, arnicahorta, arnica-de-terreiro, arnica-brasil, arnica-silvestre, erva-federal, erva-lanceta, espiga-ouro, federal, flecha, lanceta, macela-miúda, marcela-miúda, rabo-de-foguete, rabo-de-rojão, sapé-macho (RUSSO; GARBARINO, 2008).

O nome "arnica" se tornou popular no Brasil depois da chegada dos imigrantes europeus, principalmente os italianos, no final do século dezenove. Estes novos colonos elegeram esse nome para as plantas que encontraram no Brasil devido a similaridade de aromas com a espécie *Arnica montana* da Europa (VIEIRA, 1999; MIGUEL, 2007).

Destaca-se como aspectos botânicos da planta *S. chilensis*: (1) erva perene com rizoma e talos eretos sem ramos (1 m de altura); (2) a folha é glabra, lanceolada linear, inteira, com três nervações; (3) suas flores são vermelhas ou amarelas, dispostas em cabeça radial dirigido para cima (Figura 1) (MUNOZ; BARRERA, MEZA, 1981).

Esta espécie possui um crescimento vigoroso e persistente, por isso ocorre espontaneamente em terrenos baldios, beira de estradas e pastagens, sendo considerada planta daninha (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 1. Fotografia das Partes aéreas de *S. chilensis*.

Fonte: www.sbs.com.br



O emprego das plantas do gênero *Solidago* na medicina popular em vários países data por mais de 700 anos, principalmente para o tratamento de nefrite, cistite, litíase renal e reumatismo (HÄNSEL *et al.*, 1994; BLUMENTHAL; BUSSE; GOLDBERG, 1998).

O gênero tem apresentado propriedades terapêuticas no uso popular, dentre elas diurética e espasmolítica (BONGARTZ; HESSE, 1995; THIEM; GOSLINSKA, 2002). A preparação caseira das espécies de arnica tem qualidades de medicação amarga, estomáquica, adstringente, cicatrizante e vulneraria (curativa de feridas e chagas). A arnica é uma planta considerada tóxica e deve ser administrada internamente com estrita indicação e monitoramento médico; é intensamente utilizada no tratamento de contusões em substituição a arnica-verdadeira (*Arnica montana* L.). Apresenta indicação na medicina veterinária, na qual suas inflorescências secas são queimadas e utilizadas no tratamento de uma doença bacteriana que afeta cavalos e se caracteriza pelo inchaço dos gânglios no pescoço. Comumente é utilizada em humanos por via tópica, destinada como primeiro tratamento de traumatismo e contusões, por meio da aplicação direta da tintura extraída sobre a área afetada, ou macerando suas folhas ou rizomas com álcool, e aplicando-a na área lesionada (LORENZI; MATOS, 2002).

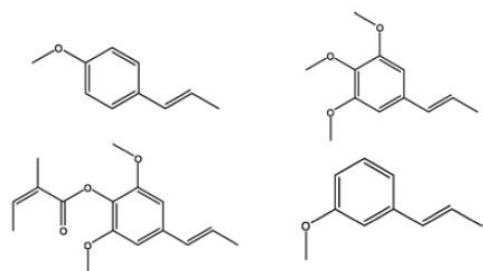
Na medicina popular brasileira, a planta é utilizada como diurético, analgésico, antiinflamatório, no tratamento de queimaduras e doenças reumáticas (MORS *et al.*, 2000). Na Amazônia, folhas de *S. chilensis* são utilizadas no preparo de soluções e pomadas para o tratamento de ferimentos de pele e para furúnculos (COELHO; SILVA, 1995).

3.1.3 Características químicas e atividade biológica de *S. chilensis*

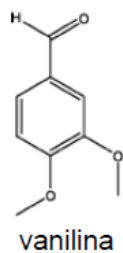
A planta *S. chilensis* Meyen, ainda com a sinonímia de *S. microglossa*, apresenta flavonóides como a quercitrina, a quercetina e a rutina, diterpenos clerodânicos e labdânicos, como a solidagenona, desoxissolidagenona, solidagolactona e outros derivados do solidagolactol (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012). A Figura 2 demonstra algumas substâncias químicas identificadas na planta *S. chilensis*.

Vila e colaboradores (2002) identificaram na composição química do óleo essencial de folhas e inflorescências de *S. chilensis* mono e sesquiterpenos comuns oxigenados e não oxigenados e dois diterpenos, o fitol e o pumilóxido.

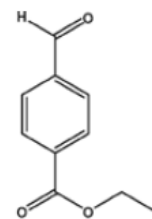
Figura 2. Substâncias químicas identificadas da *S. chilensis* Meyen (VALVERDE; OLIVEIRA; SOUZA, 2012).



Derivados fenilpropanóides *S. odora* – raízes (BOHLMANN et al., 1980)

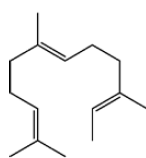


vanilina

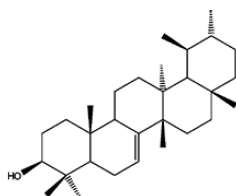


4- acetilbenzoato de etila

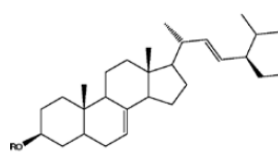
S. microglossa – partes aéreas (TORRES, AKISUE E ROQUE, 1987)



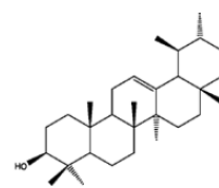
β -farneseno



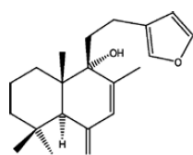
bauerenol
(Friedo-7-em-3 β -ol)



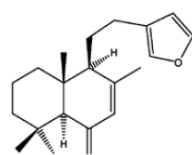
R=glucopiranosídeo
 α -espinasteril glicopiranosídeo



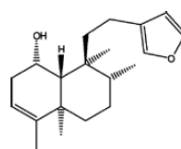
α -amirina



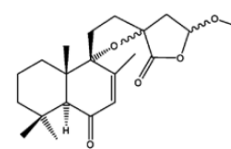
solidagenona



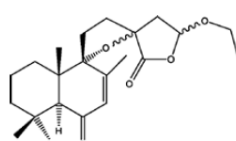
desoxissolidagenona



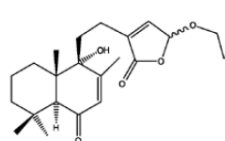
[15,16-epoxi-1 α -hidroxi-3,13(16),14-friedolabda-trieno (17 α , 18 α , 20 α)]



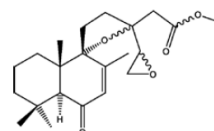
I-solidagolactol



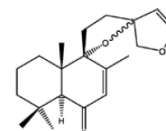
II-solidagolactol



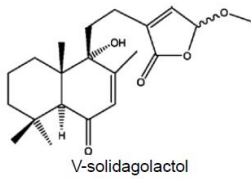
IV-solidagolactol



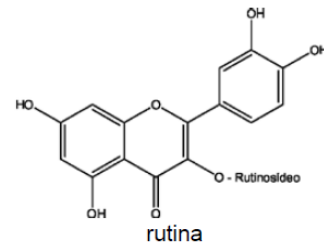
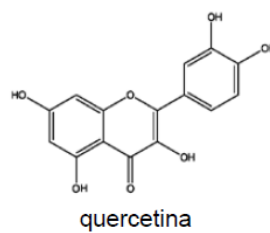
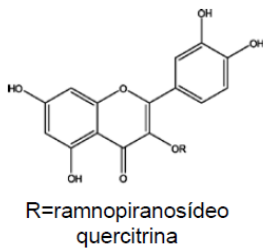
éster metílico do ácido 9,13,16,22-diepoxi-6-oxo-7-labdeno-15-oico



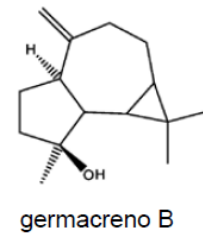
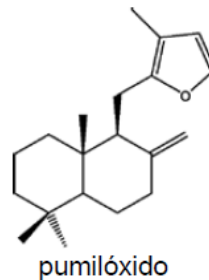
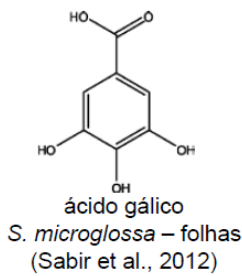
pré-solidagenona



Derivados terpênicos *S. microglossa* – partes aéreas (TORRES, AKISUE E ROQUE, 1987)



Derivados flavonóidicos *S. microglossa* – partes aéreas (TORRES, AKISUE E ROQUE, 1987) *S. microglossa* – folhas (SABIR *et al.*, 2012)



Derivados terpenoídicos do óleo essencial *S. chilensis* – folhas (VILA *et al.*, 2002; GRESSLER *et al.*, 2003)

Diterpenos (solidagenona) foram isolados da raiz de *S. chilensis* (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1987) que apresentaram atividade gastroprotetora no modelo de lesão gástrica induzida por ácido clorídrico, em camundongos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2002). Das partes aéreas de *S. chilensis*, isolou-se em maior quantidade, o flavonoide quercitrina (TORRES *et al.*, 1987), ao qual foi atribuída atividade antioxidante utilizando-se ensaios *in vitro* (APÁTI *et al.*, 2006).

Os flavonoides despertam interesse considerável devido sua ampla atividade farmacológica. Efeitos supostamente terapêuticos de muitos medicamentos tradicionais podem ser relacionados com a presença destes polifenóis. Relata-se na literatura que os flavonoides apresentam atividades anti-viral, anti-alérgica, anti-plaquetas, anti-inflamatória e anti-tumorais. Estudos epidemiológicos demonstram uma correlação entre maior teor dietético de flavonóides e um menor risco de câncer

e doenças cardiovasculares (RUSSO; GARBARINO, 2008; DI CARLO et al., 1999; RUSSO et al., 2000).

As propriedades farmacológicas dos flavonoides foram atribuídas, em parte, tanto para a inibição concomitante de enzimas tais como COX e xantina oxidase envolvidos na produção de radicais livres, e as suas propriedades antioxidantes. Com base nessas observações, a utilização tradicional de *S. chilensis* Meyen para tratar sintomatologias relacionados com a inflamação, pode estar fortemente relacionada com o teor de flavonoides, e em particular devido a capacidade antioxidante desta família de compostos (RUSSO; GARBARINO, 2008).

Em relação à atividade gastroprotetora, a literatura científica sugere que o efeito de *S. chilensis* a nível gastrointestinal pode ser correlacionada com a presença de compostos de flavonóides com atividade antioxidante. Relata-se a ação dos flavonóides no trato gastrointestinal, como anti-úlceras, antiespasmódico, anti-secretor ou como agente antidiarréico, e há muitos estudos sobre os mecanismos envolvidos nas propriedades antiulcerogênicas dos flavonóides (DI CARLO et al., 1999; GONZALEZ; DI STASI, 2002). Consideravelmente interessantes são aqueles compostos que apresentam um núcleo de catecol, o qual tem sido relacionado a sua atividade antioxidante (AZUMA et al., 2000).

O papel das EROS na patogênese das lesões agudas na mucosa gástrica induzidas por etanol e efeitos da quercetina, foi avaliado em um modelo experimental. Além disso, os efeitos da quercetina no dano gástrico foram avaliados histologicamente. A quercetina (200 mg/kg de peso corporal) ofertada por gavagem intragástrica 120 minutos antes da administração do etanol, em ratos tratados com etanol reverteu o aumento dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido gástrico, compostos de carbonila, os níveis de histamina e as atividades de mieloperoxidase (MPO), o que sugere que o efeito protetor gástrico de quercetina, neste modelo experimental pode ser devido aos efeitos antiperoxidativo, antioxidante e anti-histamínicos (RUSSO; GARBARINO, 2008).

Bucciarelli et al, 2007 avaliou a atividade gastroprotetora dos extratos aquosos e metanólicos de *S. chilensis* no modelo de úlcera induzida por etanol, em ratos. Verificou-se citoproteção gástrica de 91,9% com doses de 350 mg/Kg (extrato aquoso) e melhor capacidade gastroprotetora (97,4%) com doses de 400 mg/Kg (extrato aquoso).

Ainda, Buciarelli *et al*, 2010, demonstrou que a administração oral do extrato aquoso das inflorescências de *S. chilensis* evitou a formação de lesões gástricas, provocadas por etanol, quando administrado a 125-2000 mg/kg ($p < 0,05$), mas não produziu toxicidade aguda por exposição nos animais (2000 mg/kg).

Considerando que os neutrófilos estão envolvidos na fase inflamatória da cicatrização de feridas, Gastaldo *et al.*, 2012, investigaram os efeitos de *S. chilensis* no processo de cicatrização de feridas. Realizou-se ferida na superfície dorsal dos ratos e foi administrado extrato hidroalcoólico liofilizado à 70% por via tópica. Observou-se redução de 52% da área da ferida no quinto dia estudo. Nas bolsas de ar o influxo de neutrófilos foi aumentado 18 vezes, quando comparado ao controle e induziu um aumento significativo de interleucina-1 (IL-1), L-selectina e interleucina-6 (IL-6). Ainda inibiu fortemente a migração de fMLP estimulada por neutrófilos e a quantidade de citocinas IL-6, L-selectina, IL-1, fator de necrose tumoral (TNF). Na cultura humana um aumento de liberação de citocinas também foi notado. No extrato, identificaram-se compostos fenólicos, principalmente quercitrina, que possui atividade anti-inflamatória, como também presença de terpenóides. Os resultados sugerem que *S. chilensis* pode regular a acumulação e esgotamento dos neutrófilos nos focos inflamatórios e podem modular a fase inflamatória da cicatrização de feridas.

O extrato aquoso, butanólico e frações residuais aquosas da raiz de *S. chilensis* foram avaliados na inflamação ocasionada por carragenina no modelo bolsa de ar em ratos. Todos os extratos inibiram significativamente os níveis de leucócitos, neutrófilos, exsudação, MPO, atividade da adenosina-desaminase, NOS, interleucina-1 β (IL-1 β), quimiocinas, neutrófilos e TNF; indicando que a *S. chilensis* apresenta significativa ação anti-inflamatória em respostas inflamatórias agudas e sua atividade inibitória pode ser devido não somente à inibição de mediadores pró-inflamatórios, como também pela inibição da infiltração de leucócitos (LIZ *et al.*, 2008).

Investigação recente de Assini *et al.* (2013), avaliou que o extrato aquoso (25, 100 e 250mg/kg) das raízes de *S. chilensis* não apresentou atividade anti-depressiva em modelos experimentais *in vivo*, porém induziu efeito analgésico e anti-inflamatório significativos, sendo que foi observado redução da atividade locomotora com a maior dose administrada (250 mg/kg), sugerindo efeito sobre sistema nervoso central.

3.2 A planta: *Tropaeolum majus*

3.2.1 Família *Tropaeolaceae*

O gênero *Tropaeolum* L. (Tropaeolaceae), com cerca de 90 espécies, é um gênero austroamericano que apresenta distribuição desde o sul do México até a Patagônia Argentina, principalmente pela Cordilheira dos Andes (SPARRE & ANDERSSON, 1991). As espécies de *Tropaeolum* estão presentes em florestas, arbustos mistos, ravinas húmidas, encostas rochosas e planícies, até 3000 m de altitude. Elas incluem ervas rasteiras e trepadeiras, com ou sem tubérculos, facilmente distinguíveis por ter folhas peltadas, lobuladas e palmadas; flores cigomorfas com haste longa nas cores amarelo, laranja ou vermelho. A maioria são anuais, exceto *T. pentaphyllum* Lam., *T. polyphyllum* Cav., *T. incisum* (Speg.) Sparre e *T. tuberosum* Ruiz et Pav. subsp. *silvestre* Sparre (GARRALLA; BULACIO, 2011).

3.2.2 Características e uso popular de *Tropaeolum majus*

Importante planta medicinal da América do Sul é a espécie *T. majus* L. (Tropaeolaceae), planta nativa dos Andes da América do Sul (México e Peru), levada à Europa pelos descobridores, sendo amplamente distribuída no mundo e cultivada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002; FERRO, 2006). A espécie vegetal é conhecida popularmente como chaguinha, capuchinha, nastúrcio, chagas, mastruço, agrião-do-méxico, capuchinho, capuchinha-grande, mastruço-do-peru, flor-de-sangue, flor-de-chagas, agrião-da-índia, cinco-chagas e capucine, também possui como sinonímia o nome de *Cardaminum majus* Moench (PANIZZA, 1997; LORENZI; DE SOUZA, 2001; LORENZI; MATOS, 2002).). As folhas e flores frescas de *T. majus* L. são utilizados na alimentação, especialmente em saladas, e foram apontados por um estudo como excelente fonte do carotenoide luteína (NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005; GARZÓN; WROLSTAD, 2009; MLCEK; ROP, 2011).

A morfologia dessa planta apresenta folhas alternas, de limbo simples, discolors, membranáceo, liso e pouco ceroso. O pecíolo é afilado para o ápice,

atinge em média 9 cm x 0,5 cm na base e 0,2 cm no ápice, possui superfície estriada, inserção central e é circular em secção transversal. O caule é arredondado e se apresenta caracteristicamente em zig-zag decorrente das cicatrizes foliares, formando ângulos de 120-135°. Atinge em média 1 cm de diâmetro, e chega a 5 m de comprimento; não é esfoliativo e apresenta cor verde-clara com base pintalgada em vermelho-salmão na região central que se dispersa em tons róseos claros, conforme figura 3 (ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004).

Figura 3. Planta *T. majus*.
Fonte: Horto de plantas da UNIVALI.

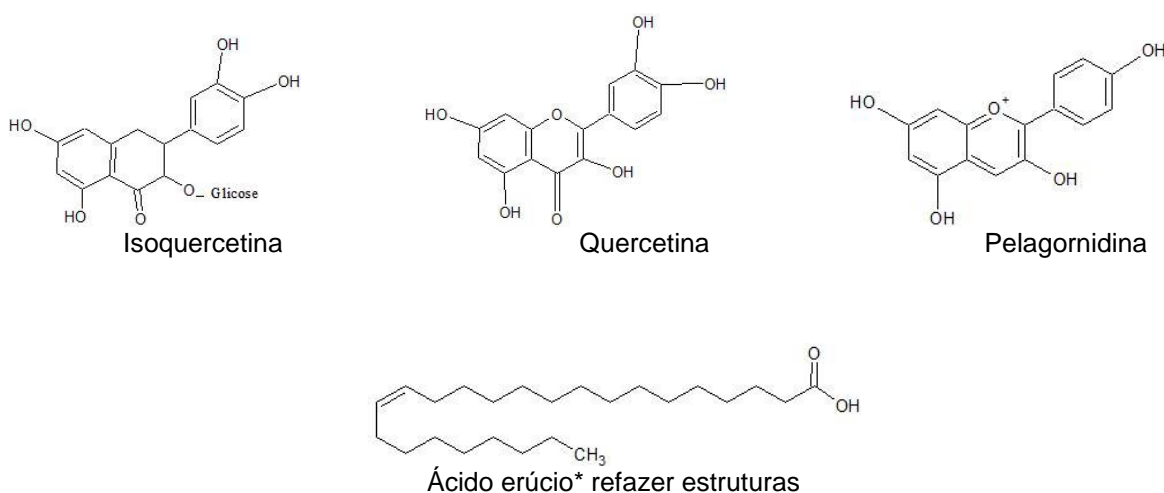


As folhas de *T. majus* são utilizadas na medicina popular contra doenças cardiovasculares, infecções do trato urinário, asma e constipação (CORREA, 1978; FERREIRA et al, 2004; FERRO, 2006). As flores de capuchinha têm sabor apimentado, semelhante ao agrião devido à presença de compostos sulfurados. Os botões florais e os frutos, preparados em picles apresentam gosto semelhante à alcaparra. Atualmente é muito utilizada pelos restaurantes, que servem suas folhas e flores em saladas frescas, nutritivas e atraentes (MARTINS *et al.*, 1994; BOWN, 1995; PANIZZA, 1998; BOORHEM, 1999). É considerada antiescorbútica, anti-séptica, fortificante dos cabelos e para tratamento de afecções pulmonares (BOORHEM, 1999).

3.2.3 Características químicas e atividade biológica de *T. majus*

A planta *T. majus* destaca-se pela presença de glicosinolatos (benzilglicosinolatos), como glucotropaeolina e sinalbina, e triterpenos tetracíclicos previamente isolados a partir das folhas da planta (LYKKESFELDT; MELLER, 1993; GRIFFITHS *et al.*, 2001). A literatura científica demonstra a presença de ácidos graxos (ácidos erúcio, ácidos oleico, ácido linoleico), ácido clorogênico, isotiocianato de benzila e flavonoides (isoquercetrina, quercetina e caempferol, pelargonidina) nas folhas, flores e sementes de *T. majus*, como se pode observar na Figura 4 (DE MEDEIROS *et al.*, 2000; MIETKIEWSKA *et al.*, 2004; ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004; SANTO *et al.*, 2007).

Figura 4. Estruturas químicas da planta *T. majus*.



Estudos fitoquímicos anteriores relataram ocorrência dos flavonóides isoquercitrina e kaempferol glicosídeo, nas folhas de *T. majus* (DE MEDEIROS *et al.*, 2000.; MIETKIEWSKA *et al.*, 2004;.. ZANETTI *et al.*, 2004). Diversos estudos revelaram um número de propriedades farmacológicas relevantes associadas com flavonóides, tais como antioxidante, diurética e efeito cardioprotetor (SCHRAMM; GERMAN, 1998;. LACAILLE *et al.*, 2001;. MAGHRANI *et al.*, 2005; EMURA *et al.*, 2007;. WU; MUIR, 2008).

