



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JÉSSICA DE ANDRADE GOMES SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E
GASTROPROTETORA DAS FOLHAS DO *Croton heliotropiifolius* Kunth**

Recife
2022

JÉSSICA DE ANDRADE GOMES SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E
GASTROPROTETORA DAS FOLHAS DO *Croton heliotropiifolius* Kunth**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos essenciais para a saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva.

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Jéssica de Andrade Gomes.

Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e gastroprotetora das folhas do *Croton heliotropiifolius* Kunth. / Jéssica de Andrade Gomes Silva. – 2022.

140 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.
Inclui referências.

1. Euphorbiaceae. 2. Compostos Fenólicos. 3. Úlceras gástricas. I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.). II. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-009

JÉSSICA DE ANDRADE GOMES SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E
GASTROPROTETORA DAS FOLHAS DO *Croton heliotropiifolius* Kunth**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 25/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Valéria Pereira Hernandes (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos (Examinadora Externa)
Universidade Estadual da Paraíba

Prof.^a Dr.^a Cynthia Layse Ferreira de Almeida (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof.^o Dr. Eryvelton de Souza Franco (Examinadora Externo)
Centro Universitário Brasileiro

Prof.^a Dr.^a Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Suplente Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Fernanda (Suplente Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e aos meus pais, José Maria e Alda Maria, por todo amor, renúncia e dedicação em favor da minha educação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos meus pais, Alda Maria e José Maria, pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Maria Irene, pelo incentivo constante.

Ao meu namorado e amigo, Douglas Medeiros, pelo apoio e ajuda em tudo que estava ao seu alcance.

À Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, pelo “sim” em me orientar e também por nunca medir esforços na busca de novas oportunidades e melhorias para a realização desta pesquisa.

Ao BIOFARMATOX - Laboratório de Prospecção Farmacotocológica de Produtos Bioativos, onde desenvolvo minhas atividades de pesquisa.

À amiga Rayane Siqueira, que desempenhou papel essencial no desenvolvimento deste trabalho e também pela amizade dentro e fora do laboratório.

Aos companheiros de laboratório Elizabeth Fernanda, Katharina Porto, Marília Grazielly, Jhonatta Alexandre e George Torres, pela colaboração no trabalho, apoio, conselhos e por serem pessoas tão generosas que sempre estiveram dispostas a ajudar.

As alunas de iniciação científica Maria Gabriela e Stella Lourenço, pela ajuda, empenho e dedicação com as atividades laboratoriais.

À amiga Cibele Marques e sua família por ajudar na coleta do material botânico.

Aos Laboratórios LAMAI - Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial, LEA – Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada e seus integrantes: Prof.^a Norma Buarque, Prof.^o Rafael Ximenes, Pérsio Alexandre, Erik Jonne, Thales Henrique, Camila Alves, Fátima Rodrigues, Wellinton, Raudiney Vasconcelos e Sylvania, pelo apoio e disponibilidade dos equipamentos de seus laboratórios.

Ao Departamento de Antibióticos - UFPE, por sua infraestrutura e por todos os seus funcionários que trabalham diariamente com empenho e dedicação.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, por todo o suporte educacional na realização desta pesquisa e também por proporcionarem meu crescimento profissional.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amigos do “café” e as “migas do docto” por tornarem essa caminhada mais leve e alegre.

Aos meus avós, que mesmo não estando presentes fisicamente, são de fato os verdadeiros motivadores de todas as minhas conquistas.

A banca examinadora, que com generosidade proporcionou importantes contribuições para este trabalho.

Por fim, a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

"Ora, a fé é a certeza daquilo que esperamos e a prova das coisas que
não vemos".
Hebreus 11,1.

RESUMO

Croton heliotropiifolius (velame) é uma espécie vegetal encontrada na Caatinga do nordeste brasileiro, e constitui um dos principais representantes do gênero *Croton* que vem sendo usado pela população no alívio da dor de estômago. As úlceras gástricas são lesões caracterizadas por injúria no tecido e afetam milhares de pessoas no mundo. Deste modo, uma alternativa na busca de novas terapias para a prevenção e tratamento das doenças gástricas está na utilização de produtos naturais. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano, antioxidante e a citotoxicidade dos extratos das folhas de *C. heliotropiifolius*, bem como a toxicidade aguda e o efeito gastroprotetor em modelos de úlcera experimental *in vivo*. Os extratos hexânico (EHCh), acetato de etila (EACH) e etanólico (EECh) foram preparados e submetidos à análise por cromatografia em camada delgada, onde foi possível a identificação de compostos como flavonoides, triterpenos, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, proantocianidinas, leucoantocianidinas. Posteriormente, foi realizado o doseamento de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas, por serem as principais classes de compostos identificadas na análise cromatográfica. Na avaliação da atividade antibacteriana, foi observada fraca ação do EHCh frente ao *Bacillus subtilis* e inatividade para as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Helicobacter pylori*. O EACH e o EECh não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas. A atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS, redução do íon férrico (FRAP) e capacidade antioxidante total apontaram o EECh como o extrato de melhor efeito antioxidante. Quanto à citotoxicidade frente à linhagem de fibroblastos de camundongos (L919) e atividade tóxica aguda, foram observados mínimos efeitos tóxicos dos extratos nas doses testadas (1,56 – 50 µg no ensaio de citotoxicidade *in vitro* e 2000 mg/kg para o ensaio de toxicidade aguda). Na atividade gastroprotetora, no modelo agudo de úlcera induzido por etanol absoluto, o EHCh, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respectivamente, promoveu uma redução significativa das lesões em 85,16; 86,75 e 87,68 %, quando comparadas ao controle lesionado, que apresentou um percentual de lesão ulcerativa de 73,84 %. O EACH reduziu em 86,69; 87,95 e 88,28 % as lesões nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respectivamente, em relação ao controle lesionado. O EECh, também nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg reduziu respectivamente as lesões em 89,49 %, 92,92 % e 89,32 %, sendo este extrato considerado o mais ativo. No modelo de indução por indometacina, o EECh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, apresentou respectivamente, área de lesão ulcerativa de 11,18 mm², 7,39 mm² e 8,51 mm², sendo significativamente diferente do controle lesionado que apresentou área 23,11 mm². Quanto as dosagens de óxido nítrico (NO), glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO) no tecido estomacal, foi possível observar uma melhora significativa desses parâmetros antioxidantes e anti-inflamatórios após os tratamentos, sugerindo que a ação gastroprotetora dos extratos envolva múltiplos fatores. A investigação do NO como mecanismo de ação, comprovou efeito parcial na ação gastroprotetora do EECh. Contudo, é possível sugerir que os extratos apresentam atividade gastroprotetora promissora.

Palavras-chave: Euphorbiaceae; compostos fenólicos; úlceras gástricas.

ABSTRACT

Croton heliotropiifolius (velame) is a plant species found in the Caatinga of northeastern Brazil, and is one of the main representatives of the *Croton* genus that has been used by the population to relieve stomach pain. Gastric ulcers are lesions characterized by tissue injury and affect thousands of people worldwide. Thus, an alternative in the search for new therapies for the prevention and treatment of gastric diseases is the use of natural products. Therefore, this work aimed to evaluate *in vitro* the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity of *C. heliotropiifolius* leaf extracts, as well as the acute toxicity and gastroprotective effect in *in vivo* experimental ulcer models. The hexane (EHCh), ethyl acetate (EACH) and ethanolic (EECh) extracts were prepared and submitted to analysis by thin layer chromatography, where it was possible to identify compounds such as flavonoids, triterpenes, steroids, monoterpenes, sesquiterpenes, proanthocyanidins, leucoanthocyanidins. Subsequently, the determination of total phenols, flavonoids and proanthocyanidins was performed, as they are the main classes of compounds identified in the chromatographic analyses. In the evaluation of the antibacterial activity, it was observed weak action of the EHCh against *Bacillus subtilis* and inactivity for the strains of *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Helicobacter pylori*. EACH and EECh did not show antibacterial activity against the tested strains. The antioxidant activity by DPPH, ABTS, ferric ion reduction (FRAP) and total antioxidant capacity indicated EECh as the extract with the best antioxidant effect. As for cytotoxicity against the mouse fibroblast lineage (L919) and acute toxic activity, no toxicity was observed in the extracts at the doses tested (1.56 - 50 μg in the *in vitro* cytotoxicity assay and 2000 mg/kg for the toxicity assay acute). In the gastroprotective activity, in the acute model of ulcer induced by absolute ethanol, the EHCh, in doses of 50, 100 and 200 mg/kg, respectively, promoted a significant reduction of the lesions in 85,16; 86,75 and 87,68%, when compared to the injured control, which presented a percentage of ulcerative lesion of 73,84%. The EACH reduced by 86,69; 87,95 and 88,28% had injuries in doses of 50, 100 and 200 mg/kg, respectively, in relation to the injured control. EECh, also in doses of 50, 100 and 200 mg/kg, reduced the lesions by 89,49%, 92,92% and 89,32%, respectively, and this extract was considered the most active. In the indomethacin induction model, EECh in doses of 50, 100 and 200 mg/kg, presented, respectively, an ulcerative lesion area of 11,18 mm², 7,39 mm² and 8,51 mm², being significantly different from the injured control. which presented an area of 23,11 mm². As for the dosages of nitric oxide (NO), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in the stomach tissue, it was possible to observe a significant improvement of these antioxidant and anti-inflammatory parameters after the treatments, suggesting that the action gastroprotective effect of extracts involves multiple factors. The investigation of NO as a mechanism of action showed a partial effect on the gastroprotorative action of EECh. However, it is possible to suggest that the extracts have promising gastroprotective activity.