A segurança do uso de plantas medicinais necessita sempre de confirmação científica, para isso, Gomes *et al.*, 2012, avaliaram a toxicidade subcrônica do extrato hidroetanólico obtido a partir de folhas de *T. majus* em ratos Wistar. Animais de ambos os gêneros receberam doses de 75, 375 e 750mg/kg do extrato durante

28 dias. Não foram observadas alterações significativas no peso dos animais e órgãos, análises séricas bioquímica e histopatológica do fígado, rim e baço, demonstrando ausência de toxicidade subcrônica pelo uso do extrato de *T. majus*.

Lourenço *et al.*, 2012, avaliaram a atividade anti-estrogênica e anti-androgênica do extrato hidroetanólico obtido a partir de *T. majus* L. (HETM), bem como seus possíveis efeitos sobre a contratilidade uterina. Foram realizados 3 ensaios: uretrófico, Hershberger e contratilidade uterina no final da gravidez, utilizando-se doses de 3, 30 e 300 mg/kg de HETM em ratos *Wistar*. Os resultados evidenciaram que o HETM foi incapaz de produzir atividade anti-estrogênica e anti-androgênica e não afetou a contratilidade uterina após a exposição de ratos em período gestacional.

3.4 Úlcera péptica

A úlcera péptica, uma das maiores causas de morbidades no mundo, é descrita como uma área lesionada da mucosa gástrica e/ou duodenal, sendo causada por múltiplos fatores incluindo estresse, cigarro, deficiência nutricional, agentes nocivos como álcool, anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), infecções por *Helicobacter pylori* entre outros (BELAICHE *et al.*, 2002).

A úlcera péptica é formada por uma margem constituída pela mucosa adjacente não necrosada (composta de tecido epitelial) e a base da úlcera (composta de tecido de granulação). Este último consiste de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais formando microvasos (TARNAWSKI, 2000). A cicatrização das úlceras pépticas é um processo ativo e complexo que inclui a reconstrução da mucosa pela formação de tecido de granulação na base da úlcera, formação de novos vasos através da angiogênese e o reestabelecimento da arquitetura glandular (KONTUREK *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da doença ulcerosa péptica é melhor representada como um complexo cenário envolvendo o desequilíbrio entre os fatores de defesa da mucosa (bicarbonato, muco, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico, fatores de crescimento, etc.) e fatores agressivos que compreendem os agentes químicos, que podem ser endógenos (HCl, pepsina) ou exógenos (etanol, antiinflamatórios não esteroidais), e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*) (NATALE *et al.*, 2004).

A regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, mediado por mecanismos neurais, hormonais e autócrinos em níveis central e periférico os quais convergem para a etapa final da secreção de ácido clorídrico (HCL): a atividade da enzima H^+/K^+ -ATPase nas células parietais gástricas (SCHUBERT, 2004).

Entre os modelos farmacológicos que induzem úlcera gástrica em animais, a utilização do etanol é amplamente divulgada (LOGUERCIO et al., 1993). A utilização de etanol na indução de lesão é realizada através de procedimentos simples e reprodutíveis, com a administração de diferentes quantidades (0,5 a 2 ml) de etanol concentrado (50-100%). Dependendo da quantidade administrada, entre 10 e 40% da porção glandular dos estômagos de ratos e camundongos, aqueles se tornam cobertos por lesões hemorrágicas e úlceras que são observadas entre 1-2 horas após a administração (GLAVIN, 1992). Os danos causados pelo etanol na mucosa gástrica devem-se aos distúrbios na microcirculação da mucosa, isquemia, aparecimento de radicais livres, desgranulação dos mastócitos, inibição das prostaglandinas e diminuição da produção de muco (SAMONINA et al., 2004). O ácido acético, outro indutor ulcerogênico, forma úlceras por causar processo inflamatório crônico e necrose de mucosa (OKABE; PFEIFFER, 1972) e a indometacina, um AINE, induz a formação da úlcera gástrica por inibir de forma não-seletiva a COX, inibindo a síntese de prostaglandinas, as quais estão envolvidas em vários mecanismos citoprotetores (SAIRAM, 2002).

Atualmente, os fármacos utilizados para tratamento de desordens gástricas produzem muitos efeitos adversos, por exemplo, os inibidores da bomba de prótons (IBP) - omeprazol, lansoprazol, podem ocasionar cefaléia, diarreia, dor abdominal, náusea, rash cutâneo, constipação, deficiência de vitamina B12, elevação de transaminases, proteinúria, angina e hipotensão. Além disso, estão associados com a recorrência de ulcera e interações medicamentosas, visto que os IBP podem reduzir a biodisponibilidade de drogas que precisam de um pH mais baixo para sua absorção, tais como ampicilina, cianocobalamina, ferro, digoxina e cetoconazol; ainda os IBP podem inibir ou induzir enzimas CYO do sistema P450 e apresentam o efeito potencial de interagir com drogas metabolizadas por essa via enzimática. Em humanos, foram identificadas interações do omeprazol com fenitoína, benzodiazepínicos, diazepam, carbamazepina, claritromicina, metotrexate e

warfarina (MARCHETTI, F.; GERARDUZZI, T.; VENTURA, 2003; KEARNS; WINTER, 2003).

Na medicina tradicional, várias plantas têm sido usadas para tratar doenças gastrointestinais, incluindo úlceras gástricas (SILVA *et al.*, 2009). Por esta razão, há um interesse crescente em terapias alternativas e a utilização de produtos naturais (KLEIN-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Isto é particularmente verdade no que diz respeito aos flavonóides, que representam uma classe altamente diversificada de metabólitos secundários com efeitos potencialmente benéficos para saúde humana. Eles exibem várias propriedades farmacológicas na área gastroprotetora, agindo como anti-secretor, citoprotetor e como agente antioxidante. Além de sua ação como gastroprotetor, flavonóides também atuam na cicatrização de úlceras gástricas e, adicionalmente, estes compostos polifenólicos podem ser novas alternativas para a supressão ou a modulação de úlceras pépticas associadas a *H. pylori* (MOTA *et al.*, 2009).

3.5 Dor e inflamação

A Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) cita a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). Esta definição afirma que a dor apresenta um caráter multidimensional, pois envolve componentes sensorial-discriminativos, motivacional-afetivos, autonômicos e motor-reflexivos (CRAIG *et al.*, 2003, TANIMOTO *et al.*, 2003)

O termo nocicepção é bem definido pelo reconhecimento dos sinais dolorosos pelo sistema nervoso central, que formula informações relacionadas à lesão. Porém, além dos componentes fisiológicos, a dor também agrega fatores emocionais, que podem agir no aumento ou diminuição da sensação dolorosa. Uma resposta típica frente ao estímulo nocivo é o reflexo de retirada, que visa a interrupção deste estímulo, tal resposta é característica da dor aguda provinda de estímulos intensos na superfície da pele. (BASBAUM *et al.*, 2009; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Na nocicepção são transmitidos estímulos nocivos para o sistema nervoso central por transdutores especializados ligados às fibras sensoriais, que podem ser de pequeno, médio e grande calibre (fibras A δ e C). É ativada quando ocorrem

danos nos tecidos, gerando alterações inflamatórias e neurais no local afetado (LOEZER; MELZACK, 1999). Então, o processo de transmissão da dor ocorre após os neurônios de primeira ordem transmitirem os impulsos pelas fibras A δ e/ou C até o SNC. Estas fibras apresentam características anatômicas e funcionais distintas, porém são componentes importantes para o início da transmissão do impulso nociceptivo (BASBAUM *et al.*, 2009; FURST, 1999)

Dessa forma, a inflamação é um processo fisiológico acionado toda vez em que um agente agressor físico, químico ou biológico, ultrapassa uma barreira primária de defesa do corpo humano – a camada epitelial e/ou endotelial e suas estruturas especializadas. A inflamação tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação dos componentes específicos e não específicos da imunidade. No primeiro caso, são importantes o processo de reconhecimento e a geração de células efetoras e seus produtos (citocinas e anticorpos). O componente não específico atua através da destruição, diluição ou isolamento do agente agressor (GALLIN *et al.*, 1992; PAUL, 1998; CARNEIRO, 2009), envolvendo a ação de células fagocíticas e de mediadores, bem como sua migração para o sítio de injúria.

Os indutores da inflamação podem ser de natureza física, química ou traumática (ROBBINS *et al.*, 2010). Os danos ocasionados pelos agentes agressores são detectados por macrófagos residentes do tecido lesado, que induzem uma resposta inflamatória e ativam os nociceptores, causando sensação de dor na área afetada (MEDZHITOV, 2010). Isso ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios pelas 32 células danificadas como, histamina, bradicinina, e as prostaglandinas, que, além de provocarem reação inflamatória, levam a marginação e migração dos leucócitos para o tecido afetado, onde realizam fagocitose e outros processos atribuídos à resposta imune, sensibilizando também as terminações nervosas sensoriais, levando a nocicepção e a transmissão da dor (BECKER, 2013). Concomitantemente, ocorre a produção de citocinas pró- inflamatórias, tais como TNF α e interleucina-1 (IL-1), que ativam vias de sinalização em células endoteliais e regulam a expressão de moléculas de adesão para que uma maior quantidade de leucócitos e células fagocitárias possam se infiltrar para o sítio da lesão (FALCÃO *et al.*, 2005; FERRERO-MILIANI *et al.*, 2007). Além disso, aumentam a síntese de prostaglandinas e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias, como as

quimiocinas, que atraem e ativam células inflamatórias móveis (LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008)

Para a avaliação do mecanismo de ação antiinflamatória de diferentes fármacos e plantas, há modelos de inflamação já descritos, como a bolsa de ar, a pleurisia, o edema de pata, a artrite e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

A carragenina é um mucopolissacarídeo derivado de algas marinhas denominadas *Chondrus*, que causa uma inflamação do tipo adaptativa, não produz efeitos sistêmicos e proporciona alto grau de reprodutividade (BOLETA-CERANTO *et al.*, 2005). Ela proporciona uma inflamação aguda e altamente reprodutível. Sinais cardinais da inflamação, tais como edema, hiperalgesia e eritema desenvolvem-se imediatamente após injeção de carragenina no tecido subcutâneo (JORGE *et al.*, 2006).

O edema de pata induzido por carragenina proporciona todos os eventos bioquímicos e celulares, que já foram claramente descritos no passado e constantemente atualizados através de novas descobertas e tem sido cada vez mais usado para testar drogas anti-inflamatórias assim como para estudar os mecanismos envolvidos na inflamação (POSADAS *et al.*, 2004). É um modelo útil para avaliar a contribuição de mediadores presentes nas alterações vasculares associadas à inflamação aguda (SALVEMINI *et al.*, 1996).

Desta forma, o modelo por carragenina foi escolhido pelo fato de desencadear um estado inflamatório decorrente da liberação de prostaglandinas, serotonina e outros mediadores (DI ROSA, 1972).

3.6 Câncer

O câncer é ainda a maior causa de morte no mundo, apesar dos avanços tecnológicos em diversas áreas durante as últimas duas décadas (STEWART; WILD, 2014). As estimativas atuais da Sociedade Americana de Câncer e da União Internacional de Câncer indicam que foram diagnosticados doze milhões de casos de câncer em 2013, respondendo por 8,2 milhões de mortes no mundo em 2012, esses números devem dobrar até 2030, dos quais 62% serão provenientes de países em desenvolvimento (27 milhões de casos, com 17 milhões de mortes) (STEWART; WILD, 2014; SEER, 2012; MARTEL *et al.*, 2012).

O tumor surge como resultado de vários eventos, podendo ser eles fatores externos como agentes infecciosos, agentes químicos, radiação ionizante ou fatores internos como mutações herdadas, disfunção hormonal, condições imunológicas e mutações geradas em decorrência do metabolismo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Estes fatores causais podem agir juntos ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese. O diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento, no entanto é estimado que dez ou mais anos se passem entre a exposição à fatores externos e a detecção do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

A patogênese do câncer representa um dos problemas mais complexos em biologia, pois muitos dos aspectos pelos quais uma célula normal é transformada numa célula neoplásica permanecem sem causas definidas. Todavia, alterações nos mecanismos regulatórios são críticos para a homeostase, permitindo que as células tumorais possuam novas características tais como a invasão de tecidos, metástase e angiogênese. Algumas das vias de controle são ativadas, tais como proliferação celular, progressão do ciclo celular e vias de sobrevivência, enquanto outras são reprimidas, como as vias de morte celular e apoptose (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012).

As plantas apresentam uma longa história de seu uso para tratamento do câncer. Mais de 3000 espécies de plantas foram reportadas e envolvidas no desenvolvimento de drogas anticâncer, e 60% de agentes anticâncer são de fontes naturais (CRAGG; NEWMAN, 2005; BAILLY, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2014).

A prevenção do câncer compreende uma estratégia promissora. Assim como existem vários estudos que comprovam a atividade antineoplásica de extratos de plantas medicinais, também existem plantas com atividade quimioprotetora. Quimioprevenção é definida pelo uso de substâncias de origem natural, agentes biológicos, sintéticos ou compostos químicos para prevenir ou suprimir a progressão da doença, reverte para as funções fisiológicas normais e efetua a detecção precoce de situações patológicas (HIRSCH; MERRICK; FRANKLIN, 2002; TSAO; KIM; HONG, 2004). Através dos agentes quimiopreventivos se espera superar problemas, como câncer de pele (melanoma), osteoporose, e doenças degenerativas (LIN; TSAI, 1999; ULIASZ; SPENCER, 2004).

Estudos pré-clínicos e clínicos neste campo têm reportado dados valiosos na prevenção do aparecimento de doenças e na supressão do progresso de seu

crescimento (ADHAMI; KHAN; MUKHTAR, 2009; BISHAYEE et al., 2011). A *Hancornia speciosa*, a *Mansoa hirsuta* e o *Jacarandá canoa* são três espécies que apresentaram forte atividade quimioprotetora inibindo o NF- κ B, a COX-1 e induzindo elementos de resposta antioxidante (ENTRINGER et al., 2010). O chá verde também parece ter atividade quimioprotetora para o câncer de próstata, apresentando atividade antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo ao DNA (HENNING et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Materiais vegetais

As partes aéreas (flores, folhas e galhos) de *S. chilensis* foram coletadas no município de Bom Retiro – SC em março de 2013, sendo armazenadas para secagem em temperatura ambiente na sala de Plantas da UNIVALI, para posterior utilização (somente folhas). Já *T. majus* foi cultivada e colhida no Horto de plantas da UNIVALI (Itajaí) em outubro de 2013, sendo utilizada a folha fresca para obtenção do extrato. As plantas foram autenticadas pelo professor Oscar Iza da UNIVALI, e exemplares autênticos das plantas foram depositadas no Herbário Barbosa Rodrigues em Itajaí, Santa Catarina, sob número de excicata VCFilho 98 e VCFilho 99, respectivamente.

O perfil cromatográfico por CCD dos extratos, frações e substâncias puras obtidas foi delineado por meio da utilização de placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ de 20µm de espessura preparadas sobre as folhas de alumínio da Merck.

Nos procedimentos de cromatografia em coluna, foi utilizada como fase estacionária, sílica gel 60 (Merck) de granulometria 70-230 mesh ($\phi = 0,063 - 0,20\text{mm}$). O diâmetro e altura das colunas foram determinados de acordo com a quantidade do material a ser cromatografado. A eluição foi realizada com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. Os solventes usados foram hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (CH₃OH) provenientes dos Laboratórios Dinâmica, Quimex ou Vetec. As frações obtidas foram reunidas de acordo com as semelhanças de fator de retenção (Rf) verificadas nas CCDs.

Para análise de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram utilizados solventes deuterados (acetona, clorofórmio e metanol), provenientes da Cambridge Isotope Laboratories Inc.

Além disso, foram utilizados (para extração/partição) outros solventes como acetona, clorofórmio, éter, metanol (CH₃OH), diclorometano (DCM) e sulfato de sódio, advindos comercialmente dos Laboratórios Dinâmica, Quimex e Vetec.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção dos extratos

O material vegetal (folha) picado em pequenos pedaços das plantas *S. chilensis* (1670 g) e *T. majus* (470 g), foi extraído mediante maceração estática em metanol, a frio, durante 7 dias. Após, o material foi filtrado e o solvente foi removido por destilação em evaporador rotatório sob pressão reduzida, marca TECNAL TE-2II com controle de temperatura (50°C), e pesados em balança analítica SHIMADZU LIBROR-AEG-220 e SHIMADZU LIBROR-EB-33OD.

4.2.2 Preparo das frações

Os extratos foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, como clorofórmio (CHCl₃) e acetato de etila (AE), para a obtenção das respectivas frações semi-purificadas. A escolha destes solventes foi devido ao melhor perfil de separação observado experimentalmente em nossos laboratórios (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; MALHEIROS et al., 2010).

O extrato metanólico de *S. chilensis* (168 g – 10,94%), foi resuspenso em uma mistura de metanol (MeOH):H₂O 90:10 e submetido à partição líquido-líquido com os solventes CHCl₃ e AE para obtenção das frações. As mesmas foram concentradas em rotaevaporador, tendo como rendimento 4,32 g (CHCl₃) e 1,48 g (AE), conforme indicado na Figura 5.

O extrato metanólico de *T. majus* (23,5 g – 5%), foi resuspenso em uma mistura de MeOH:H₂O 90:10 e submetido a partição líquido-líquido com os solventes CHCl₃ e AE para obtenção das frações. As mesmas foram concentradas em rotaevaporador, tendo como rendimento 1,86 g (AE) e 320 mg (CHCl₃) (Figura 6).

Após a eliminação do solvente, as frações das plantas em estudo foram acondicionadas em dessecador sob sílica gel ativada para posterior análise.

Figura 5. Fluxograma resumido da obtenção das frações de *S. chilensis* a partir do extrato metanólico.

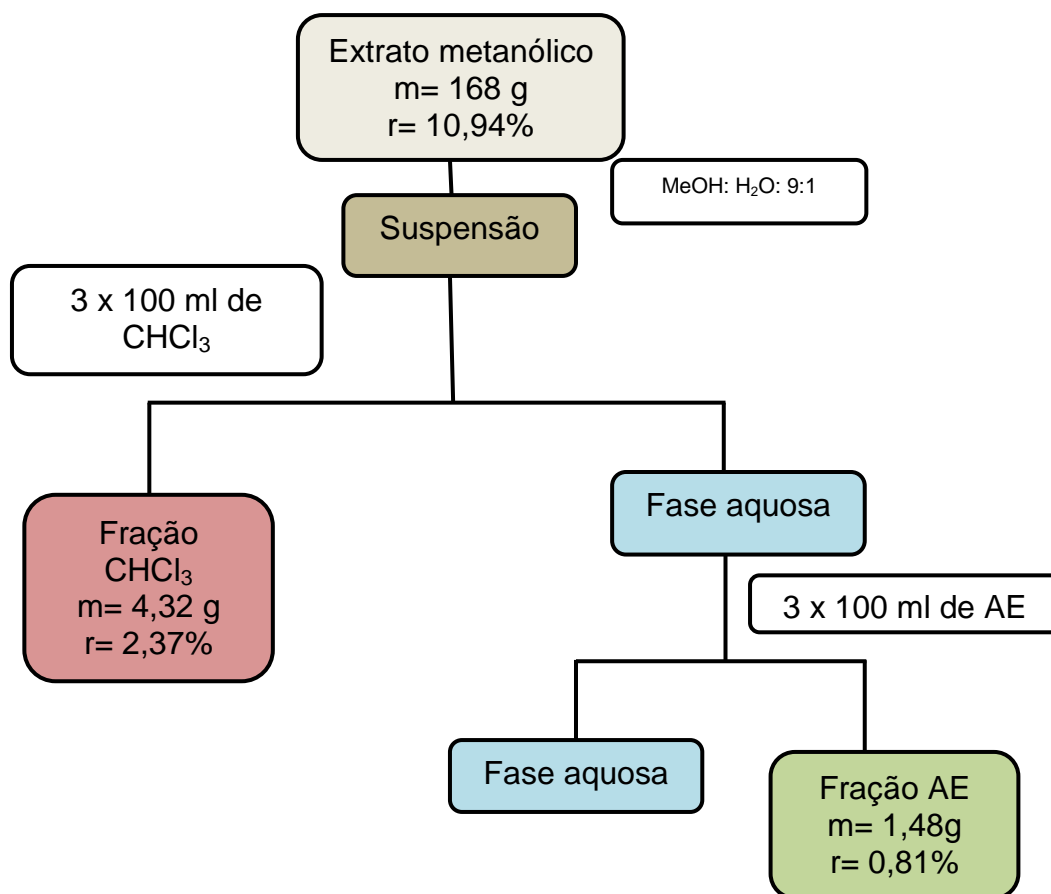
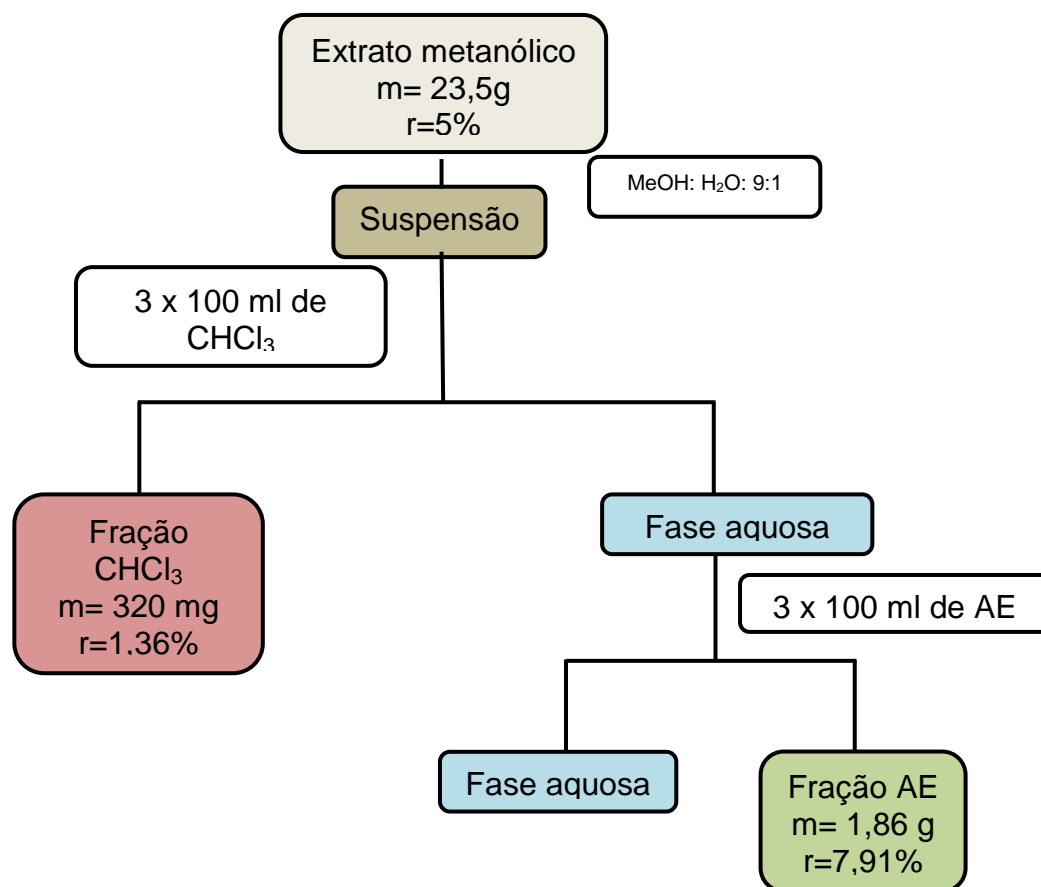


Figura 6. Fluxograma resumido da obtenção das frações de *T. majus* a partir do extrato metanólico



4.2.3 Isolamento e purificação

Os extratos e frações das plantas *S. chilensis* e *T. majus* foram analisados por meio da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), por meio da utilização de placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ de 20µm de espessura preparadas sobre as folhas de alumínio da Merck. Posteriormente à eluição, as cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes da revelação destrutiva da amostra com os reveladores específicos. Como reveladores (CCD) foram utilizados o Anisaldeído sulfúrico (identificação de terpenos e esteróides), Cloreto férrico (compostos fenólicos), Dragendorff (alcalóides) e Hidróxido de Potássio (cumarinas) (UGAZ, 1994). As cromatoplasmas foram vaporizadas com o revelador selecionado e, no caso do Anisaldeído sulfúrico, foram aquecidas à temperatura aproximada de 105°C.

Realizou-se *screening* farmacológico dos extratos semi-purificados de *Solidago chilensis* e *Tropaeolum majus*, posteriormente estes foram submetidos a

procedimentos cromatográficos, como Cromatografia em Coluna (CC), eluída com uma mistura de solventes previamente determinadas por CCD.

4.2.3.1 Colunas Cromatográficas das frações de *S. chilensis*

A fração de AE (1,48 g) de *S. chilensis* passou pelo processo de cromatografia em coluna (\varnothing 3 x 50 cm), tendo como fase estacionária a sílica gel (20 g) de granulometria 70-230 mesh (0,063- 0,20 mm), eluída com gradiente de clorofórmio (CHCl_3) e CHCl_3 :MeOH em polaridade crescente, aumentando 2% a polaridade a cada 100 mL. Coletou-se 40 frações de aproximadamente 20 mL cada e avaliadas por CCD utilizando CHCl_3 :MeOH como fase móvel, reveladas por UV (250 nm) e anisaldeído sulfúrico com aquecimento de 100 °C. As frações que exibiram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas.

Prosseguindo, 3,20g da fração de CHCl_3 , passou pelo processo de cromatografia em coluna (\varnothing 3 x 50 cm), tendo como fase estacionária a sílica gel (21 g) de granulometria 70-230 mesh (0,063 - 0,20 mm), eluída com gradiente de C_6H_{14} (hexano) e C_6H_{14} : $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (acetona) em polaridade crescente, aumentando 2% a polaridade a cada 100 mL. Foram coletadas 20 frações de aproximadamente 20 mL cada. As frações foram reunidas conforme perfil semelhante, através de CCD.

4.2.3.2 Coluna cromatográfica das frações de *T. majus*

A fração de AE (1,0 g) de *T. majus* passou pelo processo de cromatografia em coluna (\varnothing 3 x 50 cm), tendo como fase estacionária a sílica gel (40g) de granulometria 70-230 mesh (0,063- 0,20 mm), eluída com gradiente de clorofórmio (CHCl_3) e CHCl_3 :MeOH em polaridade crescente, aumentando 2% a polaridade a cada 100 mL. Coletou-se 25 frações de aproximadamente 20 mL cada e avaliadas por CCD utilizando CHCl_3 :MeOH como fase móvel, reveladas por UV (250 nm) e anisaldeído sulfúrico com aquecimento de 100 °C. As frações que exibiram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas.

4.4 Elucidações estruturais

No processo de elucidação estrutural foram empregados métodos espectroscópicos como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ^1H) e Carbono 13 (RMN- ^{13}C), Cromatografia de alta eficiência (CLAE) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). A realização desses processos foi conduzida pelo professor Valdir Cechinel Filho com o auxílio de Pedro Pablo Perez Netto-Curso Farmácia-UNIVALI.

Para análise de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram utilizados solventes deuterados (acetona, clorofórmio e metanol), provenientes da Cambridge Isotope Laboratories Inc.

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram realizados em espectrômetro BRUCKER AC-300F (300 MHz); tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Os deslocamentos químicos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm).

A avaliação dos espectros obtidos dos compostos puros foi acompanhada com o auxílio de tabelas que indicam deslocamentos químicos para hidrogênios e carbonos em comparação com trabalhos encontrados na literatura.

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-20AT (Japão) equipado com uma bomba quaternária e detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M20A, operando a 288 nm, e um injetor modelo SIL-20AHT com um loop de amostra injetada de 20 μl , em conjunto com uma coluna Luna C18 (Phenomenex, EUA) (150 mm x 4,6 mm ID), 3 μm de tamanho de partícula. A coluna foi condicionada a 40°C, utilizando um forno modelo CTO-10ASvp.

O seguinte gradiente de eluição foi usado: fase móvel A - água ultrapura (80%), a fase móvel B - MeOH foi mantido constante a 2% e a fase móvel C - acetonitrila (18%) (grau HPLC). A separação foi realizada por meio da utilização de um gradiente que iniciou com 18% e foi até 90% da fase C em 17 min, e, em seguida, isocrático durante 7 min. A fase móvel foi então retornada à sua composição inicial em 5 min permanecendo durante 6 min. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min.

4.5 Estudo farmacológico

Os testes de gastroproteção foram conduzidos por Thaise Boeing, Lincon Bordignon Somensi, Benhur Judah Cury, professores Luisa Mota da Silva, José Roberto Santin e sob supervisão do professor Sérgio Faloni de Andrade. Os testes referentes a nocicepção foram realizados pelo acadêmico Luiz Gustavo Rodrigues Dias Chagas e sob supervisão da professora Nara Lins Meira Quintão

A realização dos testes de atividade antiproliferativa *in vitro* foi através da Dra Adriana Campos no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPBA) na Universidade de Campinas (UNICAMP) através da Rede Iberoamericana de Investigação em Câncer (RIBECANCER/CYTED/CNPq), sob a supervisão do Professor Dr. João Ernesto de Carvalho.

4.5.1 Atividade gastroprotetora

4.5.1.1 Animais

Os animais foram mantidos seguindo as normas e cuidados com animais de laboratório, bem estar e biossegurança na experimentação, conforme descritas da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, e de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Os experimentos foram submetidos ao Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade do Vale do Itajaí, sendo aprovado sob o protocolo n° 03/2015. Para o modelo de úlcera induzido por etanol foram empregados camundongos fêmeas *Swiss*, pesando entre 25 a 35 g; já para os experimentos de úlcera gástrica induzida por indometacina e ligadura do piloro foram utilizados ratas fêmeas *Wistar* adultas pesando 180-200, todos oriundos do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, em sala com temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo controlados (claro/escuro 12 horas cada), tendo ração e água *ad libitum*. Nas doze horas anteriores aos experimentos, os animais foram mantidos em jejum e com livre acesso a água, sendo adicionada a caixa uma grade para inibir a coprofagia. Após os testes, os animais utilizados foram eutanasiados por deslocamento cervical (camundongos) ou câmara de CO_2 (ratos).

4.5.1.2 Estudo de resposta à dose e fixação de dosagem do composto isolado

Um estudo de resposta à dose inicial foi conduzido em animais tratados por via oral com 30, 100 ou 300 mg/kg de extrato *S. chilensis* para descobrir a dose efetiva. Os rendimentos dos compostos SC1 (0,46%) e SC2 (0,026%) foram utilizados para calcular a dose efetiva equivalente a 100 e 300 mg/kg, resultando nas valores de SC1 (0,56 e 1,68 mg/kg) e SC2 (0,026 e 0,078 mg/kg), respectivamente.

4.5.1.3 Lesões gástricas induzidas por etanol 60 %/HCl 0.03M.

Úlcera gástrica aguda induzida por etanol/HCl foi efetuada como descrito por Hara e Okabe (1985). Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de seis animais cada e pré-tratados com veículo (Vei: água mais 1% tween, 1 mL/kg, p.o.), carbenoxolona (CBX: 200 mg/kg, p.o.) ou extrato de *S. chilensis* (30, 100 ou 300 mg/kg, p.o.) 1 h antes da administração oral de uma solução de 60 %/HCl 0.03M. (etanol/HCl - 0,5 mL/200 g) para induzir a úlcera gástrica. Em outro conjunto de experiências, os ratos foram pré-tratados com veículo (Vei: água + 1% de tween, 1 ml/kg, p.o.), a carbenoxolona de controle positivo (CBX: 200 mg/kg, p.o.), composto SC1 (0,56 ou 1,68 mg/kg, p.o.) composto SC2 (0,026 ou 0,078 mg/kg, p.o.), 1 h antes da administração de etanol/HCl. Em ambas as experiências, os animais foram submetidos a eutanásia após 1 h de a administração do agente ulcerogênico, os estômagos foram removidos, abertos pela curvatura maior e a área das lesões (mm²) foi medida utilizando o software EARP®.

4.5.1.4. Lesões gástricas induzidas por indometacina

Úlcera gástrica aguda induzida por indometacina foi realizada como descrito anteriormente por Morimoto *et al.* (1981). Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos de seis animais cada e pré-tratados com veículo (Vei: água + 1% de tween, 1 mL/kg, p.o.), a carbenoxolona de controle positivo (CBX: 200 mg/kg, p.o.) ou EMB de *S. chilensis* (100 mg/kg, p.o.) 1 h antes da administração oral de indometacina (80 mg/kg, p.o.) para induzir a úlcera gástrica. Os ratos foram sacrificados 6 horas após administração de indometacina e estômagos foram

removidos para avaliação da área de lesão (mm²). As lesões foram quantificadas medindo a área total lesionada de cada estômago em mm².

4.5.1.5. Indução de hipersecreção por ligadura do piloro em ratos

A ligadura do piloro foi realizada em ratos em jejum, sob anestesia [cetamina (5 mg/kg, i.p.) e xilazina (5 mg/kg, i.p.)] como descrito por Shay *et al.* (1945). Resumidamente, o piloro foi localizado e a ligadura foi cuidadosamente feita para manter o conteúdo gástrico no estômago. Os animais foram tratados com veículo (Vei: água + 1% de tween, 1 ml/kg) ou extrato de *S. chilensis* (100 mg/kg) por via intraduodenal (i.d.) rota imediatamente após a ligadura. Considerando que o omeprazol (Ome: 20 mg/kg, p.o), controle positivo do teste, foi administrado 30 minutos antes da ligadura do piloro. Após 4 horas de ligação pilórica, os animais foram sacrificados, o estômago aberto e a secreção gástrica recolhida e centrifugada durante 5 min a 2000 rpm. O volume do sobrenadante foi medida usando um cilindro de medição e expressa como mL, o pH foi medido usando um medidor de pH e produção ácida total foi determinada por titulação com NaOH 0,01 N usando fenolftaleína como indicador e expressa como mEq [H⁺].

4.5.1.6 Estimativa da atividade de pepsina

A atividade da pepsina foi mensurada como descrito por Anson (1938). Resumidamente, 100 µL de suco gástrico de ratos submetidos a hipersecreção de ligação do piloro e tratados com veículo (Vei: água + 1% de tween, 1 mL/kg, i.d.), omeprazol (Ome: 20 mg/kg, p.o.) ou *S. chilensis* (300 mg/kg, i.d.) foi adicionado a 500 µl de albumina de bovino (0,5% w/v em 0,06 N de HCl) e incubadas durante 20 minutos a 37 °C. A hidrólise foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético a 10%. Após a desnaturação da proteína, o precipitado foi removido por centrifugação (4000 rpm durante 20 minutos). Posteriormente, 1 ml do sobrenadante foi misturado com 5 ml de solução de carbonato de sódio 0,5 M e 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. A absorbância foi medida a 660 nm, os valores individuais foram interpolados a uma curva padrão de tirosina (30-1000 mmol/mL) e os resultados foram expressos em termos de mM de tirosina/mL /4 h.

4.5.1.7 Determinação de muco na parede gástrica

Segmentos glandulares gástricos de ratos expostos a etanol/HCl ou a partir de ratos com hipersecreção induzida por ligadura do piloro foram recolhidos para medição de muco da parede gástrica como anteriormente descrito por Corne *et al.* (1974). Os tecidos gástricos foram pesados e corados durante 2 horas com 0,1% de solução de Alcian blue preparado em 50 mM de sacarose e 0,16 mM de acetato de sódio (pH 5), à temperatura ambiente. O corante em excesso foi removido por duas lavagens sucessivas com a solução de sacarose (0,25 mM). A solução de cloreto de magnésio (0,5 mM) foi usada para extração do complexo muco-corante. O extrato resultante azul foi, em seguida, misturado com igual volume de éter dietílico, centrifugado a 13000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido e a absorbância foi determinada a 598 nm. Quantidade de muco foi calculada por intermédio da curva padrão de Alcian blue (6,25-100 µg / ml) e os resultados foram expressos em µg de Alcian blue/g de tecido.

4.5.1.8 Preparação de frações subcelulares de estômagos

As amostras de tecido expostas a partir de estômagos de etanol/HCl foram homogeneizadas com tampão de fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5) e o homogenato foi usada para medir a glutathiona reduzida (GSH). Depois, o homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C e atividade da MPO foi determinada no precipitado.

4.5.1.9 Ensaio de proteínas

As concentrações de proteína foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante, pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando albumina de soro bovino (0,1-0,0125 ug/ml) como padrão.

4.5.2. Avaliação do mecanismo de ação gastroprotetor de *Solidago chilensis*

4.5.2.1. Atividade da MPO

Atividade de MPO gástrica foi medida de acordo com o descrito por Bradley *et al.* (1982) e modificado por De Young *et al.* (1989). Resumidamente, um precipitado preparado foi ressuspenso em tampão de fosfato de potássio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadecil-trimetil-amônio (HTAB) e novamente centrifugado a 12000 rpm durante 20 min a 4 ° C. Atividade de MPO no sobrenadante foi determinada a 620 nm em presença de H₂O₂ e 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e expressos em unidades de densidade óptica (MOD)/mg de proteína.

4.5.2.2 Estudo in vitro da atividade sequestradora de radicais livres (DPPH)

A capacidade de redução do radical DPPH foi determinado pela diminuição de absorbância induzida por anti-oxidantes, seguindo Blois (1958) e Chen *et al.* (2004), com algumas modificações. Diferentes concentrações de extrato *S. chilensis* (1, 10, 100 ou 1000 mg / mL) foram misturadas com uma solução metanólica de DPPH (10 mg/mL). O ácido ascórbico (50 mg/ml) foi utilizado como controle positivo e água destilada como controle negativo. Após 5 minutos, a absorbância foi medida a 517 nm.

4.5.2.3. Determinação de (GSH) de glutatona reduzida

Níveis de GSH em mucosa gástrica foram determinados pelo método de Sedlak e Lindsay (1968). Alíquotas de homogenato de tecido foram misturados com ácido tricloroacético a 12,5% e centrifugadas para 6000 rpm, 20 min a 4 ° C. A absorbância do sobrenadante e tampão TRIS (0,4M, pH 8,9) e 5,5'-ditiobis ácido 2-nitrobenzóico (DTNB, 0,01 M) foi medida a 415 nm. Os procedimentos foram realizados a 4 ° C e os valores individuais foram interpolados numa curva padrão de GSH (1,25-10 ug / mL) e expressa como mg/g de tecido.

4.6 Atividade antinociceptiva

4.6.1 Animais

Utilizou-se camundongos machos do tipo (Balb x C57BL/6) F1 híbrido (BaBL6F1), com peso corporal entre 25-30g, oriundos do biotério central da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração fornecidas *ad libitum*. Os animais permaneceram 5 dias no biotério da farmacologia no bloco F6, para ambientação. Os camundongos foram colocados na sala onde foram realizados os experimentos farmacológicos pelo menos 1h antes para período de adaptação.

A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética da UNIVALI (sob parecer de n. 03/2015) e os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais de cuidados internacionais aceitos para a experimentação animal e com as diretrizes éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Após os testes, os animais utilizados foram eutanasiados por deslocamento cervical ou câmara de CO₂.

4.6.2 Análise do limiar mecânico através de von Frey mecânico

Para a avaliação da nocicepção mecânica, os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente (9 x 7 x 11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevado para permitir o acesso a superfície ventral das patas traseiras. Os animais foram aclimatados com pelo menos 1 hora de antecedência, em temperatura controlada, para determinar o limiar mecânico basal. A frequência de resposta foi obtida por meio de 10 aplicações do monofilamento de von Frey 0,6 g. Após determinado esse parâmetro os animais foram pré-tratados com os extratos, compostos e veículo, posteriormente os animais receberam uma injeção intraplantar do agente flogístico em estudo, após a injeção foi avaliada a frequência de resposta de retirada da pata traseira dos animais dos grupos tratados e controle, em diferentes intervalos de tempo, através de monofilamento de von Frey 0,6 g.

4.6.3 Hiperálgia mecânica induzida pela carragenina

A indução da hiperálgia inflamatória em camundongos foi realizada através da injeção intraplantar de 50 µL de carragenina (300 µg/pata) na superfície plantar da pata direita traseira. De acordo com dados descritos na literatura, esta dose é capaz de produzir edema, hiperálgia e aumento significativo do tamanho da pata injetada, porém os animais continuam apresentando comportamento normal (QUINTAO *et al.*, 2005).

Inicialmente a medida basal de todos os camundongos foi avaliada antes do pré-tratamento. Após os animais foram pré-tratados com os EMB das folhas de *S. chilensis* e *T. majus* na dose de 100 mg/kg, para os grupos controle foi administrado veículo (10 mL/kg, v.o.). Todas as doses foram administradas 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina, sendo posteriormente avaliados quanto à hiperálgia mecânica, nos intervalos de 1, 3, 4, 6, 24 e 48 horas.

4.7 Atividade antiproliferativa

A triagem para atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliada em 4 linhagens de células neoplásicas humanas: U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células). Calculou-se valores de inibição de 50% do crescimento celular (GI₅₀) para avaliação da atividade antiproliferativa.

No primeiro dia de experimento, a suspensão celular foi preparada com meio RPMI (meio de cultura Roswell Park Memorial Institute) com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina (2mg/L) e ajustada em sua respectiva densidade de inoculação. Foram aplicados 100µl de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Preparou-se uma placa controle (placa T0), com todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

O extrato de *S. chilensis* e *T. majus* foi diluído em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas em pelo menos 400 vezes em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), o que evita a toxicidade

do DMSO. As amostras serão adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100µL/compartimento) em triplicata, e a seguir foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T0 foram fixadas com a adição de 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®) para determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal 0.

Após 48 horas de tratamento as células foram fixadas com a adição de 50 µL de TCA a 50% e incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários e a seguir serão mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, adicionou-se 50 µL/compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 % e a seguir incubaram-se as placas à temperatura ambiente por 30 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e após secagem completa à temperatura ambiente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

4.8 Expressão dos dados e análise estatística

Os dados foram representados como as médias ± erro padrão. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via e duas vias seguida do teste de Bonferroni. Adotou-se nível de significância para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad PRISM® (SOKAL; ROHLF, 1995).

5 RESULTADOS

5.1 Análise fitoquímica

Para a elaboração dos extratos foram utilizados 1670 g de folhas secas de *S. chilensis* e 470 g de folhas frescas de *T. majus*. Obteve-se como EMB das plantas 182 g (10,94%) e 23,5 g (5%), respectivamente, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento do extrato e das frações das plantas *S. chilensis* e *T. majus*.