Keywords: Euphorbiaceae; phenolic compounds; gastric ulcers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Divisão anatômica do estômago e elementos da mucosa gástrica.....	21
Figura 2-	Modelo esquemático das interações celulares durante o processo digestivo.....	22
Figura 3-	Modelo esquemático da regulação da secreção ácida..	24
Figura 4-	Desequilíbrio entre os mecanismos de proteção e progressão da lesão gástrica.....	27
Figura 5-	Espécie <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.....	34
Figura 6-	Fluxograma experimental.....	40
Figura 7-	Percentual de Viabilidade celular da linhagem de fibroblastos de camundongo (L929) submetidas aos EHCh, EACCh e EECh.....	64
Figura 8-	Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EHCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	69
Figura 9-	Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EACCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	69
Figura 10-	Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	70
Figura 11-	Efeito da administração oral de EHCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	71
Figura 12-	Efeito da administração oral de EACCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	71
Figura 13-	Efeito da administração oral de EECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	72
Figura 14-	Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EHCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	74
Figura 15-	Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EACCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	74
Figura 16-	Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.....	75
Figura 17-	Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.....	77
Figura 18-	Efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.....	78

Figura 19-	Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.....	80
Figura 20-	Efeito da administração oral dos EHCh ECh e EECh nas concentrações de NO na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).....	81
Figura 21-	Efeito da administração oral dos EHCh ECh e EECh nas concentrações de GSH na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).....	83
Figura 22-	Efeito da administração oral dos extratos EHCh ECh e EECh nas concentrações de MDA na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).....	85
Figura 23-	Efeito da administração oral dos extratos EHCh ECh e EECh nas concentrações de MPO na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).....	87
Figura 24-	Efeito do EECh frente ao inibidor de NO (L-NAME) em modelo de úlcera induzida por Etanol em ratos.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sistemas e reveladores cromatográficos.....	41
Tabela 2-	Classes de metabólitos secundários encontradas nos extratos das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i>	55
Tabela 3-	Teor de fenóis totais e flavonoides presentes nos extratos das folhas de <i>C. heliotropiifolius</i>	57
Tabela 4-	Resultados da CMI e CMB dos extratos de <i>C. heliotropiifolius</i>	57
Tabela 5-	Valores da atividade anti- <i>H. pylori</i> e da capacidade de inibição da enzima urease.....	58
Tabela 6-	Atividade antioxidante dos extratos de <i>C. heliotropiifolius</i> por sequestro de DPPH.....	60
Tabela 7-	Atividade antioxidante dos extratos de <i>C. heliotropiifolius</i> por sequestro de ABTS.....	61
Tabela 8-	Atividade antioxidante dos extratos de <i>C. heliotropiifolius</i> por redução de íons férricos.....	62
Tabela 9-	Atividade antioxidante total dos extratos de <i>C. heliotropiifolius</i>	63
Tabela 10-	Efeito da administração oral de EHCh, EACCh, EECh e solução aquosa de Tween 20 a 1% (controle) no consumo de água, ração e ganho de massa corporal dos camundongos fêmeas, durante 14 dias.....	66
Tabela 11-	Efeito da administração oral de EHCh, EACCh, EECh e solução aquosa de Tween 20 a 1% (controle) na massa dos órgãos dos camundongos fêmeas.....	66
Tabela 12-	Efeito da administração oral de EHCh, EACCh, EECh e solução aquosa de Tween 20 a 1% (controle) nos parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas.....	67
Tabela 13-	Efeito da administração oral de EHCh, EACCh, EECh e solução aquosa de Tween 20 a 1% (controle) nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas.....	68

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azobis-(3-wtilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
ALU	Área de lesão ulcerativa
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
BHI	<i>Brain Heart Infusionn</i>
BIOFARMATOX	Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCK-2	Receptor de colecistocinina 2
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cl ₅₀	Concentração capaz de inibitória 50%
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
d.p.	Desvio padrão
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil1-picrilhidrazil
DTNB	5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
EACH	Extrato acetato
EAG	Equivalente ácido gálico
ECL	Células do tipo enterocromafins

EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EECh	Extrato etanólico
EHCh	Extratos hexânico
EP	Receptor de Prostaglandinas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FV	Favéolas gástricas
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GG	Glândulas gástricas
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
H ⁺	Próton
H ₂	Receptor histamínico do tipo H ₂
Hemobrás	Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina um beta
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes S/A
LAMAI	Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial
LP	Lâmina própria
M ₃	Receptores muscariníco tipo 3
MDA	Malondialdeído
ME	Muscular externa

MM	Camada muscular da mucosa
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NEU	Ácido etilborilaminoéster
NO	Óxido nítrico
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
Re	Rendimento
rpm	Rotações por minuto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
s.c.	Subcutânea
SM	Submucosa
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
v.o	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	O Estômago	21
2.1.1	Anatomia e Fisiologia Gástrica.....	21
2.1.2	Regulação da Secreção Ácida.....	23
2.1.3	Fatores Protetores da Mucosa Gástrica.....	25
2.1.4	Etiologia e Farmacoterapia das Úlceras Gástricas.....	26
2.2	Inovação no Setor Farmacêutico	29
2.3	Considerações Botânicas	30
2.3.1	Família Euphorbiaceae.....	30
2.3.2	Gênero <i>Croton</i>	32
2.3.3	Espécie <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth.....	33
3	JUSTIFICATIVA	36
4	OBJETIVOS	38
4.1	Objetivo Geral	38
4.2	Objetivos Específicos	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1	Materiais	39
5.1.1	Material Vegetal.....	39
5.1.2	Microrganismos.....	39
5.1.3	Linhagem Celular.....	39
5.1.4	Animais.....	39
5.2	Métodos	40
5.2.1	Preparação dos Extratos.....	40
5.2.2	Estudo Fitoquímico.....	41
5.2.2.1	<i>Cromatografia em Camada Delgada</i>	41
5.2.2.2	<i>Dosagem de Fenóis Totais</i>	42
5.2.2.3	<i>Dosagem de Flavonoides</i>	42
5.2.2.4	<i>Dosagem de Proantocianidinas</i>	43
5.2.3	Atividade Antibacteriana.....	43
5.2.3.1	<i>Concentração Mínima Inibitória (CMI)</i>	43
5.2.3.2	<i>Concentração Mínima Bactericida (CMB)</i>	44
5.2.3.3	<i>Atividade Anti-Helicobacter pylori</i>	44
5.2.3.4	<i>Ensaio de Inibição da urease</i>	44
5.2.4	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	45
5.2.4.1	<i>Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH</i>	45
5.2.4.2	<i>Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS</i>	45
5.2.4.3	<i>Atividade Redutora do Íon Férrico (FRAP)</i>	46
5.2.4.4	<i>Capacidade Antioxidante Total</i>	46
5.2.5	Ensaio Toxicológicos.....	47
5.2.5.1	<i>Atividade Cítotóxica</i>	47

5.2.5.2	<i>Ensaio Toxicológico não Clínico Agudo</i>	47
5.2.6	Atividade Gastroprotetora.....	48
5.2.6.1	<i>Lesão Gástrica Aguda Induzida por Etanol Absoluto</i>	48
5.2.6.2	<i>Lesão Gástrica Aguda Induzida por Indometacina (AINE)</i>	49
5.2.6.3	<i>Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica</i>	50
5.2.6.4	<i>Determinação dos Níveis de NO</i>	50
5.2.6.5	<i>Determinação dos Níveis de GSH</i>	50
5.2.6.6	<i>Determinação dos Níveis de MDA</i>	51
5.2.6.7	<i>Determinação dos Níveis de MPO</i>	51
5.2.6.8	<i>Avaliação do Envolvimento do Óxido Nítrico como Possível Mecanismo de Ação da Atividade Gastroprotetora</i>	52
5.3	Análise Estatística	52
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1	Preparação dos Extratos	54
6.2	Estudo Fitoquímico	54
6.2.1	Cromatografia em Camada Delgada.....	54
6.2.2	Dosagem de Fenóis Totais, Flavonoides e Proantocianidinas....	56
6.3	Atividade Antibacteriana	57
6.3.1	Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida.....	57
6.3.2	Atividade de Anti- <i>Helicobacter pylori</i> e ensaio de inibição da urease.....	58
6.4	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	59
6.4.1	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH.....	59
6.4.2	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS.....	61
6.4.3	Atividade Redutora do Íon Férrico (FRAP)	62
6.4.4	Capacidade Antioxidante Total.....	63
6.5	Ensaio Toxicológicos	63
6.5.1	Atividade Citotóxica.....	63
6.5.2	Ensaio Toxicológico não Clínico Agudo.....	65
6.6	Atividade Gastroprotetora	68
6.6.1	<i>Lesão Gástrica Aguda Induzida por Etanol Absoluto</i>	68
6.6.1.1	<i>Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica em Lesões Induzidas por Etanol</i>	73
6.6.2	<i>Lesão Gástrica Induzida por Indometacina (AINE)</i>	76
6.6.2.1	<i>Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica em Lesões Induzidas por Indometacina</i>	79
6.6.4	<i>Determinação dos Níveis de NO</i>	80
6.6.5	<i>Determinação dos Níveis de GSH</i>	82
6.6.6	<i>Determinação dos Níveis de MDA</i>	84
6.6.7	<i>Determinação dos Níveis de MPO</i>	86
6.6.8	<i>Avaliação do Envolvimento do Óxido Nítrico como Possível Mecanismo de Ação Gastroprotetor</i>	88
7	CONCLUSÕES	90

REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE A – Capítulo de Livro.....	116
APÊNDICE B – Artigo Publicado.....	126
ANEXO A – Ficha de Identificação Botânica.....	138
ANEXO B – Comitê de Ética.....	139
ANEXO C – Tabela de Toxicidade.....	140

1 INTRODUÇÃO

As úlceras gástricas constituem um problema de saúde bastante comum na sociedade moderna, caracterizado por injúria no tecido e, em casos mais graves, acometimento de camadas profundas subjacentes (HSIA *et al.*, 2018), com perfurações na mucosa gástrica capazes de levar à morte (KANGWAN *et al.*, 2014).

Fatores agressores intrínsecos, como o excesso de ácido gástrico, de pepsina, redução do fluxo sanguíneo, e extrínsecos, como infecções, consumo de álcool, fumo, estresse, uso prolongado de anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), em desequilíbrio com os agentes protetores, tais como a produção de muco, de bicarbonato, de prostaglandinas e de agentes antioxidantes, são apontados como responsáveis pela patogênese das lesões gástricas (KANGWAN *et al.*, 2014; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; KAVITT *et al.*, 2019).

O álcool e o uso de AINEs são os principais causadores exógenos não infecciosos de lesões no estômago (STERMER, 2002; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Já como agente exógeno infeccioso, a bactéria *Helicobacter pylori* é apontada como a mais incidente, pois acomete uma parcela considerável da população mundial e acarreta onerosos custos para a saúde pública (TONOLINI *et al.*, 2017).

Os fármacos inibidores da secreção de ácido gástrico, como os antagonistas dos receptores H₂ da histamina e inibidores da bomba de prótons, são largamente utilizados no tratamento contra úlceras gástricas, porém, quando em uso prolongado, perdem a eficácia e apresentam diversos efeitos colaterais, que vão desde reação de hipersensibilidade, ginecomastia, arritmias, impotência, aumento do risco de câncer gástrico, até alterações hematopoiéticas (SCHUBERT, 2016; KAVITT *et al.*, 2019).

Uma alternativa na busca de novas terapias para a prevenção e tratamento das doenças gástricas está na utilização de produtos naturais (BADKE *et al.*, 2011), tendo em vista que, é reconhecida a capacidade de muitos produtos de origem natural em retardar ou inibir a oxidação de moléculas, através da supressão de reações de oxidação em cadeia, conferindo efeito protetor (MAHBOUBI *et al.*, 2013), pois o estresse oxidativo crônico é responsável por muitas patologias, incluindo as gastrointestinais (LUSHCHAK, 2014; SIES,

2015).