Material vegetal	<i>S. chilensis</i>	<i>T. majus</i>
Massa (g)	1670	470
Extrato (g)	182	23,5
Rendimento (%)	10,94	5
Fração CHCl ₃ (g)	4,32	0,32
Rendimento (%)	2,37	1,36
Fração AE (g)	1,48	1,86
Rendimento (%)	0,81	7,91

5.1.1 Isolamento e identificação das substâncias presentes nas folhas de *S. chilensis*

Em relação ao fracionamento de *S. chilensis* (Figura 7), verificou-se que a subfração 11-33 (1,40 g) proveniente da CC da fração AE (Figura 7) apresentou um precipitado (620 mg). A quantidade de 1,40 g da subfração 11-33 foi cromatografada em CC, utilizando sílica gel (10 g), empacotada com 70:30% Hexano:Acetato de etila e eluída com os mesmos solventes em polaridade crescente, rendendo 29 subfrações, que foram reunidas de acordo com a semelhança analisada por CCD. A subfração 21-28 (234 mg) e o precipitado (620 mg), apresentaram-se como um pó de coloração amarela, foram submetidos a CCD com padrões autênticos do laboratório e através de uma análise realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como pode ser observado na Figura 8, posteriormente foi confirmado o composto SC1 como quercitrina (1).

Figura 7. Fluxograma explicativo do fracionamento das folhas de *S. chilensis*.

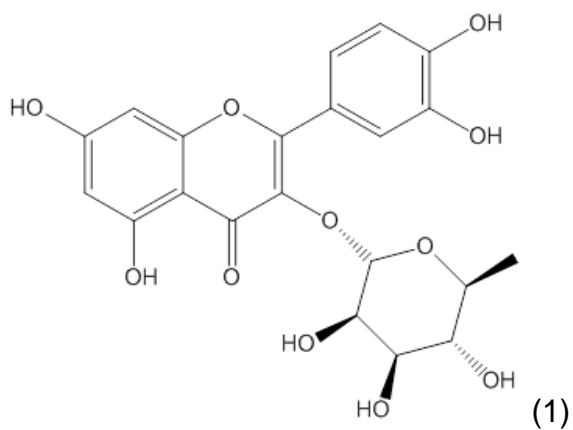
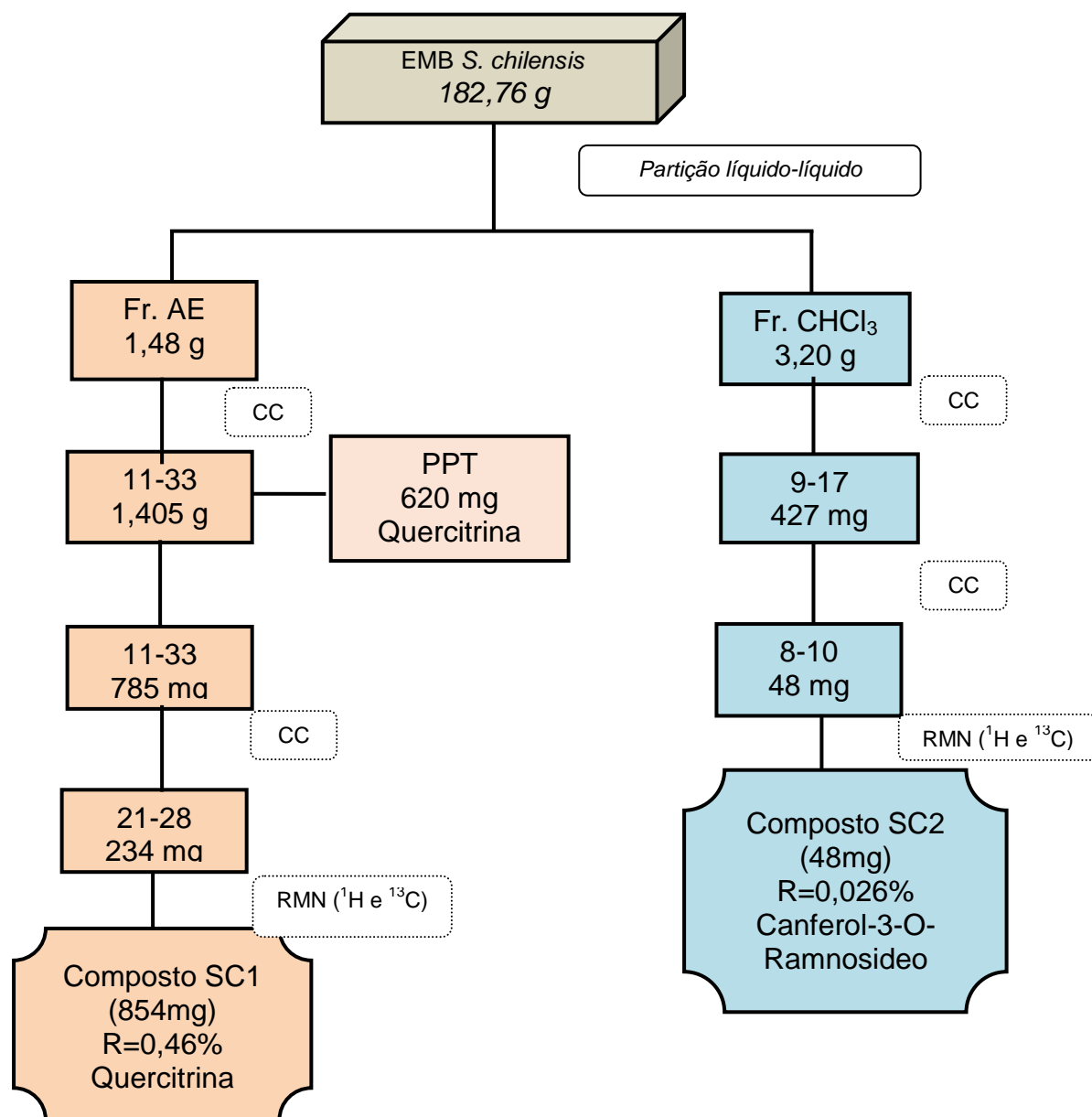
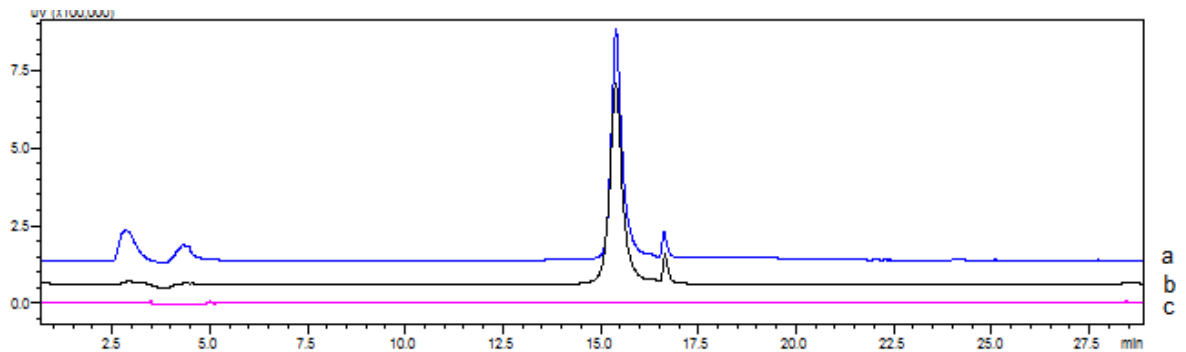
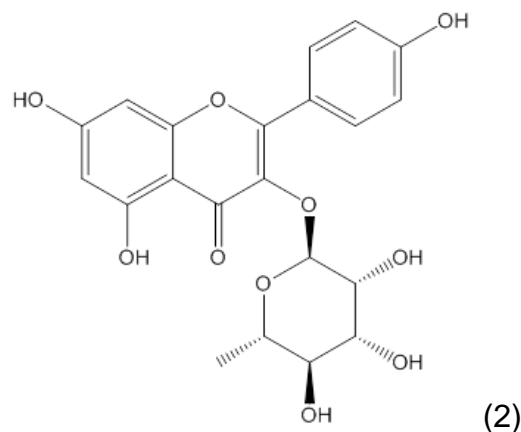


Figura 8. Cromatograma de CLAE: (a) extrato metanólico de *S. chilensis*, (b) quercitrina e (c) branco metanol



A subfração 9-17 (427 mg) (Figura 7) proveniente da CC da fração CHCl_3 , foi recromatografada utilizando-se um sistema de solvente hexano:acetato de etila rendendo 43 subfrações, estas foram reunidas de acordo com a semelhança observada por CCD. A subfração 8-10 (48 mg) eluída com CHCl_3 :Metanol 80:20 apresentou-se como um cristal amarelo. Após realização de CCD com padrões autênticos do laboratório e análise dos dados de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (Figura 9 e 10) confirmou-se o composto SC2 como canferol-3-O- α -L-ramnosídeo, conhecido como afzelina (2).



5.1.1.1 Identificação do composto Afzelina

O espectro de RMN- ^1H (Figura 9) do composto mostrou dois sinais de hidrogênio aromáticos característico de acoplamento meta em δ 6,35 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) e 6,18 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), atribuídos aos hidrogênios C-6 e C-8 do anel A do esqueleto flavona. Por conseguinte, foi sugerido ter um grupo hidroxila em C-5 e C-

7. Além disso, o seu espectro de RMN-¹H mostrou dois sinais com "acoplamento orto 'em δ 6,92 (2H, d, J = 6,7 Hz) e 7,74 (2H, d, J = 6,7 Hz), cujos sinais foram atribuídos aos hidrogénios em C-2', C-3', C-5' e C-6' do anel B. A ausência de um sinal específico para um hidrogênio olefínico em C-3 e a presença de um sinal característico de hidrogênio anomérico em δ 5,37 (1H, d, J = 7,2 Hz) sugeriu que o composto era um flavonoide glicosilado. O aparecimento do sinal referente ao carbono anomérico δ 94,9 no espectro de RMN-¹³C fortaleceu a hipótese da presença de uma porção açúcar. O sinal observado δ 0,93 (3H, s) no espectro de RMN-¹H e na δ 17,7 no espectro de RMN-¹³C indica que a porção de açúcar é ramnose. Com base nos dados apresentados, em comparação com a literatura, o composto foi identificado como o canferol-3-O- α - L-ramnosídeo (2) (MOK; LEE, 2013).

Figura 9. Espectro de RMN-¹H (CD₃OD 300MHz) do composto afzelina

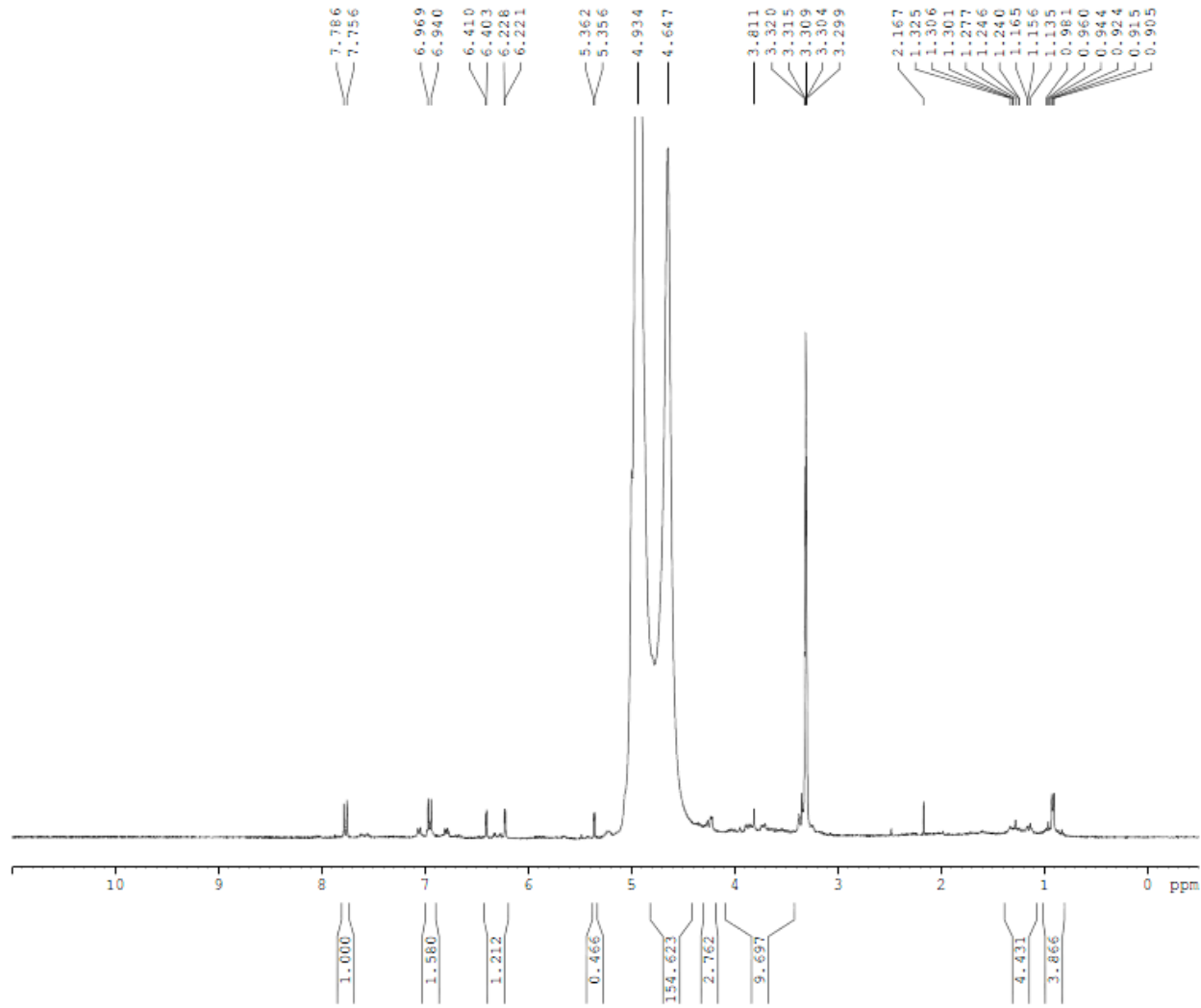


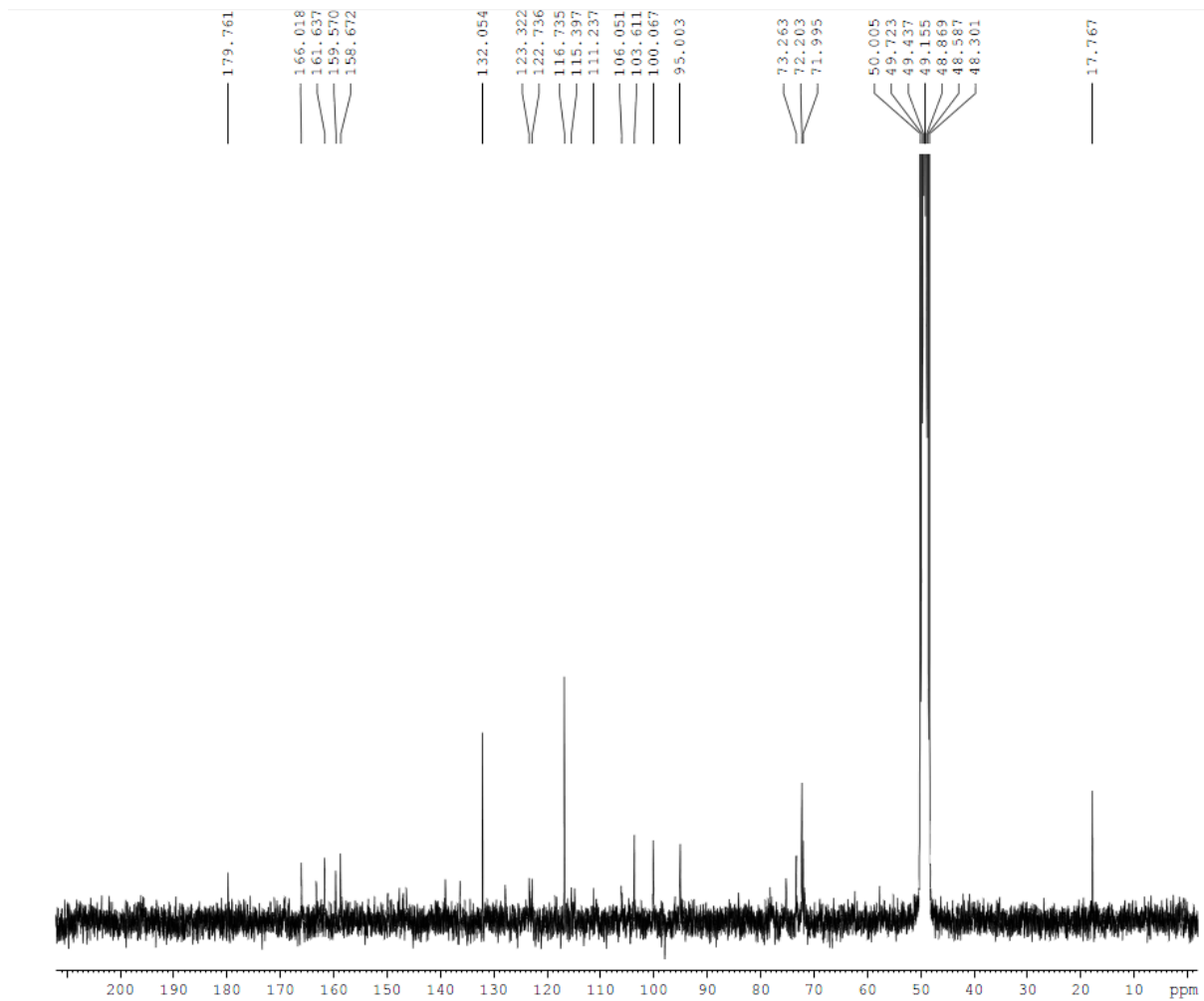
Figura 10. Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD 75MHz) do composto afzelina.

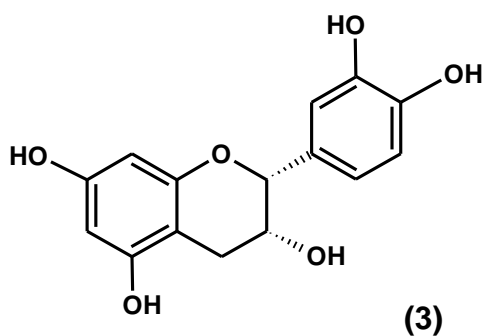
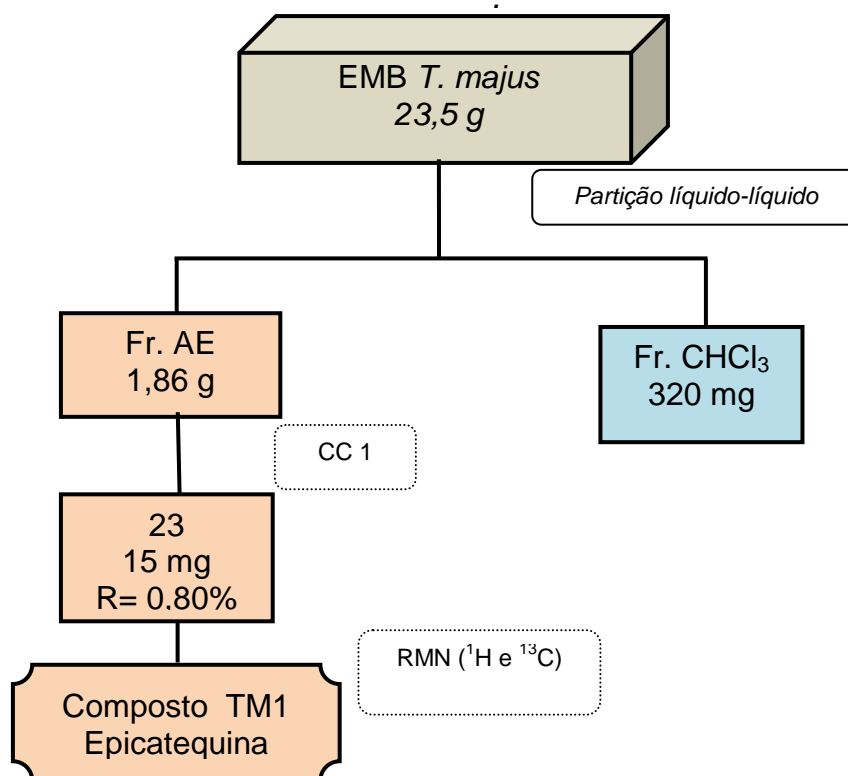
Tabela 2. Dados de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto afzelina em comparação com dados da literatura*.

	Afzelina		*MOK; LEE, 2013	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
C-2	158,6		156,5	
C-3	132,0		134,2	
C-4	179,7		177,7	
C-5	161,6		161,3	
C-6	100,0	6,22	98,7	6,22
C-7	166,0		164,2	
C-8	95,0	6,41	93,7	6,42
C-9	159,5		157,2	
C-10	103,6		104,1	
C-1´	122,7		120,5	
C-2´	132,0	7,75	130,6	7,76
C-3´	115,3	6,94	115,3	6,91
C-4´	159,5		160,0	
C-5´	115,3	6,94	115,3	6,91
C-6´	132,0	7,75	130,6	7,76
C-1´´	100,0	5,35	101,8	5,30
C-2´´	71,9	4,64	70,3	4,63
C-3´´	72,2	3,81	70,5	3,98
C-4´´	73,2	3,29	71,1	3,08
C-5´´	71,9	3,29	70,1	3,08
C-6´´	17,7	0,90	17,4	0,80

5.1.2 Isolamento e identificação das substâncias presentes na folha de *T. majus*.

A partir do EMB de *T. majus*, a fração AE (1,86 g) foi cromatografada em CC, utilizando sílica gel (76,90 g), empacotada com 80:20% CHCl₃:metanol com os mesmos solventes em polaridade crescente, rendendo 25 subfrações (Figura 11), que foram reunidas de acordo com a semelhança analisada por CCD. A subfração 23, eluída 80:20% em CHCl₃:metanol, denominado composto TM1 foi identificada como epicatequina (3).