Plantas medicinais são utilizadas na terapia de várias doenças devido à riqueza de seus constituintes bioativos. Os compostos fenólicos compõem, uma diversificada classe de metabólitos secundários, que possuem vários efeitos biológicos reconhecidos (HAVSTEEN, 2002), tendo sido descrito o seu potencial anti-inflamatório (VEZZA *et al.*, 2016; GARAYEV *et al.*, 2018), antioxidante (CHOBOT *et al.*, 2016; DE FREITAS *et al.*, 2021), anticancerígeno (ORFALI *et al.*, 2016; MATULJA *et al.*, 2022), citoprotetor gástrico e antissecretório (BARROS *et al.*, 2016). Estes compostos protegem a mucosa gástrica de lesões provocadas por diferentes agentes ulcerogênicos, através da diminuição da secreção de ácido gástrico e/ou do aumento dos mecanismos de defesa (MOTA *et al.*, 2009).

A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como velame e encontrada com frequência no bioma Caatinga do Nordeste brasileiro, é referida pela população como útil no alívio da dor de estômago, na disenteria e como antitérmica (RANDAU *et al.*, 2004). Estudos fitoquímicos com esta espécie identificaram a presença de compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonoides (RANDAU *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2017) e como os demais membros do gênero, é largamente utilizada em infusões medicinais (GOVAERTS *et al.*, 2000), sendo recentemente incorporada na composição do fitoterápico psicanaléptico ou estimulante, Catuama (LONGHINI *et al.*, 2017).

Assim, fundamentados pelo conhecimento etnobotânico, atrelado aos trabalhos previamente realizados com a espécie *C. heliotropiifolius*, este estudo teve como objetivo analisar a espécie do ponto de vista fitoquímico, avaliar o seu potencial antimicrobiano e antioxidante. Além disso, investigar a capacidade toxicológica *in vitro* e *in vivo*, visando comprovar a segurança do seu uso em ensaios de atividade gastroprotetora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

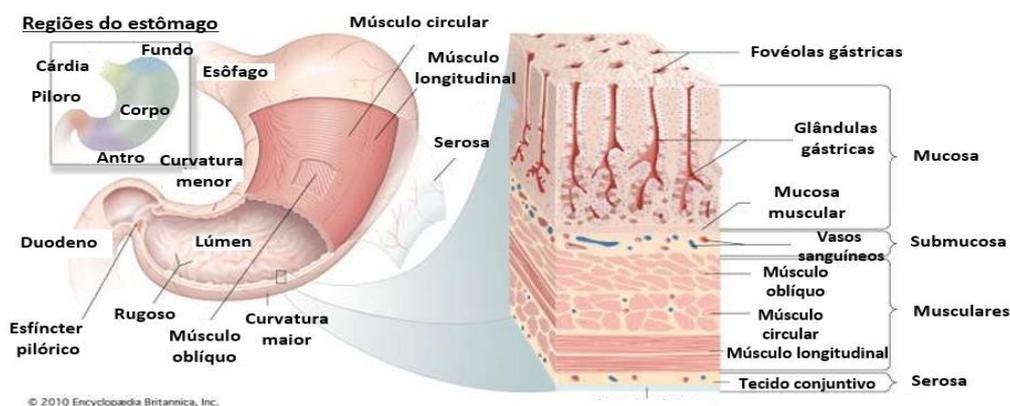
2.1 O Estômago

2.1.1 Anatomia e Fisiologia Gástrica

O estômago é o órgão localizado abaixo do diafragma, entre o esôfago e o duodeno. Possui a capacidade de comportar em torno de dois litros de líquidos e alimentos devido a sua forma de saco e, anatomicamente, é dividido em três partes: a superior, chamada de fundo; a parte central, conhecida como corpo e a parte inferior, o antro (Figura 1) (SILVERTHORN, 2010; WILSON; STEVENSON, 2019).

Quanto à divisão histológica, o estômago está dividido em mucosa, camada de revestimento interno voltada para o lúmen; submucosa, camada de tecido conjuntivo composta por vaso sanguíneos e linfáticos; muscular externa, camada revestida por músculos lisos; a camada serosa, que consiste em uma continuação da membrana peritoneal (Figura 1) (SILVERTHORN, 2010; WILSON; STEVENSON, 2019) e em roedores de pequeno porte, utilizados nos ensaios não clínicos, como os ratos Wistar e camundongos Swiss, é observada uma porção não glandular, constituída por epitélio estratificado escamoso queratinizado (SHEH; FOX, 2013).

Figura 1- Divisão anatômica do estômago e elementos da mucosa gástrica.



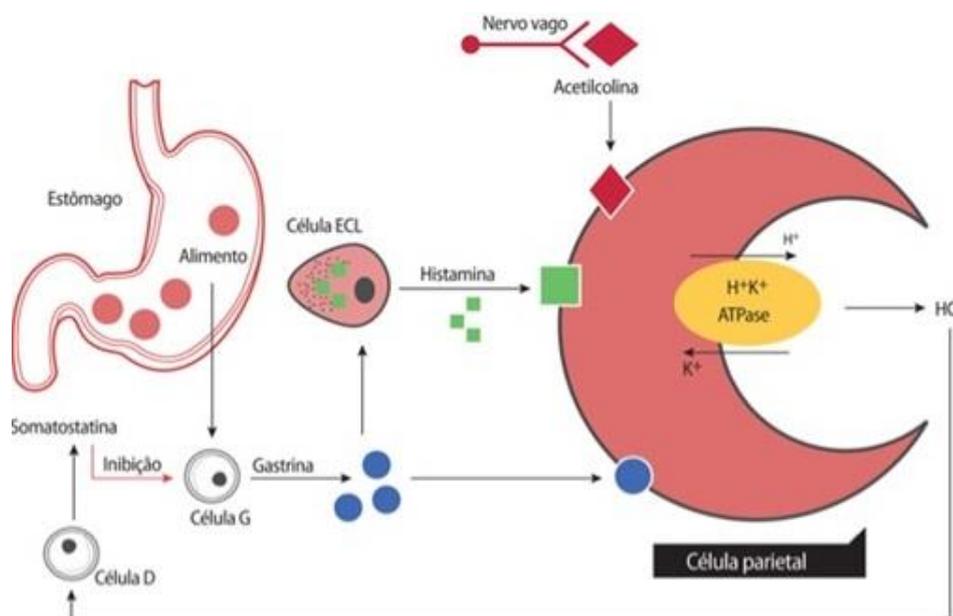
Fonte: Adaptada da Encyclopedia Britannica Almanac 2003.

A região da mucosa pode ser dividida em porção glandular cárdia, situada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior e composta por células secretoras

de muco gástrico; porção glandular oxíntica, que compreende desde o corpo até o fundo, abrangendo cerca de 80% do estômago, e possui as células parietais secretoras de ácido clorídrico, células principais produtoras de pepsinogênio, células D produtoras de somatostatina e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina; e a porção glandular pilórica, que está localizada na região antral do estômago e apresenta células parietais, células D, células enterocromafins e células G produtoras de gastrina (Figura 1) (RAMSAY; CARR, 2011; SCHUBERT, 2015).

No processo de digestão, as células parietais são reguladas por mecanismos químicos, mecânicos e neurais para a produção e secreção de ácido gástrico (SCHUBERT, 2016). Juntamente com o ácido, a pepsina, produto da conversão do pepsinogênio produzido pelas células principais, facilita a digestão (RAMSAY; CARR, 2011). As células G, durante o processo digestivo, secretam o hormônio gastrina, o qual pela via endócrina estimula as células parietais a secretarem ácido gástrico, através da ligação da gastrina ao receptor de colecistocinina 2 (CCK-2) e, indiretamente, por via receptor CCK-2 presente nas células ECL que liberam histamina (Figura 2) (SCHUBERT, 2016; WILSON; STEVENSON, 2019).

Figura 2- Modelo esquemático das interações celulares durante o processo digestivo.



Fonte: Fagundes Neto, 2014.

A histamina liberada pelas células ECL estimula através da via parácrina a célula parietal por meio da ligação aos receptores H₂ presentes na membrana basolateral destas células. A acetilcolina, histamina e gastrina estimulam a secreção de pepsinogênio, enquanto a somatostatina inibe a secreção desta proenzima. As células D, que secretam somatostatina, atuam na inibição da secreção de ácido gástrico diretamente sobre as células parietais e indiretamente mediante inibição da liberação de histamina pelas células ECL e por inibição da secreção de gastrina pelas células G (RAMSAY; CARR, 2011; SCHUBERT, 2016; WILSON; STEVENSON, 2019).

A atividade neuronal do estômago é realizada essencialmente pelo sistema nervoso entérico que se origina da crista neural e dá origem a dois plexos nervosos: o mioentérico de Auerbach e o submucoso de Meissner. O plexo de Auerbach é responsável pela inervação motora, sendo composto pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. Já o plexo de Meissner está localizado na camada muscular que circunda a submucosa e é responsável por modular as funções secretórias e o fluxo sanguíneo local (ROMERO-TRUJILLO *et al.*, 2012).

Contudo, o estômago possui grande importância fisiológica na digestão e absorção de substâncias e nutrientes, tais como o ferro, o cálcio e a vitamina B12, além de atuar na prevenção de infecções entéricas pelo controle do crescimento bacteriano e, de forma geral, participar da homeostase do organismo (SCHUBERT, 2014; DI MARIO; GONI, 2014; SCHUBERT, 2016).

2.1.2 Regulação da Secreção Ácida

A secreção de ácido gástrico corresponde à função mais importante do estômago, reunindo para este fim, diversos grupos celulares (SCHUBERT, 2015).

A célula parietal, secretora de ácido gástrico, possui uma membrana apical voltada para o lúmen gástrico, uma membrana basolateral voltada para o conteúdo intestinal e uma rede de canalículos que vão deste o lúmen até interior da célula. Quando estimulados pelo processo digestivo, os canalículos destas células promovem a secreção do H⁺ no lúmen gástrico, trocando-o por K⁺ e na membrana basolateral, o HCO₃⁻ é trocado principalmente por Cl⁻ (RAMSAY;

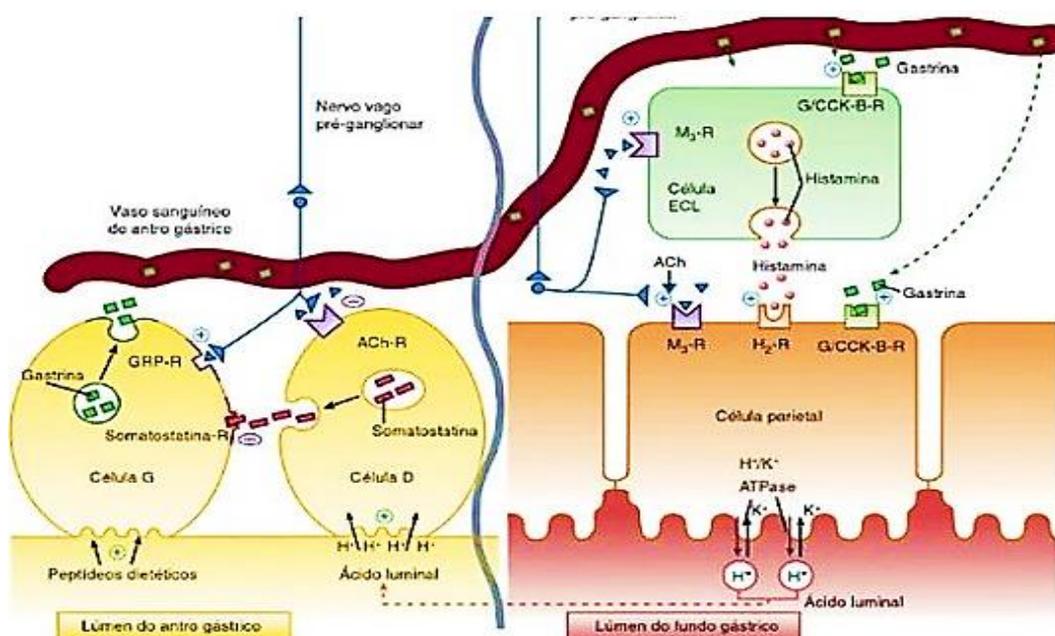
CARR, 2011; SCHUBERT, 2017).

A modulação da secreção ácida gástrica envolve mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos (SCHUBERT, 2016), através da interação de mediadores químicos, como a acetilcolina (neurócrina), histamina (parácrina) e gastrina (hormonal) com seus receptores específicos, muscarínico tipo 3 (M3), receptor histamínico do tipo H2 (H2) e colecistocinina (CCK2), respectivamente (SCHUBERT, 2011).

O controle da secreção ácida gástrica compreende um sistema amplo e complexo, podendo ser dividido em três fases, são elas: a fase cefálica, a fase gástrica e a fase intestinal. Na fase cefálica, ocorre o início da secreção de ácido clorídrico, mediada pelo nervo vago em resposta à estímulos visuais, olfatórios e gustativos (RAMSAY; CARR, 2011) (Figura 3).

A fase gástrica é marcada pelo aumento da secreção ácida por estímulo mecânico de distensão da parede estomacal, ocasionado pela chegada do alimento ao lúmen e, por sua vez, este estímulo ativa receptores de estiramento que intensificam a liberação de gastrina pelas células G presentes no antro, bem como, promove o aumento da distensão do fundo gástrico que amplia a secreção de ácido gástrico diretamente pela liberação de acetilcolina nas adjacências das células parietais e indiretamente pelo aumento da liberação de histamina e gastrina (RAMSAY; CARR, 2011) (Figura 3).

Figura 3- Modelo esquemático da regulação da secreção ácida.



Fonte: Katzung, 2014.

Legenda: H+: ácido; CCK-B: receptor de colecistocinina B; ACh: acetilcolina; Célula ECL: células do tipo enterocromafins; ATPase: bomba de prótons H⁺ /K⁺ -ATPase; M3-R: receptor muscarínico; GRP-R: Receptor do peptídeo de liberação de gastrina.

Na fase intestinal ocorre a diminuição da atividade secretora devido à chegada do quimo ao intestino delgado, que atua por meio da ação dos hormônios secretina e colecistoquinina no duodeno, suprimindo a secreção gástrica por estímulos nervosos no sistema nervoso entérico e também pela medula, que inibe os núcleos vagais e estimula os neurônios simpáticos a enviarem sinais inibitórios ao estômago (RAMSAY; CARR, 2011; FARRÉ; TACK, 2013; ARIN *et al.*, 2017).

2.1.3 Fatores Protetores da Mucosa Gástrica

O estômago dispõe de diversos mecanismos comprometidos em proteger e assegurar a integridade de sua mucosa (GALURA *et al.*, 2019). Estes mecanismos de proteção compreendem a renovação das células epiteliais, a secreção de muco, de bicarbonato, o aumento do fluxo sanguíneo, a inibição da secreção de ácido gástrico, a geração de prostaglandinas, de óxido nítrico e mecanismos antioxidantes (YANDRAPU; SAROSEIK, 2015; SANCHEZ-MENDONZA *et al.*, 2019).

A camada de muco está presente em todo o trato gastrointestinal e combinado ao bicarbonato formam a primeira linha de defesa (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Em especial o muco gástrico, secretado pelas células superficiais da mucosa gástrica, constitui um gel transparente composto por 95% de água e 5% de glicoproteínas e é atribuído ao seu aspecto viscoso, a capacidade citoprotetora (GALURA *et al.*, 2019). Além disso, suas glicoproteínas possuem a capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs), o que confere efeito antioxidante contra a ação deletéria de diversos agentes citotóxicos, como o etanol e AINEs (REPETTO; LLESEUY, 2002; ALLEN; FLEMSTRÖM, 2005; YANDRAPU; SAROSEIK, 2015).

O fluxo sanguíneo atua na proteção da mucosa gástrica por permitir o fornecimento de oxigênio, nutrientes, bicarbonato e por remover substâncias tóxicas (YANDRAPU; SAROSEIK, 2015). Além disso, também desempenha papel fundamental na cicatrização de úlceras gástricas por meio de microvasos

que garantem o aporte de oxigênio e conseqüentemente auxiliam o reparo tecidual (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001; TARNAWSKI; AHLUWALIA; MICHAEL, 2013).

As prostaglandinas são prostanoides produzidas a partir da transformação dos fosfolipídios de membrana pela ciclooxigenase, estão presentes ao longo do trato gastrointestinal e são capazes de se ligar a receptores EP, e assim desempenham funções específicas, como a regulação da secreção de ácido clorídrico, de muco e bicarbonato, além de serem responsáveis pelo controle da motilidade e manutenção da integridade da mucosa gástrica via aumento do fluxo sanguíneo local (TARNAWSKI; AHLUWALIA; MICHAEL, 2013; GALURA *et al.*, 2019).

O óxido nítrico (NO) constitui um mediador importante na proteção da mucosa gástrica. Em situações de aumento da secreção ácida, o NO estimula a síntese de prostaglandinas, as quais são responsáveis pela inibição da secreção de ácido e aumento da secreção de bicarbonato (TAKEUCHI *et al.*, 2011; KIM, 2014). Também é notável o papel do NO no aumento do fluxo sanguíneo e em sua habilidade de inibir a aderência dos neutrófilos às células endoteliais, fator crucial no processo inflamatório (SANTIN *et al.*, 2013; MAGIEROWSKI *et al.*, 2015; GALURA *et al.*, 2019).

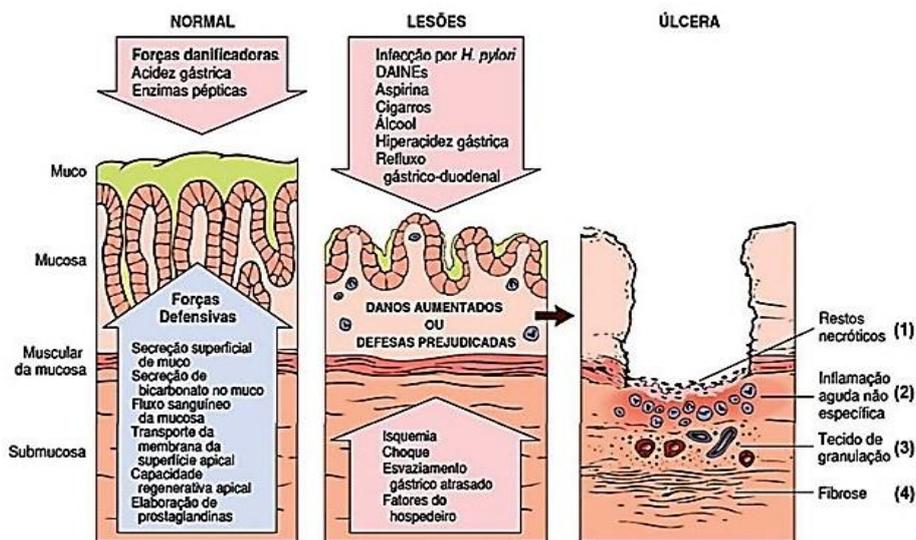
A proteção da mucosa gástrica também envolve agentes antioxidantes exógenos tais como vitaminas, flavonoides, carotenoides e outros agentes endógenos, como grupamentos sulfidrílicos, ácido úrico, glutathione reduzida (GSH) e as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST), que exercem função importante na atenuação dos efeitos do ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (KWIECIEN *et al.*, 2014; YANDRAPU; SAROSEIK, 2015; AL-HUSSIN; ALSAYED; YOUSIF, 2017; ALI *et al.*, 2020).

2.1.4 Etiologia e Farmacoterapia das Úlceras Gástricas

A doença ulcerosa constitui uma lesão benigna que pode ser definida como a formação de uma cavidade por ruptura da mucosa, seguida por acometimento da camada muscular, acompanhada de processo inflamatório (NAJM, 2011; BONAMIM *et al.*, 2014; HSIA *et al.*, 2018) (Figura 4). Estas lesões

afetam milhares de pessoas no mundo, predominantemente na faixa etária a partir dos 50 anos (KOMEN *et al.*, 2008; CASALI *et al.*, 2012).

Figura 4- Desequilíbrio entre os mecanismos de proteção e progressão da lesão gástrica.



Fonte: Turner, 2010.

A patogênese da úlcera gástrica consiste em um processo multifatorial (ROCHA *et al.*, 2010; RIOS *et al.*, 2010; KAVITT *et al.*, 2019), incluindo o aumento da secreção de ácido gástrico e pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão da produção de prostaglandinas endógenas, inibição do crescimento e proliferação celular da mucosa, alterações na motilidade gástrica, presença de agentes infecciosos e radicais livres, que podem estar agindo concomitantemente ou não na instauração das lesões (KANGWAN *et al.*, 2014; SZABO, 2014; PERICO *et al.*, 2020) (Figura 4).

A infecção por *H. pylori* é apontada como a principal causa infecciosa de lesão gástrica. Sua patogenia está relacionada à destruição das células epiteliais, dano ao DNA, indução de apoptose, produção e proliferação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (ALZHRANI *et al.*, 2014), além de induzirem o aumento da secreção ácida gástrica a nível de célula parietal ou ainda, por inibir os efeitos antissecretórios da somatostatina (BOLTIN; NIV, 2014; DATTA; ROYCHOUDHURY, 2015).

O uso prolongado de AINEs também é referido como uma das principais causas de danos ao tecido gástrico. Isto se deve à capacidade de inibição da

síntese das prostaglandinas, o que resulta na diminuição da secreção de muco e bicarbonato, na redução da microcirculação gástrica, aumento na peroxidação lipídica (KWIECIEN *et al.*, 2015), bem como, no aumento da produção de citocinas inflamatórias (KOIZUMI *et al.*, 2009). Em consequência, existem relatos de complicações gastrointestinais decorrentes do uso destes medicamentos, como hemorragias e úlceras pépticas, que podem ser potencializadas quando há associação com outros fatores de risco, tais como idade avançada, histórico prévio de injúria gastrointestinal e uso de anticoagulantes (GOLDSTEIN; CRYER, 2015).