Figura 11. Fluxograma resumido do fracionamento fitoquímico das folhas de *T. majus*



5.2 Atividade biológica

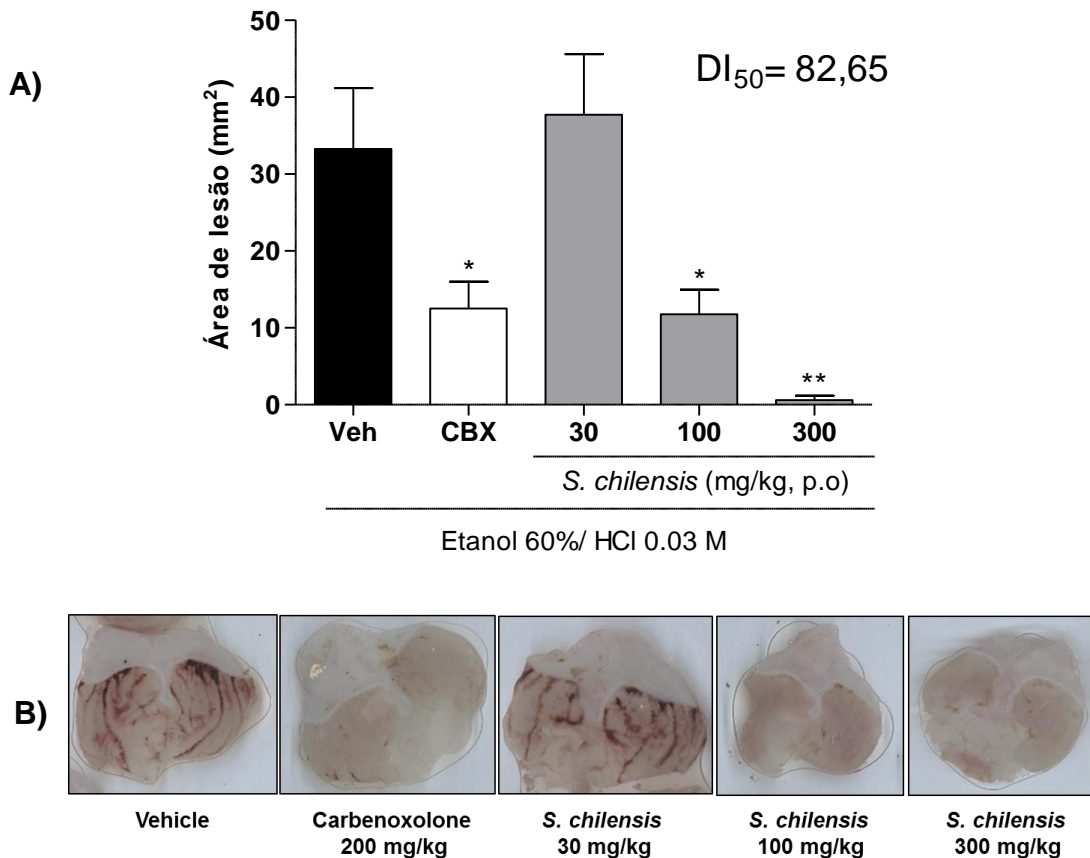
5.2.1 Atividade gastroprotetora

5.2.1.1 Modelo de úlcera induzida por etanol 60%/HCl 0.03M.

O EMB das folhas de *S. chilensis* apresentou atividade gastroprotetora, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol/HCl em camundongos (Figura 12), reduzindo as lesões gástricas em até 64,55% e 98,22% nas doses de 100 e 300

mg/kg, quando comparado ao veículo (Veh: $33,26 \pm 7,94 \text{ mm}^2$). Contudo, na dose de 30 mg/kg o extrato não reduziu a área da lesão. Diante desses resultados foi possível encontrar um valor de DI_{50} do extrato de: 82,65 mg/kg. A carbenoxolona (200 mg/kg), utilizada como controle positivo para os ensaios de gastroproteção, também foi capaz de reduzir as lesões gástricas induzidas por etanol/ácido em 62,38%, quando comparado ao veículo.

Figura 12. Efeitos da administração oral de carbenoxolona (200mg/kg) e diferentes doses (30, 100 e 300mg/kg) do EMB das folhas de *S. chilensis* em camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol 60 %/HCl 0.03M.

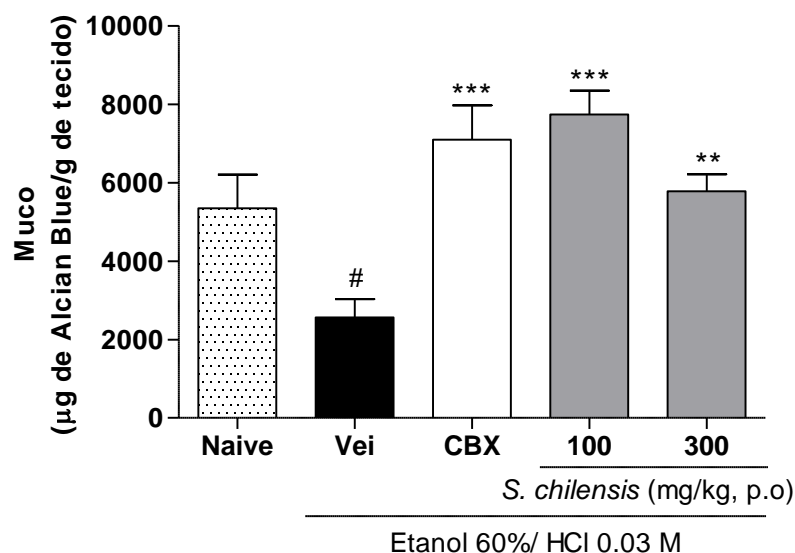


Resultados apresentados como média \pm Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo ulcerado tratado com veículo (controle negativo). (A) Área da lesão (mm²) e (B) Imagens representativas do tecido gástrico

5.2.1.2 Efeito do extrato de *S. chilensis* sobre os níveis de muco aderido na mucosa após lesão induzida por etanol/HCl.

Visto a importância do muco para homeostasia gastrointestinal, resultados expressivos foram identificados para quantificação do muco produzido no modelo de úlcera induzida por etanol, como se observa na Figura 13. A administração de etanol/HCl foi capaz de reduzir em 52,09% os níveis muco aderido, quando comparado ao grupo Naive ($5342 \pm 863,7$ μg de Alcian Blue/mg de tecido). O tratamento com as doses de 100 e 300 mg/kg do EMB das folhas de *S. chilensis* preveniu a depleção do muco, restabelecendo-o a níveis basais, equiparando-se ao grupo Naive.

Figura 13. Quantificação de muco após administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) e diferentes doses do extrato metanólico das folhas de *S. chilensis* (100 e 300 mg/kg) em estômagos de camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol 60 %/HCl 0.03M.

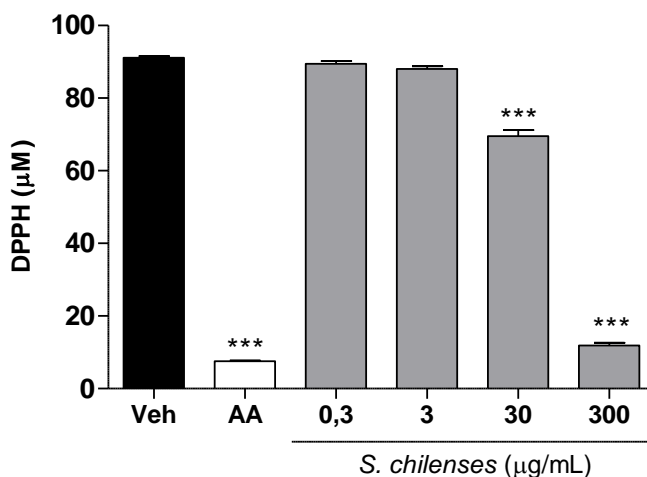


Resultados apresentados como média \pm Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$, quando comparado com o grupo não ulcerado (Naive); ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle negativo (veículo).

5.2.1.3 Efeito do extrato de *S. chilensis* na atividade sequestradora de radicais livres (DPPH)

A capacidade antioxidante do extrato foi observada através do ensaio da redução da atividade do radical DPPH. O extrato (30 e 300 µg/ml) foi capaz de reduzir em 23,30 e 86,92%, respectivamente, a atividade do DPPH quando comparado com o veículo (91,11 ± 0,40). O controle positivo para este parâmetro foi o ácido ascórbico (AA), que foi capaz de reduzir os níveis de DPPH em 67,2%.

Figura 14. Quantificação de DPPH (µM de DPPH) após incubação do extrato nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 µg/mL do extrato metanólico das folhas de *S. chilensis*.



Resultados apresentados como média ± Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. ***p<0,001, quando comparado ao grupo controle negativo (veículo).

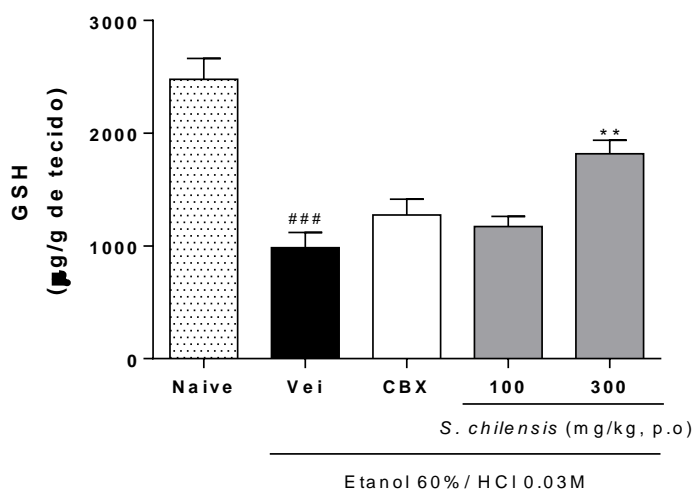
5.2.1.4 Efeito o extrato de *S. chilensis* sobre os níveis de GSH após lesão gástrica induzida por etanol/HCl.

A exposição da mucosa gástrica ao etanol absoluto depletou os níveis de GSH da mucosa gástrica em 59,77% comparado ao grupo Naive (2447 ± 186,3 µg de GSH/g de tecido).

Desta forma, também foi verificada a atividade antioxidante do extrato. O extrato de *S. chilensis* (300 mg / kg) promoveu um aumento nos níveis de GSH na

dose de 300 mg/kg em 84,82% (Figura 15) quando comparado com animais ulcerados tratados com veículo (Vei: $984 \pm 134,3 \text{ mm}^2$).

Figura 15. Quantificação de GSH ($\mu\text{g/g}$ de tecido) após administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) e diferentes doses do extrato metanólico das folhas de *S. chilensis* (100 e 300 mg/kg) em estômagos de camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol.

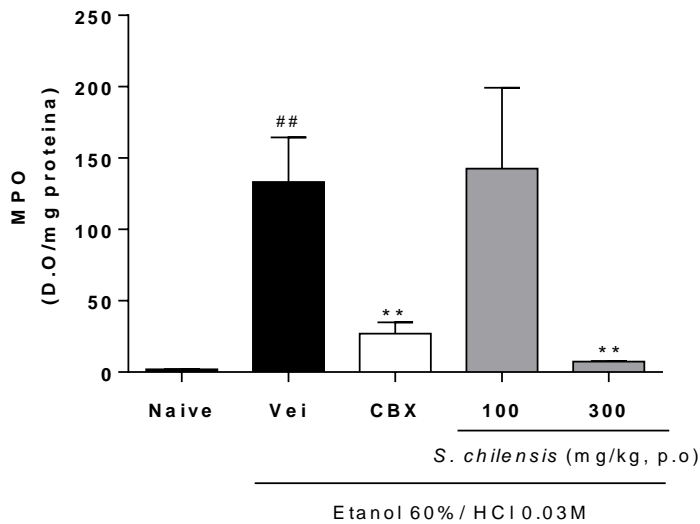


Resultados apresentados como média \pm Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não ulcerado (Naive). ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle negativo (veículo).

5.2.1.5 Efeito do extrato de *S. chilensis* sobre os níveis de MPO após indução de lesão por etanol/HCl

Nos resultados obtidos verificou-se que os níveis da atividade de MPO no tecido gástrico ulcerado de animais pré-tratados com veículo foram intensamente aumentados para $133,3 \pm 31,31 \text{ mD.O/ mg}$ de proteína, enquanto que os níveis basais dessa atividade foram de $(2,0 \pm 0,20)$. Todavia, o extrato de *S. chilensis* (300 mg/kg) e a carbenoxolona (200 mg/kg) diminuiriam esse aumento em 95,95% e 81,02%, respectivamente. Curiosamente, a dose de 100 mg/kg não reduziu a atividade de MPO corroborando com o veículo.

Figura 16. Quantificação de MPO (D.O./mg proteína) após administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) e do extrato metanólico (300 mg/kg) de *S. chilensis* em estômagos de camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol 60 %/HCl 0.03M



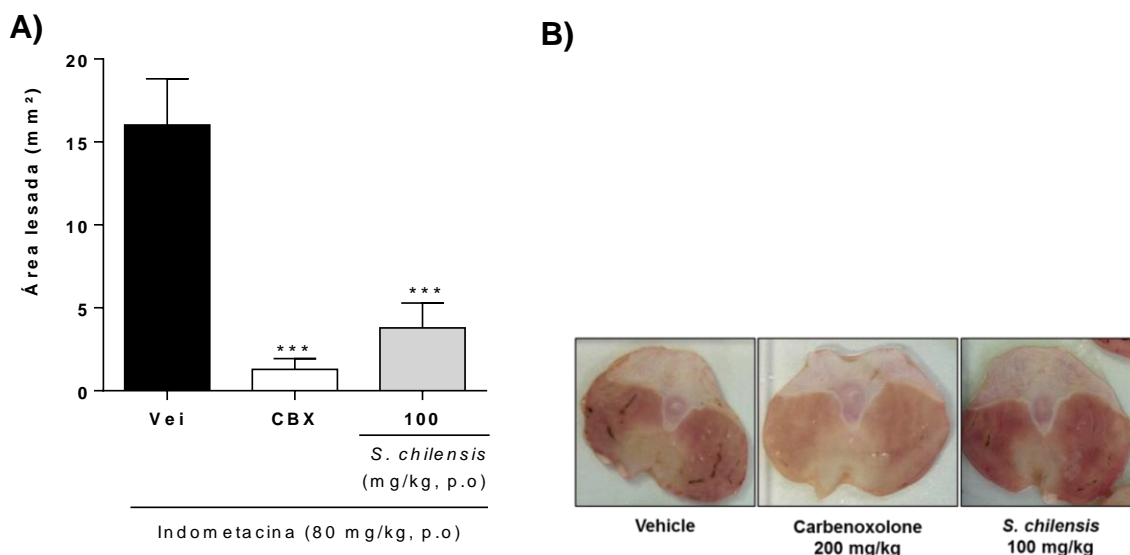
Resultados apresentados como média \pm Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não ulcerado (Naive); ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle negativo (veículo).

5.2.1.6 Modelo de indução de úlcera induzida por indometacina

Diante dos dados obtidos com o modelo de úlcera aguda induzida por etanol/HCl, foi avaliada atividade gastroprotetora do EMB das folhas de *S. chilensis* também no modelo de úlcera aguda induzida por indometacina.

Neste ensaio foi testado o EMB de *S. chilensis* somente na dose de 100 mg/kg, considerando que foi a menor dose efetiva no ensaio de gastroproteção contra o etanol/HCl. Uma redução de 76,40% da área lesionada em comparação com o grupo ulcerado veículo (Vei: $16,02 \pm 2,79$ mg/kg) foi observada. Da mesma forma, o grupo carbenoxolona também reduziu a área de lesão, com 92% de diminuição.

Figura 17. Efeitos da administração oral de carbenoxolona (200 mg/kg) e 100 mg/kg do EMB das folhas de *S. chilensis* em ratos submetidos ao modelo de úlcera induzida por indometacina.



Resultados apresentados como média \pm Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). (A) Área da lesão (mm²) e (B) Imagens representativas do tecido gástrico

5.2.1.6 Efeito do extrato de *S. chilensis* na secreção ácida gástrica

Foram avaliados os parâmetros de volume, pH, acidez, atividade péptica e muco aderido, usando o modelo de ligadura-piloro. Nos animais tratados com extrato de *S. chilensis* (100 mg/kg), houve diminuição do volume (45,56%) e acidez em (72,13%) quando comparados ao veículo (Vei: 7,90 \pm 1,25; Vei 0,0061 \pm 0,006) respectivamente; e aumento de 63,63% do pH, quando comparado ao veículo (Vei: 1,60 \pm 0,15).

Em relação ao muco aderido, o EMB da folha de *S. chilenses* (100 mg/kg) promoveu aumento de 72% em comparação ao grupo ulcerado veículo (Vei: 679,5 \pm 4,80).

Tabela 3. Efeito do extrato de *S. chilensis* em parâmetros de secreção ácida gástrica e na aderência de muco, após ligadura do piloro.

	Volume (mL)	pH	Acidez [H ⁺]	Atividade péptica	Muco aderido
Veículo (1 mg/mL, i.d)	7.90 ± 1.25	1.60 ± 0.15	0.061 ± 0.006	1.74 ± 0.14	679.5 ± 4.80
Omeprazol (20 mg/kg, v.o)	2.88 ± 0.26**	6.69 ± 0.19*	0.007 ± 0.003*	0.65 ± 0.07*	1363.0 ± 144.80*
<i>S. chilensis</i> (100 mg/kg, i.d)	4.30 ± 0.41*	4.40 ± 0.23*	0.017 ± 0.003*	1.66 ± 0.19	1171.0 ± 59.71*

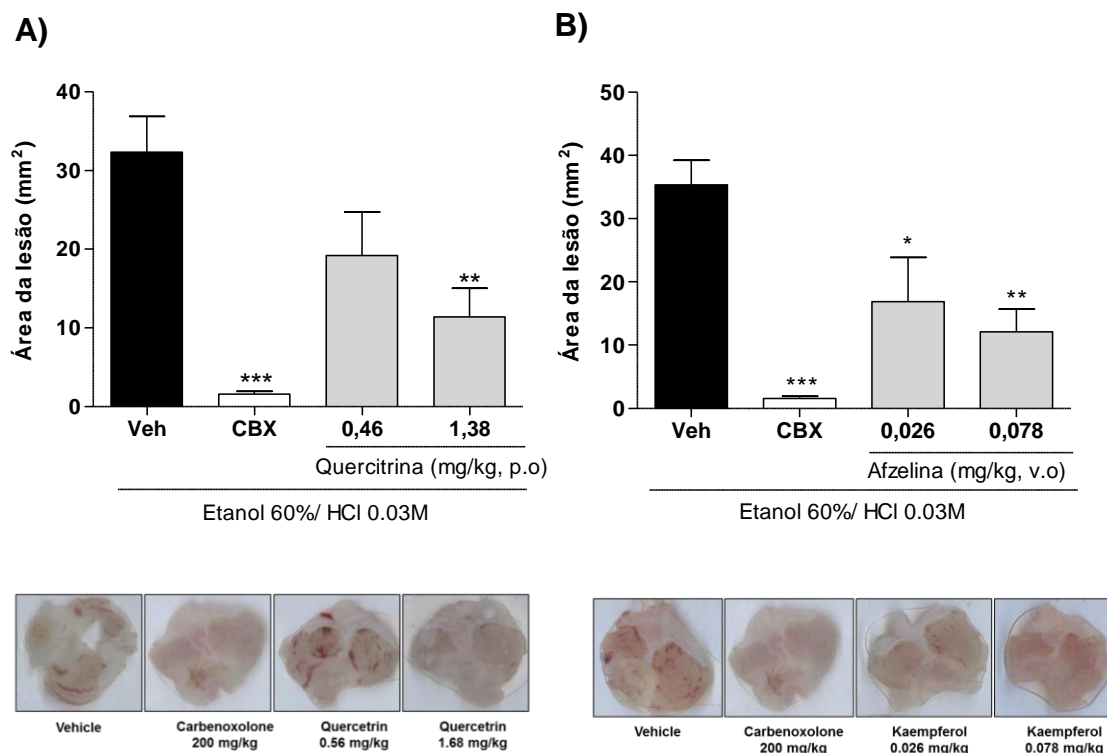
Resultados apresentados como média ± Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. *p<0,001, quando comparado ao grupo controle negativo (veículo).

5.2.1.7 Modelo de indução de úlcera em etanol avaliando os compostos isolados de *S. chilensis*

O composto isolado quercitrina apresentou atividade gastroprotetora no modelo de lesão gástrica induzida por etanol/HCl, com 94,80% de redução de lesão para dose de 1,68 mg/kg, em comparação com o grupo ulcerado veículo (Vei: 32,32 ± 4,57 mg/kg).

Assi, foi também evidenciadoa diminuição de 52,16% e 65,75% da área de lesão no modelo de lesão gástrica induzida por etanol/HCl para o composto afzelina nas doses de 0,026 e 0,078 mg/kg respectivamente quando comparados ao veiculo (Vei: 35,33 ± 3,50 mg/kg).