A terapia empregada no tratamento das úlceras propõe diminuir os efeitos agressivos na mucosa gastrointestinais e aumentar sua resistência aos agentes lesivos. No início do século XX, esta terapia baseava-se no uso de antiácidos e na remoção do nervo vago, o que trazia muitas complicações. Entretanto, a conduta terapêutica sofreu grandes transformações desde os anos de 1970, incluindo a introdução de inibidores da bomba de prótons, antagonistas dos receptores H₂, agentes antibacterianos contra a *H. pylori* e protocolos endoscópicos para o tratamento de hemorragias (WANG *et al.*, 2010; KAVITT *et al.*, 2019).

Com o surgimento das primeiras evidências sobre a bomba de prótons em 1967 (FORTE; FORTE; SALTMAN, 1967), foi possível desenvolver uma classe de fármacos composta por omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol, esomeprazol, capaz de inibir o funcionamento efetivo desta bomba, ocasionando uma melhora no tratamento das úlceras gástricas. Estes medicamentos acumulam-se nos canalículos secretores de ácido e reagem por ligação covalente com o grupamento sulfidril da cisteína presente no domínio extracelular da bomba de prótons, promovendo assim, sua inibição prolongada por um período de 24 a 48 horas, pois a secreção só pode ser retomada com a síntese de novas moléculas da bomba (STRAND; KIM; PEURA, 2017).

O tratamento farmacológico baseado na redução da secreção ácida gástrica também é realizado com a utilização de antagonistas dos receptores histaminérgicos H₂, como a ranitidina (ONASANWO *et al.*, 2011). Porém, apenas a inibição da secreção ácida não é suficiente para o processo cicatricial da mucosa gástrica, sendo necessária a utilização de medicamentos que atuem na proteção, como a carbenoxolona, sucralfato, rebamipida e ecabete (BRUNTON;

CHABNER; KNOLLMANN., 2011).

Ainda que todos estes fármacos apresentem eficácia, existem alguns riscos e efeitos adversos, como no uso do citoprotetor misoprostol, que é restrito apenas ao ambiente hospitalar (BIGHETTI; ANTONIO; CARVALHO, 2002). Também no tratamento com antiácidos, estes fármacos ao proporcionarem seus efeitos, tornam o indivíduo propenso às infecções entéricas, complicações relacionadas à má absorção e câncer gástrico (POULSEN *et al.*, 2009).

Deste modo, é de grande importância a busca de novas estratégias terapêuticas, tendo como alternativa para o tratamento das doenças gástricas, o uso de produtos de origem natural (BADKE *et al.*, 2011).

2.2 Inovação no Setor Farmacêutico

O sistema de inovação consiste na elaboração de um produto, bem ou serviço novo, ou substancialmente aprimorado, podendo ser composto por um ou mais tipos de inovação, por exemplo, inovações de produto e de processo (OCDE, 2004). Deste modo, inovar é a principal força motriz para a geração de vantagens competitivas entre as empresas (CHESBROUGH, 2006).

A indústria farmacêutica, assim como os diversos segmentos produtores de bens e serviços, busca constantemente inovar, atuando na geração de conhecimentos técnico-científicos através de pesquisa e desenvolvimento (P&D), visando aprimorar sua cadeia produtiva (BASTOS, 2005).

De modo geral, as universidades estiveram comprometidas com ensino e com a criação de novos conhecimentos, já as empresas estiveram focadas na captação do conhecimento relevante advindo das pesquisas básicas, para inovar e gerar seus interesses (BRUNEEL; D'ESTE; SALTER, 2010). Entretanto, as indústrias farmacêuticas vêm assumindo papéis que antes eram exclusivos das universidades, tanto nas áreas de pesquisa básica, quanto na pesquisa aplicada (PARANHOS; PINTO, 2010).

A constante busca por inovação do setor farmacêutico é fundamentada pela diversidade e competência tecnológica nos ramos científicos da síntese química de moléculas orgânicas, da farmacologia e da biotecnologia, atrelada às crescentes demandas epidemiológicas dos séculos XX e XXI (PARANHOS; PINTO, 2010).

No Brasil, o mercado farmacêutico é comandado por grandes empresas privadas, no entanto, podemos destacar os laboratórios públicos Fiocruz e o Instituto Butantan que ocupam, respectivamente, as posições de 8º e 19º, no *ranking* dos maiores laboratórios do País (ANVISA, 2018). No estado de Pernambuco, também podemos destacar empresas públicas com potencial inovador, são elas: a Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás), que atua na produção de hemoderivados e produtos de tecnologia recombinante e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes S/A (Lafepe), destinado à produção de medicamentos estratégicos para o SUS (SANTOS, 2020).

Frequentemente, as empresas farmacêuticas brasileiras destacam-se no desenvolvimento de produtos de origem vegetal. Os fitoterápicos representam uma gama de oportunidades para o setor, tendo em vista a biodiversidade do país (COSTA; PARANHOS; VASCONCELLOS, 2013). Dois bons exemplos de sucesso deste seguimento são o Giamebil (*Mentha crispa*), medicamento indicado para giardíase e produto de uma pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e o Sanativo, uma combinação de plantas da Caatinga, utilizado como cicatrizante (SANTOS, 2020).

No entanto, apesar da biodiversidade e potencial tecnológico das pesquisas na área de fitoterápicos, o Brasil não tem conseguido efetivamente consolidar suas invenções através do sistema de patentes. Contudo, será por meio da valorização da educação, da ciência, da tecnologia e da capacidade individual de inovar que se alcançará o progresso do país no setor farmacêutico (SANTOS, 2020).

2.3 Considerações Botânicas

2.3.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae, também conhecida como “Spurge Family”, é constituída por mais de 800 espécies que estão distribuídas em mais de 300 gêneros, sendo, muitos dos seus membros, empregados no uso medicinal (VAN; BERRY, 2009; MWINE; DAMME, 2011).

É considerada uma família cosmopolita, tendo representantes espalhados por todo o mundo, porém, majoritariamente estão presentes em áreas de clima

tropical e subtropical, como na África Austral, onde é considerada a segunda maior família de árvores nativas (VAN; BERRY, 2009; MWINE; DAMME, 2011).

No Brasil, espécies de Euphorbiaceae ocorrem nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORA DO BRASIL, 2020), sua diversidade é relatada em levantamentos florísticos realizados no Nordeste, dos quais, podemos citar os dados de Lucena; Alves (2015), Oliveira (2013), Farias.; Medeiros; Riina (2016), Souza *et al.* (2016) que contabilizaram diversas espécies no bioma Caatinga e também os estudos de Alves *et al.* (2015), que contabilizaram 05 espécies em áreas remanescentes de Mata Atlântica.

Os membros da família Euphorbiaceae apresentam estrutura vegetal bastante heterogênea, variando de grandes árvores lenhosas, lianas trepadeiras, arbustos até ervas daninhas (CHAUHAN; SOOD, 2013). Suas espécies também podem dispor de flores e em geral, são reconhecidas pelo látex leitoso, que por muitas vezes exibem cores vibrantes e alta toxicidade, podendo causar irritações e erupções cutâneas quando em contato com a pele, cegueira quando em contato com os olhos e diarreia, quando ingerido (VAN; BERRY, 2009).

Em contrapartida, as plantas desta família apresentam nas folhas, caules, flores, casca, fruto e semente, diversos compostos com atividades biológicas reconhecidas, tais como terpenos, alcaloides, flavonoides, que conferem aroma e poder medicinal (MWINE; DAMME, 2011), sendo cerca de 150 espécies empregadas no uso cotidiano da população brasileira (TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

Economicamente, podemos destacar a espécie *Hevea brasiliensis* Muell. arg, nativa da Amazônia e importante produtora do látex utilizado na fabricação de borracha (CRUZ; PEREIRA; MENDONÇA, 2017), a *Manihot esculenta* Crantz, popular mandioca, que constitui papel essencial na alimentação humana e na fabricação de combustível pela indústria petrolífera (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001). Também merece destaque, a espécie *Ricinus communis* L., que tem sido utilizada para a produção do biodiesel no Brasil (ORLANDINI; LIMA, 2014).

Os gêneros mais representativos da família Euphorbiaceae são: *Phyllanthus*, *Acalypha*, *Macaranga*, *Antidesma*, *Drypetes*, *Tragia*, *Jatropha*,

Euphorbia L. e *Croton* (DUARTE; LAGE; FERREIRA, 2008), sendo estes, objetos de estudos para o desenvolvimento biotecnológico e de novos fitoterápicos com aplicações para uso humano, animal ou pesticida (OKIGBO; ANUAGASI; AMADI, 2009; MWINE; DAMME, 2011).

2.3.2 Gênero *Croton*

A palavra *Croton* advém do grego *crston*, que significa “carrapato” (*Ixodes ricinus* L.), uma alusão ao inseto devido à semelhança com as sementes das espécies do gênero (BENIGNI; CAPRA; CATTORINI, 1962).

O gênero *Croton* é o segundo maior representante da família Euphorbiaceae, possuindo aproximadamente 1250 espécies conhecidas, das quais, 68 podem ser encontradas no bioma brasileiro da Caatinga (SILVA *et al.*, 2010; COSTA FILHO *et al.*, 2012; CORDEIRO *et al.*, 2015). Várias destas espécies também têm desempenhado papel importante na medicina tradicional na África, Ásia e em toda América do Sul (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Os diversos membros do gênero *Croton* são reconhecidos por apresentarem atividade inseticida, larvicida, antimalárica, antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-helmíntica, moluscicida, antiinflamatória e antineoplásica. Além disso, as espécies de *Croton* são popularmente utilizadas no tratamento de problemas digestivos, diabetes, hipercolesterolemia, febre e dores (DORIA *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2013; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2013; OBEY *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2017; ALENCAR FILHO *et al.*, 2017; NJOYA; ELOFF; MCGAW, 2018; XU; LIU; LIANG, 2018).

Quanto ao perfil fitoquímico, o gênero apresenta diversos metabólitos secundários que incluem terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenoides), esteroides, alcaloides e outros compostos fenólicos, o que representa um significativo potencial econômico, tornando-o uma fonte para diversos estudos sobre compostos naturais bioativos (CAMURÇAVAS-CONCELOS *et al.*, 2007; DÓRIA *et al.*, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2013; XU; LIU; LIANG, 2018).

Esse gênero também possui um papel funcionalmente importante dentro

do ecossistema terrestre, pois muitas de suas espécies são responsáveis por colonizar áreas desmatadas como matas, beira de estradas e margem de rios, isto se deve principalmente à produção de flores e frutos durante a maior parte do ano, possibilitando a restauração de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008).

Geograficamente, o gênero possui uma significativa representação no Nordeste do Brasil. Em Pernambuco, sua maior incidência ocorre próxima ao litoral e na zona da mata, onde já foram demonstradas aproximadamente 35 espécies. Cerca de 50 municípios foram registrados com ocorrência do gênero e as principais espécies identificadas foram: *C. argyrophyloides* Muell. Arg.; *C. campestres* (St. Hil.) Muell Arg.; *C. floribundus* Spreng.; *C. glandulosus* L.; *C. grewioides* Baill.; *C. hirtus* L' Herit; *C. lobatus* L.; *C. micans* (Swattz emend) Muell. Arg.; *C. moritibensis* Baill.; *C. regnellianus* Muell. Arg.; *C. heliotropiifolius* Kunth.; *C. sellowii* Baill.; *C. sonderianus* Muell. Arg. e *C. zenhtneri* Pax & Hoffm (RANDAU *et al.*, 2004).

2.3.3 Espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth

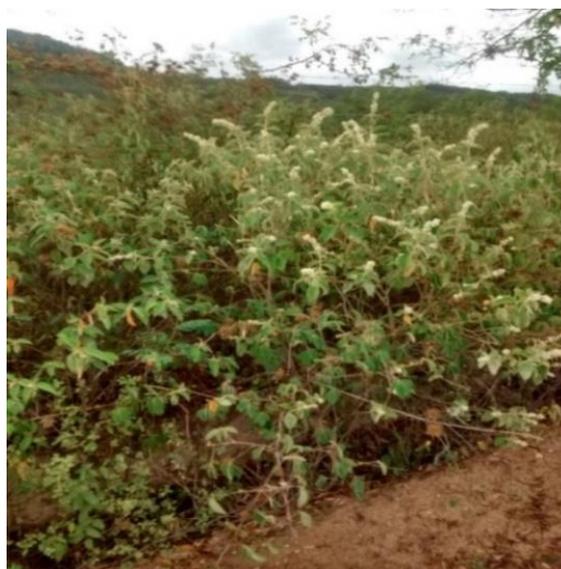
A espécie *C. heliotropiifolius*, popularmente conhecida como velame, velaminho e velame de cheiro, possui ampla distribuição na região Neotropical, podendo ser encontrada desde o Panamá até o Brasil (GOVAERTS *et al.* 2000). Em território brasileiro, estende-se do estado de Minas Gerais até a região Nordeste (LUCENA, 2000), ocorrendo predominantemente na vegetação da caatinga, brejos, restinga e cerrado (RANDAU *et al.*, 2004).

No noroeste do estado da Bahia, as chamadas dunas do Médio São Francisco, constituem um corredor de terreno arenoso e vegetação da Caatinga onde foram evidenciadas espécies da família Euphorbiaceae, bem como o *C. heliotropiifolius* (SÁTIRO; ROQUE, 2008). Em Pernambuco, a espécie pode ser encontrada em terrenos baldios, áreas de brejos de altitudes, mata atlântica, zona da mata e Caatinga (SILVA *et al.*, 2010). Sua presença também foi descrita nos estados do Rio Grande do Norte (ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010), Paraíba (TOLKE *et al.*, 2011) e Goiás (SODRÉ; SILVA; SALES, 2014).

O *C. heliotropiifolius* apresenta-se como subarbusto ou arbusto com até dois metros de altura, provido de látex incolor, creme ou avermelhado. Ramos cilíndricos, verdes a acinzentados. As folhas são alternas e ligeiramente

subopostas no ápice. As flores estão dispostas em inflorescências terminais e o fruto é uma cápsula oblonga a subglobosa. As sementes são elípticas a oblongas, com tegumento castanho a preto. (RANDAU *et al.*, 2004; SODRÉ; SILVA; SALES, 2014) (Figura 5).

Figura 5- Espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth.



Fonte: Silva *et al.*, 2017.

O emprego da espécie na medicina popular segue as potencialidades atribuídas ao gênero que pertence, onde, de um modo geral, seus representantes são frequentemente utilizados na forma de infusões ou chás para o alívio da dor (ABREU *et al.*, 2001), disfunções intestinais, no tratamento de diarreias, desordens digestivas, na cura de feridas e infecções (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Também é utilizada no tratamento de gripes, inflamações e dermatites (SARAIVA *et al.*, 2015).

O extrato seco do *C. heliotropiifolius* associado aos extratos de *Trichilia catiguá* e *Paullinia cupana Kunth* compõem a formulação mais recente da Catuama, medicamento psicoanaléptico ou estimulante, registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como um fitoterápico e comercializado pelo Laboratório Catarinense na forma de cápsulas ou como solução oral (LONGHINI *et al.*, 2017), entretanto, esta propriedade não tem sido mencionada nos trabalhos que relatam o uso popular da espécie.

O perfil fitoquímico do *C. heliotropiifolius* apresenta as principais classes

de compostos presentes em espécies do gênero *Croton* e da família Euphorbiaceae (SILVA *et al.*, 2017). Polifenóis como cumarinas estão ausentes na espécie, também são substâncias raras na família Euphorbiaceae e no gênero *Croton*, existindo apenas a constatação de escopoletina no *C. sonderianus* (CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982).

Investigações da composição química do óleo essencial extraído das folhas de *C. heliotropiifolius* exibiram α -pineno, sabineno, linalol, acetato de bornila, β -cariofileno, germacreno D, δ -cadineno, α -humuleno, biciclogermacreno, espatulenol e o eucaliptol como majoritário. Já no talo da espécie, foi verificada a presença de *p*-cimeno, α -pineno, eucaliptol, linalol, β -cariofileno e germacreno D semelhantes aos identificados nas folhas (SILVA; SALES, 2008; ANGÉLICO *et al.*, 2012).

Ainda sobre o óleo essencial, foi constatado efeito larvicida contra o *Aedes aegypti*, o que pode representar uma contribuição para métodos alternativos de controle do mosquito (DÓRIA *et al.*, 2010), bem como outras potencialidades, que vão desde boa atividade antioxidante (BRITO *et al.*, 2018), ação gastroprotetora (VIDAL *et al.*, 2017), capacidade antibacteriana (AVILÉS *et al.*, 2018) e antifúngica (BRITO *et al.*, 2018).

O potencial antifúngico contra *Candida albicans* e a atividade inibidora da acetilcolinesterase apresentados pelo extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius* foi descrito por Queiroz *et al.* (2014) e em seu estudo, houve a identificação do alcaloide taspine, composto retratado como um forte inibidor da acetilcolinesterase (ROLLINGER; LANGER; STUPPNER, 2006). A identificação de compostos inibidores da acetilcolinesterase pode explicar a atividade inseticida observada no óleo essencial desta planta (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

Magalhães *et al.* (2015) em seus estudos, relataram a capacidade repelente do óleo essencial da espécie contra *Tribolium castaneum*, o que constitui uma propriedade importante para o controle de pragas (COITINHO *et al.*, 2006).

Outra importante atividade da espécie foi descrita por Alencar Filho *et al.* (2017), que em suas investigações, constataram a capacidade antimicrobiana do *C. heliotropiifolius* contra cepas de *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*, o que pode justificar o uso popular da espécie no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal.

3 JUSTIFICATIVA

As úlceras gástricas são apontadas como umas das mais importantes patologias do sistema digestivo, ameaçando a economia mundial em razão da sua elevada taxa de morbidade e mortalidade (BUCCIARELLI *et al.*, 2010; RASHEED *et al.*, 2010).

Afetam cerca de 5 a 10% da população mundial, com uma incidência anual de 0,1 a 0,3%, o que equivale a aproximadamente 4 milhões de pessoas diagnosticadas a cada ano (ERCAN *et al.*, 2020). Entretanto, muitos casos são subnotificados devido à subjetividade dos sintomas e à semelhança clínica com outras doenças que também apresentam manifestações dispépticas (HAVENS *et al.*, 2018; SIDAHMED *et al.*, 2019; WOOLF; ROSE, 2020), fazendo com que os dados epidemiológicos existentes não representem de maneira fidedigna a situação real, que possivelmente seja ainda mais grave (VALLE, 2015; LEOW *et al.*, 2016; LANAS; CHAN, 2017).

Portanto, é de suma importância o incentivo às investigações e desenvolvimento de terapias alternativas, como a utilização de produtos naturais, para o tratamento das úlceras gástricas, considerando a escassez de reconhecimento das espécies com esse potencial (SANTIN *et al.*, 2010). Especialmente aqui no Brasil, apenas a *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart possuem registro como produto fitoterápico para este fim na 2ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2021).

Deste modo, o uso tradicional e os conhecimentos populares sobre a capacidade terapêutica de certas espécies de plantas fundamentam a sua utilização como alternativa medicamentosa em diversas doenças. No entanto, preconiza-se que sejam realizados estudos de validação das potencialidades dos vegetais na medicina, cumprindo a exigência da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), Nº 48, de 16 de março de 2004, da ANVISA.

Assim, associamos a experiência do nosso grupo de pesquisa, que vem se dedicando ao estudo da patogênese de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, com trabalhos já publicados, como os de Almeida *et al.* (2017) e o de Barbosa *et al.* (2019), com a necessidade de novos agentes gastroprotetores eficazes, menos tóxicos e de baixo custo, somando à falta de

dados na literatura que demonstrem a capacidade gastroprotetora da espécie *C. heliotropiifolius* já referida pela população, fomos assim, movidos à realização desta pesquisa.

Contudo, avaliando o desempenho do *C. heliotropiifolius* nos modelos de lesão gástrica experimental, desejamos fornecer informações científicas que assegurem seu uso racional pela população e, desta forma, acreditamos que a espécie em estudo possa ser uma ferramenta farmacológica útil nos tratamentos futuros contra as úlceras gástricas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante *in vitro* dos extratos das folhas *C. heliotropiifolius*, bem como o seu efeito gastroprotetor em modelos de úlcera experimental *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos orgânicos das folhas de *C. heliotropiifolius*;
- Identificar e quantificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microrganismos obtidos da coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE;
- Determinar a atividade anti-*Helicobacter pilory* dos extratos das folhas de *C. heliotropiifolius*;
- Pesquisar *in vitro* a capacidade antioxidante dos extratos de *C. heliotropiifolius*;
- Analisar o efeito citotóxico *in vitro* e tóxico agudo *in vivo* dos extratos de *C. heliotropiifolius*;
- Determinar a ação gastroprotetora dos extratos de *C. heliotropiifolius* em modelos de lesão gástrica induzida por etanol e por anti-inflamatório não esteroide;
- Quantificar as concentrações dos parâmetros antioxidantes e anti-inflamatórios de óxido nítrico (NO), glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO) do tecido estomacal de animais tratados com os extratos de *C. heliotropiifolius*;
- Investigar *in vivo* o possível envolvimento do óxido nítrico como mecanismo de ação gastroprotetora do extrato etanólico *C. heliotropiifolius*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Material Vegetal

A espécie *C. heliotropiifolius* (Euphorbiaceae) foi coletada em abril de 2019, na área rural do Município de Garanhuns, Pernambuco – Brasil (8°54'13.8"S 36°27'53.6"W). A identificação botânica foi realizada pelo pesquisador Fernando Gallindo do Herbário Dárdano de Andrade Lima - Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), onde uma exsicata foi depositada sob o número de catálogo 93034 (**Anexo A**).