Figura 18. Efeitos da administração oral de carbenoxolona (100mg/kg), quercitrina (0,56 e 1,68 mg/kg) e afzelina (0,026 e 0,078 mg/kg) isolados do extrato metanólico das folhas de *S. chilensis* em camundongos submetidos ao modelo de úlcera induzida por etanol/HCl.



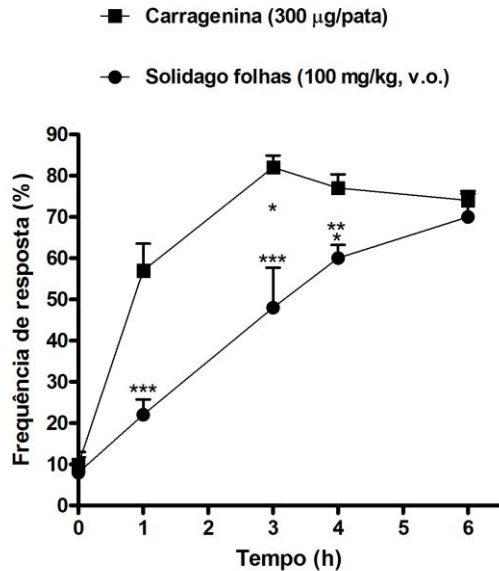
Resultados apresentados como média \pm Erro Padrão da média (EPM), com um grupo de seis animais. Comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). (A) Área da lesão (mm²) e imagens representativas do tecido gástrico de animais tratados com quercitrina (B) Área da lesão (mm²) e imagens representativas do tecido gástrico de animais tratados com afzelina.

5.2.3 Atividade antinociceptiva

A partir da figura 19, pode-se observar que o EMB das folhas de *S. chilensis* apresentou efeito anti-hiperalgésico significativo.

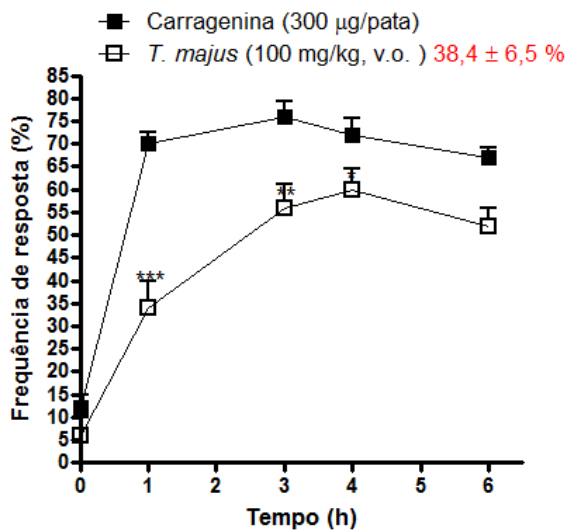
A carragenina produziu uma reação edematogênica aguda e progressiva nas patas dos animais tratados com *S. chilensis*, atingindo o pico em 4 horas. Após 1 hora de sua administração, o extrato da planta já produziu inibição significativa em relação ao controle.

Figura 19. Frequência de resposta de retirada da pata traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com EMB das folhas de *S. chilensis* (100 mg/kg) em diferentes intervalos de tempo após a injeção i.pl. de carragenina 300 µg/pata.



Os dados são expressos com a média \pm E.P.M. de 6 animais em cada grupo. Os asteriscos indicam uma redução significativa do limiar de retirada da pata, sendo $***p < 0,001$ (teste ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni (A)).

Figura 20. Frequência de resposta de retirada da pata traseira, avaliada no grupo controle e em animais tratados com EMB das folhas de *T. majus* (100 mg/kg) em diferentes intervalos de tempo após a injeção i.pl. de carragenina 300 µg/pata.



Os dados são expressos com a média \pm E.P.M. de 6 animais em cada grupo. Teste ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni (A).

5.2.4 Atividade antiproliferativa

Realizou-se análise *in vitro* para avaliar atividade antiproliferativa dos EMB das folhas de *S. chilensis* e *T. majus*. No total foram utilizadas 4 linhagens de células tumorais humanas: U251 (glioma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células). Valores GI_{50} foram calculados para avaliação desta atividade. Todavia, os dois extratos metanólicos não apresentaram atividade antiproliferativa para todas as linhagens avaliadas em comparação com o grupo controle doxorrubicina, visto que os extratos só apresentam atividade com valores menores que 30 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4. Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)a do controle (Doxorrubicina) e dos extratos metanólicos de *S. chilensis* e *T. majus*.

Planta	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	U251	MCF7	786-0	NCI-H460
Doxorrubicina	0,025	< 0,025	< 0,025	< 0,025
EMB <i>S. chilensis</i>	90,6	30,7	250	250
EMB <i>T. majus</i>	>250	>250	>250	>250

Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF7 (mama); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células). a GI_{50} : Growth Inhibition 50 – concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular. Doses testadas: 0,25 - 250 $\mu\text{g/mL}$.

6 DISCUSSÃO

O estudo objetivou avaliar duas plantas presentes na região Sul, com uso empírico consolidado, porém com pouco respaldo científico, por isso a escolha de *S. chilenses* e *T. majus*. Foi possível avaliar fitoquimicamente e farmacologicamente com mais afinco a *S. chilenses*, devido o desenvolvimento mais completo de seus resultados.

Constatou-se que os resultados referentes ao rendimento das frações CHCl_3 e AE para as duas plantas indicam preponderância da presença de compostos polares.

Os solventes utilizados com maior frequência para extração de compostos fenólicos são metanol, etanol, acetona e acetato de etila, assim como misturas destes solventes com água (SANTOS-BUELGA, 2012).

Em relação ao isolamento dos compostos, mais precisamente de quercitrina em *S. chilensis*, foi descrito que o primeiro relato do isolamento deste composto em *Solidago microglossa* DC. foi realizada por Torres *et al.* em 1987. Corroborando, Roman Junior (2013), isolou quercitrina como precipitado na fração acetato e em outras duas subfrações obtidas por fracionamentos em colunas cromatográficas, identificando a substância como majoritária nas partes aéreas de *S. chilensis*.

A quercitrina apresenta-se como peso molecular de 448,38 g/mol, coeficiente de partição de 0,216 e logP (octanol/água) de - 0,540. É praticamente insolúvel em água fria, moderadamente solúvel em água quente e solúvel em etanol. Seus comprimentos de onda máximos, quando em etanol, são em 258 e 350 nm (THE PUBCHEM PROJECT, 2011).

Em contraste com os resultados deste estudo, foi constatado o isolamento do composto quercitrina através da fração AE em partes aéreas de *Solidago microglossa*, obtendo-se 230 mg da substância (1,98% rendimento), na forma de cristais amarelos esverdeados (SMOLAREK, 2011).

Ressalta-se que o presente estudo não identificou o composto solidagenona no extrato de *S. chilensis*, importante diterpeno que apresenta atividade gastroprotetora confirmada (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2002), e já isolado na mesma planta por outros pesquisadores (TORRES; ROQUE; AKISUE, 1989; VALVERDE-SOARES; AZEVEDO-SILVA; TOMASSINI, 2009). Uma das possíveis

explicações da ausência do composto é que o mesmo apresenta-se com mais frequência na raiz de *S. chilensis* e neste estudo foi utilizado apenas a folha da planta. Ainda, pode estar havendo a interferência de fatores ambientais na produção desta substância, como sazonalidade, índice pluviométrico, radiação UV, composição atmosférica, altitude, herbivoria e/ou ataque de patógenos, temperatura, idade da planta e fornecimento de água e nutrientes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Portanto, identifica-se a necessidade da realização de outros estudos, principalmente no âmbito da sazonalidade, para confirmar tal hipótese.

Por outro lado, destaca-se a presença do composto afzelina, substância rara e ainda não descrita para *S. chilensis*. A substância apresenta peso molecular de 432,38 g/mol, coeficiente de partição de 0,811 e logP (octanol/água) de - 0,146. Não é solúvel em água (THE PUBCHEM PROJECT, 2011).

Tanto a afzelina, quanto a quercitrina apresentaram efeito protetor para células renais. Os autores propuseram que a atividade dos flavonóides é amplamente influenciada pelo número e posição dos grupamentos de hidroxilas fenólicas ligadas à estrutura básica (YOKOZAWA *et al.*, 1999).

A literatura descreve que a afzelina quando avaliada em atividade antioxidante (KIM *et al.*, 2008), antiinflamatória e anti-sistema complemento (MIN *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005), inibidora de enzimas como HMG-CoA redutase e conversora de angiotensina-I (KWON *et al.*, 2010), tirosinase (RHO *et al.*, 2010), ciclooxigenase-2 (KIM *et al.*, 2008) e mieloperoxidase (REGASINI *et al.*, 2008) e de substâncias como óxido nítrico (KIM *et al.*, 2008) nem sempre apresentou efeitos satisfatórios. Porém, a quercitrina, quando estudada concomitantemente nesses trabalhos, apresentou atividade relevante.

Em relação a *T. majus* foi possível identificar a epicatequina. Esse é um composto bastante conhecido e identificado por vários autores (FOO *et al.*, 1996; HASHIMOTO *et al.*, 1987; RIZVI; ZAID, 2001), porém é a primeira vez que ela é reportada em *T. majus*. A substância já foi isolada em outras plantas pelo grupo do NIQFAR e a identificação foi realizada por comparação direta com uma amostra autêntica.

A identificação química de *T. majus* foi preliminar devido alguns contratempos no decorrer do estudo, como escassez de tempo e material. Desta forma, verifica-se que não foi possível realizar o fracionamento fitoquímico da fração CHCl₃.

Foram realizados experimentos no âmbito da gastroproteção apenas com o extrato e compostos de *S. chilensis* devido a atividade gastroprotetora já confirmada para o extrato metanólico da planta (BUCCIARELLI *et al.*, 2007; BUCCIARELLI *et al.*, 2010) porém com ausência de estudos relacionados a ação gastroprotetora dos compostos isolados no presente estudo (quercetrina e afzelina). Não foi possível avaliar a ação gastroprotetora de *T. majus* devido a escassez de matéria-prima, breve avaliação fitoquímica da planta e disponibilidade de tempo

A mucosa gástrica é continuamente exposta a agentes que estão envolvidos na patogênese da úlcera gástrica. Esses agentes danosos podem ser endógenos (ácido clorídrico, pepsina) ou exógenos (consumo de álcool, hábitos alimentares, administração de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) por período prolongado, infecção por *Helicobacter pylori*). A fisiopatologia básica da úlcera gástrica resulta no desequilíbrio entre fatores danosos e fatores citoprotetores, os quais incluem a barreira de muco bicarbonato na mucosa, prostaglandinas, fluxo sanguíneo adequado da mucosa, sistema antioxidante gástrico e outros mediadores (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; ARAÚJO; BORINI; GUIMARÃES, 2014).

O etanol é um dos agentes exógenos mais irritantes para a mucosa, ele penetra rapidamente e facilmente na mucosa gástrica, causando dano à membrana, esfoliação e erosão nas células (SIDAHMED *et al.*, 2013). A lesão por etanol atinge principalmente a porção glandular do estômago (SIDAHMED *et al.*, 2013) e pode ser atribuída há alguns mecanismos como a indução de úlcera pela formação de radicais livres derivados do oxigênio (ROS) (KWIECIEN *et al.*, 2002; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2001); decréscimo nas concentrações dos grupamentos sulfidrílicos no conteúdo da mucosa gástrica; ruptura do muco endógeno e a secreção de ácido gástrico, bem como danos na mucosa gástrica com lesões hemorrágicas (RAJASEKARAN, 2012); apoptose celular; indução de peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de glutathione reduzida (DAS *et al.*, 2012). O etanol também induz lesão no endotélio vascular da mucosa, causando alterações na microcirculação e gerando isquemia, que tem como resultado a produção de radicais livres (PÉRICO, 2014).

Desta forma, verificou-se a atuação do extrato da folha de *S. chilensis* na diminuição da área de lesão gástrica no modelo de úlcera induzida por etanol/HCl. Ainda, para confirmar tal efeito, o teste realizado com a dose efetiva de 100 mg/kg

evidenciou mais uma vez o efeito do extrato na diminuição da lesão gástrica, desta vez ocasionada por indometacina, um AINE conhecido.

A Indometacina é um AINE descrito como um derivado indólico com atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética utilizado em diversas condições inflamatórias crônicas, em virtude da sua concreta supressão da dor, febre e edema (SÜLEYMAN *et al.*, 2010). Os estudos indicam que os AINES induzem a formação de lesões gástricas por pelo menos dois mecanismos. O primeiro é o bem caracterizado bloqueio das enzimas COX, inibindo a produção endógena de PGs. O segundo mecanismo é chamado captura de íons e resulta da dissociação ácida dos AINES (pKa – 3,5 a 4,0) no ambiente intracelular neutro (pH – 7,00) das células mucosas (GLAVIN & SZABO, 1992; FIORUCCI *et al.*, 2001).

O dano gástrico induzido por indometacina (inibidor inespecífico COX). e outros AINES também está relacionado à produção de EROs e peroxidação lipídica. O acúmulo de hidroperóxidos lipídicos cresce concomitantemente ao desenvolvimento das lesões (YOSHIKAWA *et al.*, 1993).

Bucciarelli *et al.* (2010) investigou a toxicidade aguda e o efeito gastroprotetor do extrato aquoso de inflorescências de *S. chilensis*. A atividade gastroprotetora foi avaliada *in vivo* submetidos ao modelo de indução de úlcera gástrica por etanol em doses de 125, 250, 400, 800, 1200 e 2000 mg/kg. O estudo de toxicidade aguda foi interpretado em doses menores de 2000 mg/kg. Os resultados demonstraram que o extrato impediu a formação de lesões gástricas, exibindo atividade antiúlcera quando administrado nas dose entre 125-2000 mg/kg (P <0,05), e não revelou toxicidade aguda em ratos tratados com 2000 mg/kg.

O muco é constituído por glicoproteínas de elevado peso molecular com um esqueleto de proteínas e cadeias laterais de oligossacarídeos ligadas a resíduos de serina ou treonina por ligações O-glicosídicas. É produzido por várias células epiteliais especializadas, especialmente células caliciformes. Ele desempenha um papel protetor importante através da formação de uma barreira física, química e imunológica entre o lúmen e a superfície epitelial, essa barreira é descrita como a primeira linha de defesa da mucosa gástrica (LAINE *et al.*, 2008; NIV & BOLTIN, 2012). A barreira mucobicarbonato secretada pelo epitélio atua como um bloqueio contra a autodigestão provocada pelo ácido e pepsina (ALLEN & FLEMSTROM, 2005). Assim, qualquer perturbação quantitativa ou qualitativa dessa secreção pode ser nociva (PHILLIPSON *et al.*, 2008).

Diante da importância do muco para a homeostasia gastrointestinal, o extrato de *S. chilensis* nas duas doses testadas (100 e 300 mg/kg) demonstrou ser eficaz e preveniu a depleção do muco. Ainda em relação ao muco, considera-se outra ação positiva do extrato da planta no modelo de ligadura de piloro, no qual houve proteção da mucosa e aumento da produção do muco. Esses resultados implicam sugerir que o mecanismo de ação protetor do muco atua a nível sistêmico, visto seu uso oral e intraduodenal.

Esse mecanismo se encontra relacionado principalmente aos fatores protetores da mucosa. É descrito que as prostaglandinas são responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato na mucosa gástrica, além de favorecerem o fluxo sanguíneo local e por tais motivos são primordiais na manutenção da integridade da mucosa gástrica (PALILEO e KAUNITZ, 2011). Os distúrbios gastrointestinais adversos dos AINE'S são atribuídos à sua capacidade de inibição da COX-1 e conseqüente diminuição da síntese de PGs, que são responsáveis pela modulação de vários componentes envolvidos na defesa da mucosa gástrica (KONTUREK, 2005). A partir do exposto e dos dados obtidos, visto a redução da área de lesão gástrica por etanol/HCl e indometacina e diminuição da depleção do muco, sugere-se que um dos mecanismos possivelmente envolvidos na gastroproteção pela ação do extrato de *S. chilensis* relaciona-se com a disponibilidade de PGs na mucosa gástrica.

O processo inflamatório estabelecido no desenvolvimento da úlcera gástrica envolve o recrutamento e ativação de neutrófilos através de agentes quimiotáticos, promovendo a liberação de EROs e proteases, resultando em um dano tecidual inflamatório dependente de neutrófilos (FIALKOW *et al.*, 2007). A enzima MPO é encontrada em grânulos secundários de neutrófilos, e sua atividade é descrita como um indicador de infiltração de neutrófilos nos tecidos, promovendo inativação de proteínas e mediadores inflamatórios (SHIMOYAMA *et al.*, 2012).

Ainda, Santin *et al.*, (2013) demonstrou a participação de neutrófilos no modelo de úlcera aguda induzida por etanol/HCl, no qual verificou que a depleção de neutrófilos reduziu significativamente a área lesada. Visto que no presente estudo a atividade da MPO foi reduzida na dose de 300 mg/kg, esse pode ser mais um fator contribuinte para elucidar o mecanismo gastroprotetor do extrato de *S. chilensis*.

O estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio) e agentes

antioxidantes. Este tem sido implicado no desenvolvimento de lesões gástricas induzidas por etanol, onde um arsenal de EROS gerados por leucócitos ativados provoca danos na mucosa através da peroxidação lipídica e através de esgotamento das defesas antioxidantes, tais como a glutathiona reduzida (GSH) glutathiona peroxidase (GPx) e a capacidade antioxidante total (CAT) (TANG & HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 2011).

Devido a importante função atribuída aos EROs na causa das úlceras gástricas, em geral terapias que aumentem os níveis de GSH são consideradas benéficas no tratamento dessas doenças (KAPLAN *et al.*, 2012). Foi constatado neste estudo que a dose de 300 mg/kg do extrato de *S. chilensis* promoveu um aumento nos níveis de GSH, importante defesa antioxidante.

A secreção ácida constitui um fator agressor da mucosa gástrica e juntamente com a pepsina contribui para o aparecimento e desenvolvimento de lesões gástricas. Devido a este fato, os medicamentos mais comercializados atualmente para o tratamento de úlceras são os fármacos antissecretores (GILL *et al.*, 2011). No presente estudo, o modelo de ligadura de piloro, além do omeprazol promover a diminuição de parâmetros de secreção ácida, a dose de 100 mg/kg de *S. chilensis* se mostrou eficaz na diminuição do volume gástrico e acidez, como no aumento do pH e muco aderido.

Foi constatado que os compostos isolados, quercetrina (1,68 mg/kg) e afzelina (0,026 e 0,0078 mg/kg) apresentaram atividade gastroprotetora no modelo de úlcera induzido por etanol.

Madalosso *et al.* (2012), investigaram que a administração oral do extrato etanólico e fração AE das folhas de *Campomanesia lineatifolia* em doses de 100-400 mg/kg (modelo de etanol) e em doses de 400-1200 mg/kg (modelo indometacina) provou ser eficaz na prevenção de úlceras gástricas em ratos. O pré-tratamento com fração AE (400 mg/kg) aumentou significativamente o teor de muco gástrico no modelo de etanol. Os autores sugerem que essa atividade é devido a alta concentração de polifenóis isolados e identificados no extrato etanólico e fração AE, particularmente catequina e quercitrina. Esta última substância citada é o composto majoritário de *S. chilensis* e desta forma sugere-se a forte influência do mesmo no papel gastroprotetor apresentado pelo extrato da planta.

O papel anti-úlceras dos flavonoides também pode ser evidenciado no estudo de Zacaria *et al.* (2014), que avaliou o efeito gastroprotetor do extrato metanólico

das folhas de *Muntingia calabura* (MEMC), utilizando o modelo de indução de úlcera gástrica por ligadura de piloro em ratos. A MEMC exerceu efeito gastroprotetor através de vários mecanismos, incluindo o anti-secretor, antioxidante e anti-inflamatórios. Estas atividades podem ser atribuídas à presença de taninos, saponinas e flavonóides (por exemplo, a rutina, quercitrina, fisetina e diidroquercetina).

O mecanismo de ação da quercitrina envolve o aumento na produção de muco (ALARCON DE LA LASTRA *et al.*, 1994), de PAF endógeno (IZZO *et al.*, 1994), propriedades anti-histamínicas, a inibição da *Helicobacter pylori* (BEIL *et al.*, 1995), e as suas propriedades antioxidantes (MARTIN *et al.*, 1998 e KAHRAMAN *et al.*, 2003). Barnaulov *et al.* (1982) demonstraram o efeito anti-úlcera de quercitrina em ulceração induzida por reserpina enquanto KANDHARE *et al.* (2011) relataram o valor terapêutico da fisetina na prevenção de úlcera gástrica experimental em virtude do seu mecanismo antioxidante.

Vários estudos apontam sobre as propriedades antiulcerogênica e gastroprotetora de extratos vegetais ricos em flavonoides (ARAWWAWALA *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010). Os flavonóides são capazes de ativar o sistema de defesa da mucosa através da estimulação da secreção de muco gástrico e eliminação de EROS e radicais livres produzidos por etanol (ABDELWAHAB *et al.*, 2011; MAYER ET AL, 2009; ESWARAN *et al.*, 2010). Contudo, os flavonóides ainda inibem a produção de pepsinogênios e diminuem a secreção de ácido na mucosa (LA CASA *et al.*, 2000).

Ressalta-se que as doses de quercitrina e afzelina utilizadas foram baseadas em dois parâmetros: 1) o seu rendimento; 2) a menor dose gastroprotetora ativa do extrato de *S. chilensis*. As substâncias apresentaram-se como potenciais responsáveis pelos efeitos gastroproterores da planta evidenciados neste estudo. Visto que foi observado a ação do extrato da planta na diminuição da área gástrica lesada, aumento da produção de muco, diminuição de MPO, diminuição de DPPH e aumento de GSH, verifica-se que o mecanismo possível pelo qual acontece a gastroproteção relaciona-se por diversas vias, como fatores protetores de mucosa, antioxidante e via inflamatória.

Em relação a atividade antinociceptiva, apenas o extrato de *S. chilensis* apresentou-se significativo no teste de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina.

A carragenina é um agente flogístico vastamente utilizado na busca de novos agentes anti-hiperalgésicos. Ela tem por mecanismo a indução não específica de um processo inflamatório, que leva a hiperalgesia (REICHLING; LEVINE, 2009). É um modelo útil para avaliar a contribuição de mediadores presentes nas alterações vasculares associadas à inflamação aguda (SALVEMINI *et al*, 1996).

A resposta inflamatória produzida pela carragenina é bifásica. A primeira fase (0 - 2,5h), caracterizada pelo edema não-fagocítico, está associada à ação de mediadores como serotonina, cininas (TNF, IL-1 β , IL-2 and INF γ) e principalmente histamina (RIBEIRO *et al.*, 2000; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007). A histamina é responsável pela dor local, ativação do sistema complemento e das células endoteliais, recrutamento de leucócitos e formação do edema no local da inflamação (PAULA *et al.*, 2006). Já a segunda fase (2,5 - 4h) está relacionada às presenças de prostaglandinas, cicloxigenase e migração leucocitária para a área inflamada (PANTHONG *et al.*, 2007).

No modelo experimental induzido por carragenina, a fase inicial da inflamação foi inibida pelo tratamento com o extrato de *S. chilensis*, o que sugere um provável efeito deste sobre os primeiros mediadores inflamatórios liberados. Efeito também observado na atividade gastroprotetora, no qual foi constatada a diminuição da secreção ácida, possível efeito ocasionado pela inibição dos receptores de H₂ pela planta.

Em relação a atividade antiproliferativa, Brietzke *et al.*, 2012, avaliou as atividades antiproliferativas de três extratos orgânicos (metanol, clorofórmio e acetato de etila) obtidos das flores de *S. chilensis*. Para isso, a linhagem celular de carcinoma de pulmão de não pequenas células NCI-H460 foi exposta a concentrações seriadas dos extratos de *S. chilensis*. A atividade antiproliferativa foi avaliada após 72 horas de exposição destes extratos através do ensaio de Sulforodamina B (SRB). Os resultados sugerem que o extrato acetato de etila possui mediano efeito citotóxico (IC₅₀ de 31,8 \pm 8,7 μ g/mL), enquanto que os extratos de clorofórmio e metanol não demonstraram efeito antiproliferativo na linhagem estudada.

No presente estudo não foi verificada ação antiproliferativa para *S. chilensis* e *T. majus*, visto que para serem considerados significativos, os valores devem ser menores que 30 μ g/mL (FOUCHE *et al.*, 2008).

7 CONCLUSÕES

A análise fitoquímica evidenciou a presença de dois compostos na planta *S. chilensis*, a quercitrina e a afzelina, este sendo um raro flavonoide e reportado pela primeira vez na planta. Esses compostos apresentaram relevante atividade gastroproter, diminuindo a área de lesão gástrica no modelo de úlcera induzida por etanol. Ainda o EMB da planta evidenciou redução de lesão gástrica nos dois modelos de úlcera gástrica, etanol/HCL e indometacina, ainda diminuiu depleção do muco (100 e 300 mg/kg), diminuiu MPO (300 mg/kg), diminuiu DPPH (100 e 1000 mg/kg), aumentou GSH (300 mg/kg) e sobre os parâmetros de secreção ácida a dose de 100 mg/kg do extrato reduziu volume e acidez gástrica e aumentou pH e muco aderido. Tais resultados sugerem que o extrato de *S. chilensis* pode ser um composto natural adequado para prevenção e tratamento de lesões gástricas, corroborando com o seu uso popular. Em adição, foi verificada atividade antinociceptiva para o extrato metanólico de *S. chilensis* no teste de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina e nenhum resultado relevante para atividade antiproliferativa.

Como parte da composição química de *T. majus* foi identificado o composto epicatequina como majoritário, contudo, o extrato metanólico da planta não apresentou atividade farmacológica para os ensaios antiproliferativo e antinociceptivo.

Os resultados obtidos atualmente são promissores, principalmente para *S. chilensis* e estimulam a continuidade destes estudos para a constante busca de plantas e compostos com potencial gastroprotetor, especialmente em relação à *S. chilensis*, que foi efetiva em modelos de gastroproteção e processos dolorosos.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, S.I.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; SUKARI, M.A.; ABDUL, A.B.; TAHA, M.M.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K.H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces antiulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 963–970, 2011.

ADHAMI, V. M.; KHAN, N.; MUKHTAR, H. Cancer Chemoprevention by Pomegranate: Laboratory and Clinical Evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 1, p. 811-5, 2009.

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, E.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.

ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M.J.; , MOTILVA, V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin, a gross and histologic study. **Pharmacology**, v. 48, p. 56–62, 1994.

AL-ASMARI, A. K.; AL-ELAIWI, A. M.; ATHAR, M. T.; TARIQ, M.; AL EID, A.; AL-ASMARY, S. M. A Review of Hepatoprotective Plants Used in Saudi Traditional Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-22, 2014.

ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Physiological Society**, v. 288, p. 1-19, 2005.

AKRAM, M.; HAMID, A.; GHAFAR, A.; TAYYABA, N.; SAEED, A.; ALI, M.; NAVEED, A. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 313-9, 2014.

APÁTI, P.; HOUGHTON, P.J.; KITE, G.; STEVENTON, G.B.; KERY, A. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 251-256, 2006.

ARAÚJO, M. B.; BORINI, P.; GUIMARÃES, R. C. Etiopathogenesis of peptic ulcer: back to the past? **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 51 n. 2, p. 155-161, 2014.

ASSINI, F. L.; FABRÍCIO, E. J.; LANG, K.L. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, n. 1, p. 130-134, 2013.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; NAKAYAMA, M.; et al. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5496-500, 2000.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 9, p. 1447–1457, 2009.

BANDYOPADHYAY, D.; BISWAS, K.; BHATTACHARYYA, M.; REITER, R. J.; BANERJEE, R.K. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. **Current Molecular Medicine**, v. 1, n. 4, p. 501-13, 2001.

BARNAULOV, O.D.; MANICHEVA, O.A.; ZAPESOCHNAYA, G.G.; SHELYUTO, V.L.; GLYZIN, V.I. Effects of certain flavonoids on the ulcerogenic action of reserpine in mice. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 16, p. 300–303, 1982.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BECKER, D. E. Basic and Clinical Pharmacology of Glucocorticosteroids. **Anesthesia Progress**, v. 60, p. 25-32, 2013.

BEIL, W.; BIRKHOIZ, C.; SEWING, K. F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittel-Forschung**, v, 45, n. 6, p. 697–700, 1995.

BELAICHE, J.; BURETTE, A.; DE VOS, M.; LOUIS, E.; HUYBRECHTS, M.; DELTENRE, M. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta Gastroenterology Belgium**, v. 65, p. 65–73, 2002.

BISHAYEE, A.; AHMED, S.; BRANKOV, N.; PERLOFF, M . Triterpenoids as Potential Agents for The Chemoprevention and Therapy of Breast Cancer. **Front Biosci**, v. 1, p. 980-96, 2011.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.. **The complete German Commission E monographs**. Boston: American Botanical Council, Austin and Integrative Medicine Communications, 1998.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W. R.; GOLDBERG, A. **The complete German commission e monographs**. Boston: American Botanical Council, Austin and Integrative Medicine Communications, 1998. 685p.

BOLETA-CERANTO, D. C. F.; VEIGA, M. C. F. A.; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na ATM de ratos. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 50, p. 354-60, 2005.

BOHLMANN, F.; FRITZ, U.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago species*. **Phytochemistry**, v.19, p.2655-2661, 1980.

BONGARTZ, D.; HESSE, A.. Selective extraction of quercetrin in vegetable drugs and urine by off-line coupling of boronic acid affinity chromatography and

highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 673, p. 223- 230, 1995.

BOORHEM, R. L. **Reader's Digest - segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil LTDA, 1999.

BOWN, D. **The herb Society of América – encyclopedia of herbs & their uses**. New York: Dorling Kindersley Publishing Inc, 1995.

BRASIL, Resolução no 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/>>. Acesso em: 11 março de 2015.

BRIETZKE, C. B.; CABRAL, J. L.; CAMPOS, F.; CONTER, F. U.; GERMANO, V. S.; FERRAZ, A. B. F.; GRIVICICH, I. Avaliação da Atividade Antiproliferativa de Extratos de Flor de *Solidago chilensis* Meyen na Linhagem Celular de Carcinoma de Pulmão NCI-H460. In: **XVIII Salão de Iniciação Científica e Tecnológica**. 2012.

BRUSOTTI, G.; CESARI, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2013.

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

BUCCIARELLI, A.; MANCINI, M.; DE LAS, M.; SKLIAR, M. I. Gastroprotective activity of *Solidago chilensis*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v, 6, n. 6, p. 332-333, 2007.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais** – UEG/Câmpus de Iporá, v.3, n. 2, p.44-75 – jul/dez 2014.

CARNEIRO, P. S. **Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** 2009. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2009.

COELHO, M. F. B.; SILVA, A. C.. In: “Pontes e Lacerda” and “Comodoro”. **Agricultura Tropical**, UFMT/FAMEV. Mato Grosso, 1995.

COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, S.; BALLESTER, I.; XAUS, J.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. **European Journal of Immunology**, v. 35, p.584-92, 2005.

CONDE, R.; CORRÊA, V.S.; CARMONA, F.; CONTINI, S.H.; PEREIRA, A.M. Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1197-1201, 2011.

CÓRDOBA, A.; SATUÉ, M.; GÓMEZ-FLORIT, M.; MONJO, M.; RAMIS, J. M. Flavonoid coated Titanium surfaces for Bioactive Bone implants. **Stem Cell & Translational Investigation**, v. 2, p. 1-4, 2015.

CORRADINI, E., et al., Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v, 25, p. 469-495, 2011.

CORREIA, E.; et al, Propagação vegetativa de arnica-brasileira (*Solidago chilensis* Meyen) por estacas de rizoma. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu,

SP 1998 [online], p. 23-27, Disponível em: <www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/.../artigo_3_v1_n1.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAGG, M. G.; NEWMAN, J. D. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos. In: YUNES, R. A; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí-SC: Editora UNIVALI, 2014, p.55-84, cap.3.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, pp. 72–79, 2005.

CRAIG, A. D. A new view of pain as a homeostatic emotion. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 6, p. 303-7, 2003.

DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2014.

DAS, P.; ABOUD, M. T.; HAQUE, W.; JAVLE, M.; KASEB, A.; CURLEY, S. A.; VAUTHEY, J. N.; ALOIA, T. A.; BEDDAR, A.S.; DELCLOS, M. E.; KRISHNAN, S.; CRANE, C. H. Gastric bleeding after radiation therapy for intrahepatic cholangiocarcinoma. **Practical Radiation Oncology**, v. 3, n. 4, p. 344-8, 2012.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; PALACIOS-ESPINOSA, J. F.; REYES-RAMÍREZ, A.; MATA, R. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 114, p. 161–168, 2007.

DE MEDEIROS, J. M.; MACEDO, M., CONTANCIA, J. P.; NGUYEN, C.; CUNNINGHAM, G.; MILES, D. H. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 157–165, 2000.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, p. 337-3, 1999.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 82-102, 1972.

EMURA, K.; YOKOMIZO, A.; TOYOSHI, T.; MORIWAKI, M. Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, p. 68–74, 2007.

FALCÃO, H.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 381-391, 2005.

FERREIRA, R.B.G.; VIEIRA, M. C.; ZÁRETE, N. A. H. Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* 'jewel' em função de espaçamentos entre plantas. **Revista Brasileira Plantas Medicas**, v. 7, p. 57–66, 2004.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, p. 227-235, 2007.

FERRO, D. **Fitoterapia**: conceitos clínicos. Atheneu, São Paulo, 2006.

FIANDALO, M. P.; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell Apoptosis. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 165-175, 2012.

INCA. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, S.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastropathy. **Digestive and Liver Diseases**. v. 33, n. 2, p. 35-43. 2001.

FIGUEREDO, S. M.; DO NASCIMENTO, F. P.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; DE IBAROLA MDEL, C.; DE ARRUA, R. L.; SANTOS, A. R. Antinociceptive and gastroprotective actions of ethanolic extract from *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**, v, 135, p. 603-609, 2011.

FOO, L. Y.; NEWMAN, R.; WAGHORN, G.; McNARBB, W. C.; ULYATT, M, J, Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 617-624, 1996.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 48, n. 2, p. 129-141- 1999.

GADELHA, C. S.; PINTO JUNIOR, V. M.; BEZERRA, K. K. S.; MARACAJÁ, P. B.; MARTINS, D. S. S. Utilização de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais em diferentes segmentos da sociedade. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 01 - 15, 2015.

GARRALLA, S.; BULACIO, E. El polen de las especies argentinas de *Tropaeolum* (*Tropaeolaceae*). **Darwiniana**, v. 49, n. 2, p. 119-130. 2011.

GARZÓN, G.A.; WROLSTAD, R.E. Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*). **Food Chemistry**, v. 114, p. 44–49, 2009.

GASTALDO, B.; HATANAKA, E.; BORTOLON, J. R.; MURATA, G. M.; BACCHI, E. M. Action of constituents of *Solidago chilensis* DC (Brazilian arnica) in the mechanisms of wound healing. **Planta Medica**, v. 78. n. 11, p. PI319, 2012.

GILL, J.M.; PLAYER, M.S.; METZ, D.C. Balancing the risks and benefits of proton pump inhibitors. **Annals of Family Medicine**, v. 9, n.3, p.200-202, 2011.

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

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.

GOMES, C.; LOURENÇO, E. L. B.; LIUTI, E. B.; DUQUE, A.O.; NIHI, F.; LOURENÇO, A. C.; MENDES. T. C.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; DALSENTER, P.R. Evaluation of subchronic toxicity of the hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 481–487, 2012.

GONZALEZ, F.G.; DI STASI, L.C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 125-34, 2002.

GRIFFITHS, D. W.; DEIGHTON, N.; BIRCH, A. N.; PATRIAN, B.; BAUR, R.; STADLER, E. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. **Phytochemistry**, v. 57, p. 693–700, 2001.

HÄNSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHEIDER, G. (eds). **Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**. Berlin: Springer, 1994. p. 752–764.

HASHIMOTO, F. NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds LVI. Isolation of four new acylated flavan-3-ols from Oolong tea. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 611-616, 1987.

HENNING, S. M.; WANG, P.; HEBER, D. Chemopreventive effects of tea in prostate cancer: green tea versus black tea. **Molecular Food and Nutrition Research**, v. 55, p. 1-16, 2011.

HIRSCH, F. R.; MERRICK, D. T.; FRANKLIN, W. A. Role of Biomarkers for Early Detection of Lung Cancer and Chemoprevention. **European Respiratory Journal**, v. 19, p. 1151-8, 2002.

IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Antiulcer effect of flavonoids: role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 179–181, 1994.

JORGE, S.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; TAMBELI, C. Interferential therapy produces antinociception during application in various models of inflammatory pain. **Physical Therapy**, v. 86, n. 6, p. 800-08, 2006.

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.

KALLUF, L.J.H. **Fitoterapia funcional**: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos. 1.ed. São Paulo: VP Editora, 2008. 304p.

KANDHARE, A.D.; RAYGUDE, K.S.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S.L. The ameliorative effect of fisetin, a bioflavonoid, on ethanol-induced and pylorus ligation-induced gastric ulcer in rats. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 5, p. 236–243, 2011.

KEARNS, G. L.; WINTER, H. S. Proton pump inhibitors in pediatrics: relevant pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 52-59, 2003.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229 – 245, 2004.

KIM, H. J.; CHOI, S. E.; PARK, K. H.; CHOI, H. K.; LEE, M. W.; KIM, S. K. Antioxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-

2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 424-8, 2008.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf, 1999.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. A patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.

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.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **Journal of physiology and pharmacology**, v. sep., p. 56, 2005.

KWIECIEŃ, S.; BRZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 761-73, 2002.

KWON, E. K.; LEE, D. Y.; LEE, H.; KIM, D. O.; BAEK, N. I.; KIM, Y. E.; KIM, H. Y. Flavonoids from the buds of *Tosa damscena* inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and agiotensin I-converting ezyme. **Journal of Africultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 882-6, 2010.

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

LACAILLE, D.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, p. 47–52, 2001.

LA CASA, C., VILLEGAS, I., ALARCON DE LA LASTRA, C., MOTILVA, V., MARTIN, 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.

LEE, S. Y.; MIN, B. S.; KIM, J. H.; LEE, J.; KIM, T. J.; KIM, C. S.; KIM, Y. H.; LEE, H. K. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 273-6, 2005.

LIN, J. K.; TSAI, S. H. Chemoprevention of Cancer and Cardiovascular Disease by Resveratrol, **Proceedings of the National Science Council, Republic of China B**, v. 23, p. 99-106, 1999.

LIZ, R.; VIGIL, S. V. G.; GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 515-521, 2008.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**. v. 353, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LOGUERCIO, C., TARANTO, D., BENEDEUCE, F., BALANCE, V. V., VINCENTIS, A. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. **Gut**, v. 34, n. 2, p.161-165, 1993.

LOPEZ AYME, A. J. L. **O efeito do pH na interação da Albumina Sérica Humana e os Flavonoides Quercetina e Quercitrina**. 2014. 83 f. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de biociências, Letras e ciências exatas. São José do Rio Preto, 2014.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids

on rat splenocytes, a structure- 75 activity relationship study. **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**. v. 76, p. 495, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; DE SOUSA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.

LOURENÇO, E. L. B.; MULLER, J. C.; BOARETO, A. C.; MINATOVICZ, B.; CRESTANI, S.; GASPAROTTO JR, A.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; DALSENTER, P. R. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of *Tropaeolum majus* L. and its effect on uterine contractility. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 418-423, 2012.

LYKKESFELDT, J.; MOLLER, B. L. Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. (isothiocyanates as potent enzyme inhibitors). **Plant Physiology**, v. 102, p. 609–613, 1993.

MAGHRANI, M.; ZEGGWAGH, N. A.; HALOUI, M.; EDDOUKS, M. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 31–35, 2005.

MALHEIROS, A; BITTENCOURT, C. M. S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V. In **Fármacos e medicamentos, uma abordagem multidisciplinar** (Cechinel Filho, V; Bresolin, TMB, Eds). Editora Santos, São Paulo, 2010.

MARCHETTI, F.; GERARDUZZI, T.; VENTURA, A. Proton pump inhibitors in children: a review. **Digestive and Liver Disease**, v. 35, p. 738-46, 2003.

MARTEL, C.; FERLAY, J.; S. FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet**, v. 13, n. 6, p. 607–615, 2012.

MARTIN, M.J.; LA-CASA, C.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, p. 82–88, 1998.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV. 220p, 1994.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MELO, J.G. **Controle de qualidade e prioridades de conservação de plantas medicinais comercializadas no Brasil**. 2007. Dissertação de Mestrado em Botânica. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2007.

MESSIAS, M. C. T. B.; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MIETKIEWSKA, E.; GIBLIN, E. M.; WANG, S.; BARTON, D. L.; DIRPAUL, J.; BROST, J. M.; KATAVIC, V.; TAYLOR, D. C. Seed-specific heterologous expression of a nasturtium FAE gene in Arabidopsis results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2665–2675, 2004.

MIGUEL, S. A arnica desvendada. **J USP**, v, 22, p. 6, 2007.

MIN, B. S.; LEE, S. Y.; KIM, J. H.; LEE, J. K.; KIM, T. J.; KIM, D. H.; KIM, Y. H.; JOUNG, H.; LEE, H. K.; NAKAMURA, N.; MYASHIRO, H.; HATTORI, M. Anti-complement activity of constituents from the stem-bark of *Juglan mandshurica*. **Biological and Pharmaceutical Bullterin**, v. 26, p. 1042-4, 2003.

MLCEK, J.; ROP, O. Fresh edible flowers of ornamental plants - A newsorce of nutraceutical foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p.561–569, 2011.

MOK, S.; LEE, S. Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase. **Food Chemistry**, v. 136, p. 969–974, 2013

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A.. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac, Reference Publications, 2000.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n 4, p. 225-34, 2009.

MOTA, F. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERRERIRA, 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.

MUNOZ, M.; BARRERA, E.M.; MEZA, I. **El uso medicinal y alimentício de plantas natives naturalizadas en Chile**. Museo Nacional De Historia natural, Santiago De Chile, 1981.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V. Atividades biológicas de los flavonoides naturales. In: YUNES, R. A; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí-SC: Editora UNIVALI, 2014, p.211-249, cap.8.

NASCIMENTO, J. E.; LACERDA, E. U.; NASCIMENTO, V. T.; MELO, J.G.; ALVES, B. S.; SILVA, L. G. M.; et al. Produtos à base de Plantas Medicinais comercializados em Pernambuco – Nordeste do Brasil. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 13-22, 2005.

NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 62– 72. 2004.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí-SC: Editora UNIVALI, 2003, p. 9-56, cap 1.