5.1.2 Microrganismos

A maioria dos microrganismos utilizados foram obtidos da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sendo duas cepas gram-positivas: *Bacillus subtilis* (UFPE 86), *Staphylococcus aureus* (UFPE 01) e três gram-negativas: *Acinetobacter baumannii* (UFPE 1025-B), *Enterobacter aerogenes* (UFPE 348) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPE 416). A cepa de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) foi disponibilizada pelo Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo.

5.1.3 Linhagem Celular

Foi utilizada a linhagem celular de fibroblasto de camundongo (L929), que permaneceu em meio de cultura *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina), em estufa a 37 °C com atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

5.1.4 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, pesando aproximadamente 25-30 g, e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com aproximadamente 250-280 g. Todos os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Campus Recife, Pernambuco, Brasil.

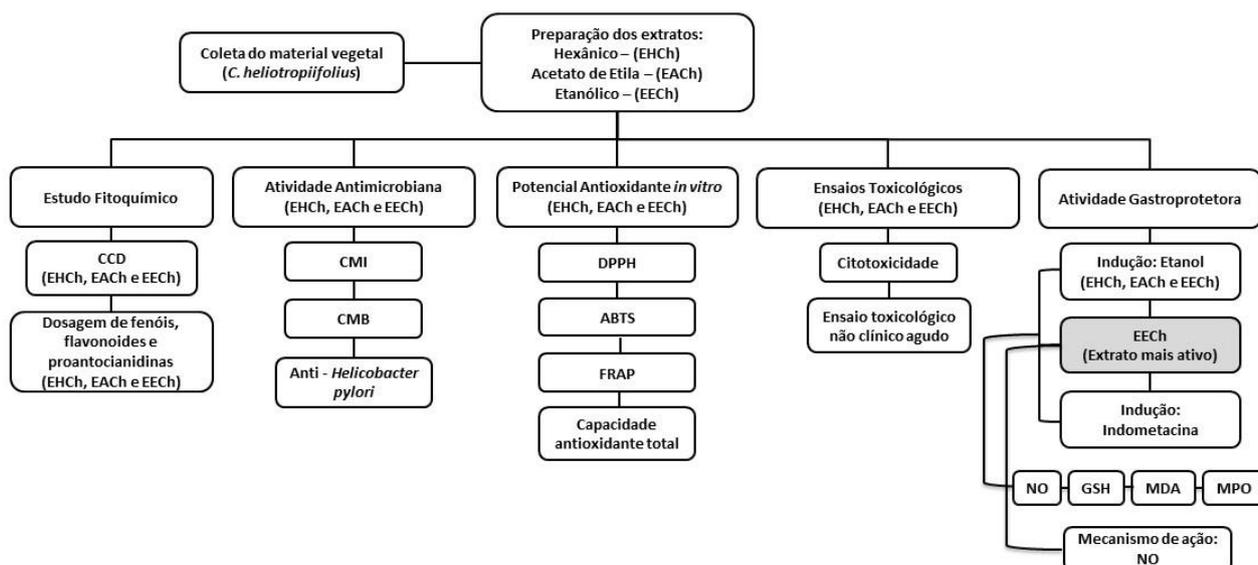
Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com no máximo 6 animais, em temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Presence, Brasil) e água *ad libitum*.

Em todos os métodos, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico: cetamina 5% (0,2 mL/100g + sobredose 0,2 mL/100g) e xilazina 2% (0,1 mL/100g + sobredose 0,1 mL/100g) por via intraperitoneal (i.p.). Os procedimentos experimentais *in vivo* tiveram a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE com o processo nº 135/2019 (**Anexo B**).

5.2 Métodos

Os métodos utilizados neste estudo foram realizados conforme o fluxograma experimental apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma experimental.



Fonte: Autora. Legenda: CCD: cromatografia em camada delgada, GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, CMI: concentração mínima inibitória, CMB: concentração mínima bactericida, DPPH: 2,2-difenil1-picrilhidrazil, ABTS: 2,2-azobis-(3-witilbenzotiazolina-6-sulfonato e FRAP: Atividade redutora do íon férrico. NO: óxido nítrico, GSH: glutationa reduzida, MDA: malondialdeído, MPO: mieloperoxidase.

5.2.1 Preparação dos Extratos

As folhas coletadas de *C. heliotropiifolius* foram expostas à secagem em estufa (40 °C), trituradas em moinho de facas e 100 g foram submetidas à extração por maceração em hexano (1 L), acetato de etila (1 L) e etanol (1 L),

com troca de solvente a cada 72 horas, seguida por mudança de solvente conforme polaridade crescente. Posteriormente, o conteúdo da extração foi filtrado e submetido ao evaporador rotativo para a obtenção dos extratos: hexânico (EHCh), acetato (EACH) e etanólico (EECh).

O rendimento total de cada extrato foi calculado de acordo com a fórmula: $Re = (P_{ext}/P_s) \times 100$. Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato bruto; P_s = Peso seco das folhas. Todo procedimento foi realizado no Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX), do Departamento de Antibióticos, UFPE.

5.2.2 Estudo Fitoquímico

5.2.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos EHCh, EACH e EECh foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada, a fim de identificar a presença das principais classes de metabólitos secundários. Na análise, os extratos foram pesados e dissolvidos em metanol para obtenção da concentração final de 5 mg/mL. Como fases fixas foram utilizadas placas de sílica gel F₂₅₄ e os padrões, sistemas de eluição e reveladores químicos específicos estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Sistemas e reveladores cromatográficos.

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ácido clorogênico	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27 v/v)	NEU	Wagner; Bladt, 1996 Brasseur; Angenot, 1986
Triterpenos e esteroides	β -sitosterol	Tolueno:AcOEt (90:10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno:AcOEt (97:3 v/v)	Anisalaldeído sulfúrico	Harborne, 1998

Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt- HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11: 27 v/v)	Dragendorff	Wagner; Bladt, 1996
Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	Catequina	AcOEt- HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11: 27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts <i>et al.</i> , 1957

Fonte: Autora. Legenda: NEU: ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol.

5.2.2.2 Dosagem de Fenóis Totais

As dosagens de compostos fenólicos presentes nos extratos de *C. heliotropiifolius* foram determinadas por meio da metodologia proposta por Li *et al.* (2008), com modificações.

Os extratos EHCh, ECh e EECh (1 mg/mL), separadamente, foram adicionados em tubos de ensaios contendo 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v) e permaneceram em repouso protegidos da luz por 3 minutos. Em seguida, 0,8 mL de carbonato de sódio 7,5% foram adicionados e incubados durante 120 minutos em ambiente escuro. Posteriormente, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda = 765$ nm. O ácido gálico (0– 500 mg/mL) foi utilizado para a calibração da curva padrão. O ensaio ocorreu em triplicata e os resultados foram expressos em miligramas equivalente de ácido gálico (mg EAG)/g de extrato.

5.2.2.3 Dosagem de Flavonoides

A técnica descrita por Pekal; Pyrzyńska (2014), com algumas modificações, foi utilizada para estimar nos EHCh, ECh e EECh o conteúdo de flavonoides. Inicialmente, 100 μ L das amostras, do branco (solvente utilizado para diluir as amostras) e das concentrações de quercetina foram adicionados a 0,05 mL do reagente cloreto de alumínio (2%) e 0,05 mL de acetato de sódio (1M). Foi feito um branco para todas as amostras (0,1 mL de amostra + 0,1 mL de água destilada), a fim de subtrair o valor das absorbâncias das amostras diluídas, para evitar falsos positivos. As amostras foram agitadas vigorosamente e posteriormente mantidas à temperatura ambiente durante 10 minutos. A

absorbância das amostras foi medida a 425 nm. O teor total de flavonoides nos extratos foi expresso como equivalente a quercetina (mg EQ/g de extrato).

5.2.2.4 Dosagem de Proantocianidinas

A concentração de proantocianidinas foi estimada de acordo com Sun; Ricardo-da-Silva; Spranger (1998) com algumas modificações. Primeiramente, 40 µL das amostras, do branco (solvente utilizado para diluir as amostras) e das concentrações de catequina foram adicionados a 0,1 mL de vanilina (1%, p/v, diluída em metanol) e 0,1 mL de ácido sulfúrico (20%, v/v, diluída em metanol). Foi feito um branco para todas as amostras, onde se adicionou metanol no lugar da vanilina. As amostras foram incubadas a 30 °C durante 10 minutos, e então, as absorbâncias foram medidas a 500 nm. O teor total de proantocianidina nos extratos foi expresso em termos de equivalente de catequina (mg EC/g de extrato).

5.2.3 Atividade Antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), seguindo a metodologia proposta pelo NCCLS (2003). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI), do Departamento de Antibióticos da UFPE e as atividades anti-*Helicobacter pylori* e inibição da urease foram realizadas em parceria com o Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Espírito Santo.

5.2.3.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os extratos EHCh, EACH e EECh, com concentração inicial de 30 mg/mL, foram adicionados à placa de 96 poços contendo meio de cultura caldo Mueller Hinton – HIMEDIA®, e em seguida, uma suspensão microbiana na concentração $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, que correspondente a 0,5 da escala de McFarland, foi adicionada na placa. Posteriormente, a placa foi incubada por 24 horas a fim de determinar a CMI. Para melhor visualização do crescimento bacteriano, foi adicionado resazurina (0,01 mg/mL) a todos os

poços, seguido de incubação por 1 hora e posterior leitura das placas (STOPPA *et. al.*, 2009).

5.2.3.2 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Para a determinação da CMB foi repicada uma alíquota das concentrações que apresentaram atividade na CMI. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e foi considerada como bactericida a menor concentração do extrato onde não houve crescimento sobre a superfície do Ágar Mueller Hinton.

5.2.3.3 Atividade Anti-*Helicobacter pylori*

A atividade anti-*Helicobacter pylori* (ATCC 43504) foi avaliada determinando a concentração inibitória mínima dos extratos EHCh, EACCh e EECh, por meio do método espectrofotométrico de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório (THOLEN *et al.*, 2003).

Em microplacas de 96 poços, cada poço foi preenchido com 100 µL de meio de crescimento líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), contendo infusão de cérebro e coração suplementada com 10% de soro fetal bovino e diferentes concentrações dos extratos (64-1024 µg/mL). Após as colônias bacterianas serem adicionadas, as microplacas foram então incubadas a 36-37 ° C na presença de CO₂ a 10%, durante 72 horas e em seguida, a absorbância foi lida num espectrofotômetro ($\lambda = 620 \text{ nm}$). O teste foi realizado em triplicata.

A CIM foi determinada graficamente e foi definida como a menor concentração de agente antibacteriano em que houve queda acentuada (90%) na absorbância. A amoxicilina (0,065 - 4 µg/mL) foi utilizada como fármaco padrão.

Após a leitura espectrofotométrica, foram realizadas as determinações da CBM. Com auxílio de hastes estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de ágar sangue. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas sob condição de microaerofilia. Depois da incubação, as placas foram analisadas quanto ao crescimento ou não das colônias bacterianas.