NIIZU, P.Y.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flowers and Leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of Lutein. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 605–609, 2005.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. E. C.V.; BOELENS, P. G.; NORREN, K. V.; LEEUWEN, P. A. M. V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NIV, Y.; BOLTIN, D. Secreted and membrane-bound mucins and idiopathic peptic ulcer disease. **Digestion**, v. 86, n. 3, p. 258-63, 2012.

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

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 2. ed. São Paulo: IBRASA, p. 9-63, 1997.

PANIZZA, S. **Plantas que curam (cheiro de Mato)**. 3. ed. São Paulo: IBRASA, 1998.

PANTHONG, A.; SUPRADITAPORN, W.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; REUTRAKUL, V. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 264–270, 2007

PAULA, L.; SANTOS, W. F.; MALHEIRO, A.; CARLOS, D.; FACCIOLI, L. H.. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a modelo of Polybia

paulista venom-induced inflammation. **International Immunopharmacology**, n. 6, p. 182–189, 2006.

PÉRICO, L. L. **Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica de *Serjania marginata* frente à doença ulcerosa péptica experimental**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências Botucatu, 2014.

PHILLIPSON, M.; JOHANSSON, M.E.V.; HENRIKSNAS, J. et al. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, p. 806–812, 2008.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-38, 2004.

QUINTÃO, N. L.; ROCHA, A. C.; FERNANDES, E. S.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. **Anesthesia & Analgesia**. v. 101, n. 6, p. 1763-1769, 2005.

RAJASEKARAN, A. Tuberculosis is still a scourge of mankind--why? **Journal of the Indian Medical Association**, v. 110, n. 5, p. 323-4, 2012.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. **Trends neuroscience**. v. 32, p. 611-618, 2009.

REGASINI, I. O.; VELLOSA, J. C.; SILVA, D. H.; FURLAN, M.; DE OLIVEIRA, O. M.; KHALIL, N. M.; BRUNETTI, I. L.; YOUNG, M. C.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Flavonols from *pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1739-44, 2008.

RHO, H. S.; AHN, S. M.; LEE, B. C.; KIM, M. K.; GHIMERAY, A. K.; JIN, C. W.; CHO, D. H. Changes in flavonoid content and tyrosinase inhibitory activity in kenaf leaf extract after far-infrared treatment. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 7534-6, 2010.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal of pharmacology**. v. 391, p. 97-103, 2000.

RIZVI, S. I.; ZAID, M. A. Insulin-like effect of (-) epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 9, p. 776-778, 2001.

ROBBINS, S.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1592 p.

ROMAN JUNIOR, W. A. **Estudo farmacognóstico para as espécies medicinais *Alpinia zerumbet*, *Solidago chilensis* e *Eugenia uniflora***. 2013. 191 f. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

RUSSO, A.; GARBARINO, J. *Solidago chilensis* Meyen et *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav. : petite revue de leur profil antioxydant. **Phytothérapie**, v. 6, p. 333-341, 2008.

RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; et al. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biology and Toxicology**, v.16, p. 91-8, 2000.

SABIR, S.M., AHMAD, S.D., HAMID, A., KHAN, M.Q., ATHAYDE, M.L., SANTOS, D.B., BOLIGON, A. A. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 131, p. 741-747, 2012.

SAIRAM, K. Antiulceratogenic effect of methanolic extract of *Emblca officinalis*: an experimental study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.82, p.1-9, 2002.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-38, 1996.

SAMONINA, G. E., KOPYLOVA, G. N., LUKJANZEVA, G.V., ZHUYKOVA, S.E., SMIRNOVA, E. A., GERMAN, S. V., GUSEVA, A. A. Antiulcer effects of amylin: a review. **Pathophysiology**, n. 11, p. 1-6, 2004.

SANTIN, J. R.; DAUFENBACK MACHADO, I.; RODRIGUES, S. F.; TEIXEIRA, S.; MUSCARÁ, M. N.; LINS GALDINO, S.; DA ROCHA PITTA, I.; FARSKY, S. H. Role of an indole-thiazolidine molecule PPAR pan-agonist and COX inhibitor on inflammation and microcirculatory damage in acute gastric lesions. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

SANTO, A.P.E.; MARTINS, I.S.S.; TOMY, S.C.; FERRO, V.O. Efeito anticoagulante in vitro do extrato hidroetanólico das folhas e flores édulas de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) sobre o plasma humano. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 732-736, 2007.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. 3. ed. [S.l.]: Humana Press, 2012. v. 864, p. 427-464.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.. A labdan diterpene from *Solidago chilensis* Roots. **Planta Medica**, v. 2, p. 179-180, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L.. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 111-115, 2002.

SCHRAMM, D. D.; GERMAN, J. B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 560–566, 1998.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519-525, 2004.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. In: HANDBOOK OF INFLAMMATION. **Initiation of inflammatory response and its prevention**. New York, 1985. p. 27-47.

SEER Cancer Statistics Review 1975–2010, National Cancer Institute, Cancer Facts and Figures 2013, American Cancer Society (ACS), IARC, Globocan, Atlanta, Ga, USA, 2012.

SHIMOYAMA, A. T.; SANTIN, J. R.; MACHADO, I. D.; DE OLIVEIRA E SILVA, A. M.; DE MELO, I.L.; MANCINI-FILHO, J.; FARSKY, S. H. Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, p. 5-14, 2013

SIDAHMED, H.M.; AZIZAN, A.H.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; ABDELWAHAB, S.I.; TAHA, M. M.; HADI, A.H.; KETULY, K.A.; HASHIM, N.M.; LOKE, M.F.; VADIVELU, J. Gastroprotective effect of desmosdumotin C isolated from *Mitrella kentii* against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhage in rats: possible involvement of glutathione, heat-shock protein-70, sulfhydryl compounds, nitric oxide, and anti-*Helicobacter pylori* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 183, p. 1-15, 2013.

SILVA, N. C. B.; ESQUIBEL, M. A.; ALVES, I. M.; VELOZO, E. S.; ALMEIDA, M. Z.; SANTOS, E. S., CAMPOS-BUZZI, F., MEIRA, A.V., CECHINEL-FILHO, V.

Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J. W. Grimes (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 19, p. 46–50, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2000. 221-320p.

SMOLAREK, F. S. F. **Contribuição ao estudo fitoquímico, toxicológico e das atividades biológicas da espécie vegetal *Solidago microglossa* DC (*Compositae*)**. 2011. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.

STEWART, W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2014.

STOLZ, E. D.; MÜLLERA, L. G.; TROJAN-RODRIGUES, M.; BAUMHARDT, E.; RITTERB, M. R.; STELA M. K. RATES, S. M. K. Survey of plants popularly used for pain relief in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 185 – 196, 2014.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y.; ÖSTASAN, N.; SÜLEYMAN, B. Antiinflammatory effects of selective COX-2 inhibitors. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, p. 775-780. 2004.

TANIMOTO, S.; NAKAGAWA, T.; YAMAUCHI, Y.; MINAMI, M.; SATOH, M. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 2343-2350, 2003.

TARNAWSKI, A.S.; TOMIKAWA, M.; OHTA, M.; SARFEH, I.J. Antacid talcid activates in gastric mucosa genes encoding for EGF and its receptor. The molecular basis for its ulcer healing action. **Journal of Physiology**, v. 94, n.2, p. 93-98, 2000.

THE PUBCHEM PROJECT. Disponível em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 15 ago. 2011.

THIEM, B.; GOSLINSKA, O. Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from in vitro cultures. **Fitoterapia**, v. 73, p. 514-516, 2002.

TIRADO, J. G.; REYES, C. R.; PEIRÓ, P. S. Efecto de los flavonoides en La prevención del cáncer de pulmón: revisión sistemática. **Medicina Clínica**, v. 139, n. 8, p. 358-363, 2012.

TORRES, L. M. B.; AKISUE, M. K.; ROQUE, N. F. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a arnica do Brasil. **Revista de Farmácia e Bioquímica - USP**, v. 23, p. 33-40, 1987.

TORRES, L. M. B. ; ROQUE, N. F. ; AKISUE, M. K. Diterpenes from the roots of *Solidago microglossa*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 20, n. 2, p. 94-97, 1989.

TSAO, A. S.; KIM, E. S.; HONG, W. K. Chemoprevention of Cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, p. 150-80, 2004.

ULIASZ, A.; SPENCER, J. M. Chemoprevention of Skin Cancer and Photoaging, **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 178-82, 2004.

WU, J.; MUIR, A. D. Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soybean angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9899–9904, 2008.

VALVERDE, S.S.; OLIVEIRA, T.B.; SOUZA, S.P. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Fitos**, v. 7, n. 3, p.131-136, 2012.

VALVERDE-SOARES, S. S.; AZEVEDO-SILVA, R. C.; TOMASSINI, T. C. B. Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 3, n. 196-199, 2009.

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

VERDI, L. G; BRIGUENTE, I. N. M.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero baccharis (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: JANICK, J (ed.). **Perspectives on New Crops and New Uses**. ASHS Press: Alexandria, p. 152–159, 1999.

VILA, R., MUNDINA, M. TOMI, F., FURLÁN, R., ZACCHINO, S., CASANOVA, J., CAÑIGUERAL, S. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. **Planta Medica**, v. 68, p.164-167, 2002.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; KAWAI, Y.; GEMBA, M.; SHIMIZU, M. Protective effects of some flavonoids on the renal cellular membrane. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 51, p. 9-14, 1999.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; TOMII, T.; KANEKO, T.; LINUMA, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, S.; KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, v. 34, p. 732-737. 1993.

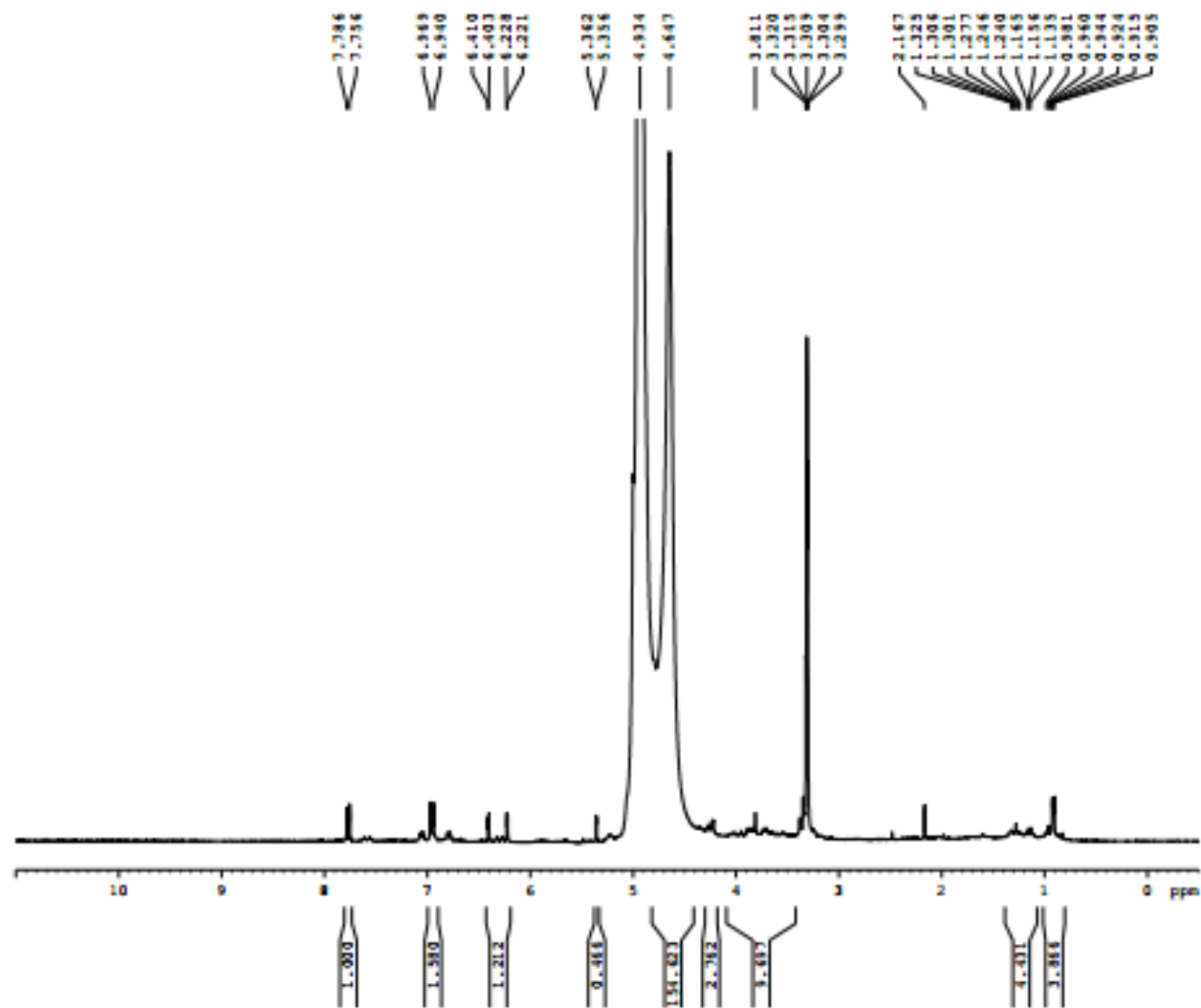
YIN, Y.Q.; LI, W.Q.; SON, Y.O.; SUN, L. J.; LU, J.; KIM, D.; WANG, X.; YAO, H.; WANG, L.; PRATHEESHKUMAR, P.; HITRON, A. J.; LUO, J.; GAO, N.; SHI, X. L.; ZHANG, Z. L. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, p. 89-99, 2013.

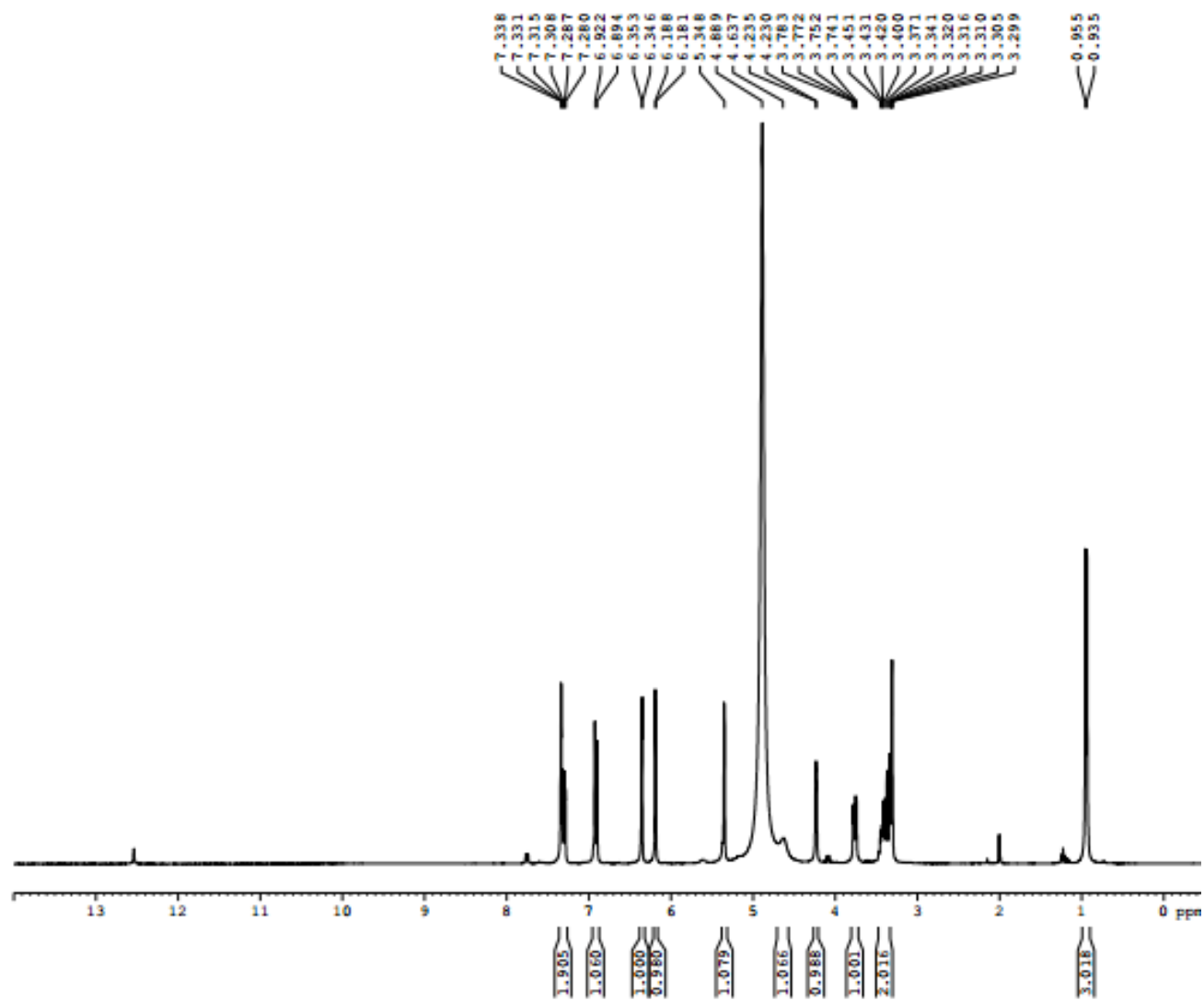
YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-44.

ZACARIA, Z. A.; BALAN, T.; SUPPAIAH, V.; AHMAD, S.; JAMALUDIN, F. Mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of *Muntingia calabura*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, n. 3, p. 1184-1193, 2014.

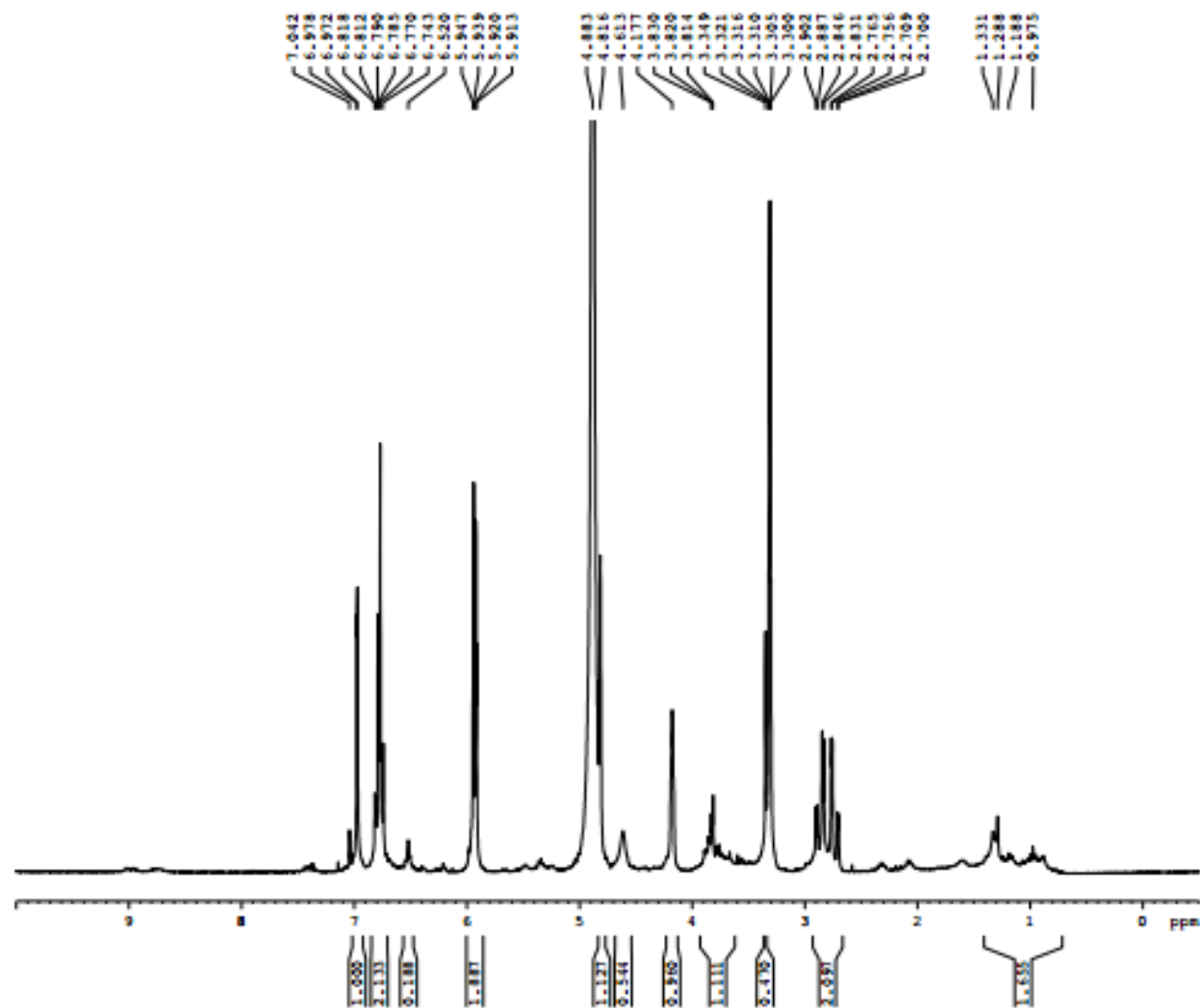
ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P. & HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **IHERINGIA**, v. 59, n. 2, p. 173-178, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4^a edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

APÊNDICE A – Espectro de RMN ^1H do composto quercitrina

APÊNDICE B – Espectro de RMN ^{13}C do composto quercitrina

APÊNDICE C – Espectro de RMN ^1H do composto epicatequina



APÊNDICE D – Espectro de RMN ^{13}C do composto epicatequina