5.2.3.4 Ensaio de Inibição da Urease

A atividade inibidora de urease pelos extratos EHCh, EACCh e EECh foi determinada quantificando a amônia produzida através da hidrólise da ureia catalisada por urease, de acordo com o método descrito por Tanaka *et al.*, 2003.

Foram adicionados 25 µL de urease de 4 UI (urease de 55 feijão, tipo III, Sigma-Aldrich) e 25 µL da amostra em diferentes concentrações (32 – 1024 µg/mL) a uma microplaca de 96 poços e incubados durante 2 horas à temperatura ambiente. O ácido bórico foi usado como padrão. A inibição percentual foi calculada com a equação $(1 - \text{amostra ABS} / \text{controle ABS}) \times 100$, onde o ABS é a absorbância.

5.2.4 Atividade Antioxidante *in vitro*

5.2.4.1 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH

Neste ensaio, a atividade sequestradora de radical livre dos extratos foi medida em termos de doação de hidrogênio, com a utilização do radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) (BRAND-WILLIAMS, 1995 com modificações). Foram misturados 250 µL da solução de DPPH (1 mM) a 40 µL de diferentes concentrações (5, 10, 20, 50, 100, 200 e 500 µg/mL) dos extratos EHCh, EACCh e EECh, em triplicata. Após 30 minutos, sob proteção da luz, foi medida a absorbância com comprimento de onda de 517 nm. A quercetina foi utilizada como referência. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula:

$$\frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

5.2.4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de ABTS, foi utilizada a metodologia descrita por Re *et al.* (1999). Inicialmente, o radical ABTS^{•+} (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi formado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas (tempo necessário para a formação do radical). Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma absorbância de 0,70 (± 0,01) a 734 nm.

Posteriormente, foram adicionados 30 μL de diferentes concentrações dos extratos (100 a 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) EHCh, ECh e EECh em 3 mL da solução contendo o radical ABTS e determinou-se a absorbância da solução em comprimento de onda de 734 nm. A quercetina foi utilizada como referência, as leituras foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição oxidativa, conforme a equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

5.2.4.3 Atividade Redutora do Íon Férrico (FRAP)

O ensaio de FRAP foi realizado segundo Benzie; Strain (1996), com algumas modificações. A solução estoque foi preparada com 300 mM de tampão acetato em pH 3,6, 10 mM de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina solubilizado em 40 mM de HCl, e 20 mM de solução de FeCl_3 . A solução de trabalho foi preparada no momento do experimento, misturando 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL de TPTZ e 2,5 mL FeCl_3 (10:1:1) e incubando por 5 min a 37 °C. Dez microlitros dos extratos EHCh, ECh e EECh (1mg/mL), foram misturados com 290 μL do reagente de FRAP e deixados em repouso por 15 minutos a 37 °C no escuro. Posteriormente as absorbâncias foram medidas à 593 nm. A quercetina foi utilizada como referência e uma curva padrão com Trolox (0 – 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi realizada a fim de expressar os resultados em mg equivalente de Trolox / g de extrato.

5.2.4.4 Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante total (CAT) foi medida segundo Pietro; Pineda; Aguilar (1999). 100 μL dos extratos EHCh, ECh e EECh diluídos na concentração de 1 mg/mL foram misturados a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). As amostras foram incubadas em 95°C por 90 minutos. Após voltarem a temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 100 μL do solvente

utilizado para diluir as amostras). A quercetina foi utilizada como referência e a CAT foi expressa em relação ao padrão ácido ascórbico (100% de atividade), calculada pela fórmula:

$$\text{CAT (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do padrão} - \text{Absorbância do branco}} \times 100$$

5.2.5 Ensaio Toxicológicos

5.2.5.1 Atividade Citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica dos EHCh, ECh e EECh foi realizada através do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN; FONG, 1983; ALLEY *et al.*, 1988). Este método é baseado na mensuração da atividade mitocondrial, através da clivagem do anel do sal tetrazólio pela enzima succinildesidrogenase existente nas células. Durante essa quebra, ocorre a conversão da solução amarela do MTT em cristais de formazan púrpura. Dessa forma, somente células vivas realizam essa redução, enquanto células mortas ou com algum tipo de dano, não conseguem reagir com a solução.

As células L929 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida, os extratos dissolvidos em DMSO foram adicionados aos poços na concentração final de 50 µg/mL. Após 72 horas de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL), e depois de 3 horas de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. O experimento ocorreu em triplicata e a viabilidade celular expressa com a porcentagem de inibição em relação ao controle, designado como 100%. A doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como fármaco padrão.

5.2.5.2 Ensaio Toxicológico Não Clínico Agudo

O estudo de toxicidade aguda foi realizado em camundongos Swiss fêmeas e seguiu as determinações descritas na OECD nº423 (2001).

Os camundongos foram separados em 4 grupos e receberam os

tratamentos por via oral – gavage (v.o.) com: EHCh (2000 mg/kg); ECh (2000 mg/kg); EECh (2000 mg/kg) e solução aquosa de Tween 20 a 1% (controle). Após os tratamentos, os animais foram observados nas quatro primeiras horas e depois a cada 24 horas durante 14 dias, a fim de observar alterações comportamentais, na disposição geral, no sistema motor, e em atividades do sistema nervoso central e autônomo (**Anexo C**) (KUMAR *et al.*, 2017). Também foram avaliados padrões fisiológicos, através do consumo de água, de alimento e a variação de massa corporal.

No 14º dia, após a última observação dos parâmetros fisiológicos, os animais foram submetidos a um jejum de 4 horas e anestesiados com cetamina/xilazina para a coleta de sangue por punção cardíaca destinada à realização de exames hematológicos e bioquímicos. Os hemogramas foram realizados no contador hematológico ABX Pentra XL 80 Details – HORIBA e as dosagens dos parâmetros bioquímicos foram realizadas no equipamento Metrolab 2300 PLUS (Wiener lab) pertencentes ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UEPB. Os animais foram eutanasiados e seus órgãos dissecados (pulmão, coração, rins, baço, fígado e estômago), pesados e examinados macroscopicamente. O experimento foi repetido (n =3 fêmeas), para obter um número final de 6 animais por grupo, conforme recomendado pela OECD.

5.2.6 Atividade Gastroprotetora

5.2.6.1 Lesão Gástrica Aguda Induzida por Etanol Absoluto

Os animais (ratos Wistar, n = 6/grupo) foram submetidos a jejum de 12 horas, com o auxílio de grades de jejum, e em seguida, foram tratados por via oral, conforme a seguinte separação dos grupos: G1 - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%), G2 - lansoprazol (30 mg/kg), G3 - 50 mg/kg, G4 - 100 mg/kg e G5 - 200 mg/kg dos EHCh, ECh e EECh. O grupo *sham*, controle sadio, recebeu solução aquosa de Tween 20 1%, mas não sofreu indução da lesão.

Após 1 hora do tratamento, foi induzida a lesão gástrica nos demais grupos com a administração de etanol absoluto (4 mL/kg v.o.), transcorrida 1

hora da indução, os ratos foram eutanasiados (MORIMOTO *et al.*, 1991 com modificações).

Posteriormente, os estômagos foram dissecados, abertos pela grande curvatura e fotografados. As lesões gástricas foram medidas através da imagem computadorizada, com o auxílio do *software ImageJ* (RASBAND, 1997). Os resultados foram expressos em percentual de lesão ulcerativa (%) em relação à área total da mucosa gástrica. O percentual de área de lesão foi calculado conforme a equação a seguir:

$$(\%) = \frac{\text{Área ulcerada}}{\text{Área total}} \times 100$$

A porção glandular do estômago foi pesada e armazenada sob a temperatura de -80°C para posterior quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO), glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO).

5.2.6.2 Lesão Gástrica Aguda Induzida por Indometacina (AINE)

Os animais (ratos Wistar, n = 6/grupo), permaneceram em jejum por 12 horas, com o auxílio de grades de jejum, e posteriormente foram tratados por via oral, conforme a seguinte separação dos grupos: G1 - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%), G2 - ranitidina (60 mg/kg), G3 - 50 mg/kg, G4 - 100 mg/kg e G5 - 200 mg/kg do EHCh, por ser o extrato mais ativo no ensaio anterior. O grupo *sham*, controle sadio, recebeu solução aquosa de Tween 20 1%, mas não sofreu indução da lesão.

Decorrida 1 hora do pré-tratamento, os animais receberam indometacina 30 mg/kg como agente lesivo por via subcutânea (s.c.) e 6 horas após a indução da lesão, os ratos foram eutanasiados (DJAHANGURI, 1969 modificado).

Posteriormente, os estômagos foram dissecados, abertos pela grande curvatura, fotografados e as lesões gástricas foram medidas através da imagem computadorizada, com o auxílio do *Software ImageJ* (RASBAND, 1997). Os resultados foram expressos em área total de lesão ulcerativa (ALU) (mm²). A

porção glandular do estômago foi pesada e armazenada sob a temperatura de -80°C para posterior quantificação dos níveis de NO, GSH, MDA e MPO.

5.2.6.3 *Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica*

Amostras das porções lesionadas dos estômagos pelo etanol absoluto e pela indometacina foram preservadas por 24 horas em formalina a 10% tamponada. Logo após, as amostras foram lavadas em água, imersas em álcool etílico 70% durante 3 - 4 dias e incluídas em parafina. Os cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo e submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Eclipse E200 com câmera modelo HD Lite 1080P acoplada.

5.2.6.4 *Determinação dos Níveis de NO*

Para a determinação da concentração de NO, foi preparado o homogenato da região glandular dos estômagos (1 mL/100 g de tecido) em tampão fosfato 150 mM (pH 7,4). Uma alíquota de 200 µL dos homogenatos foi centrifugada (11000 rpm, 15 minuto, 4 °C). Após centrifugação, 100 µL de sobrenadante foram coletados e a produção indireta de óxido nítrico determinada através da reação de Griess. Foi incubado 100 µL do sobrenadante com 100 µL do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ 5 %/ N-(-1-naftil)-etilenodiamina 0,1 %/ H₃PO₄ 5%/ diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm.

A concentração de nitrito de sódio (NaNO₂) foi determinada a partir de uma curva padrão, para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO₂, dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10 µM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,312 µM. Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1981).

5.2.6.5 *Determinação dos Níveis de GSH*

A determinação da concentração da GSH baseou-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), com o tiol

livre, originando um dissulfeto misto mais o ácido 2-nitro-5-tiobenzoico.

Para a quantificação de GSH, a porção glandular dos estômagos foi homogeneizada em EDTA 0,02 M (1 mL/100 g de tecido). Uma solução composta por 40 µL do homogenato, 50 µL de água destilada e 10 µL de ácido tricloroacético 50% foi agitada e centrifugada a 5000 rpm/15 min/4 °C. Em seguida, foi recolhido 60 µL do sobrenadante e acrescido 25 µL de tampão Tris 0,4 M e mais 20 µL de DTNB 0,01 M e após 1 minuto da reação, a leitura da coloração foi realizada a 412 nm em leitor de microplacas.

A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH por g de tecido, tendo por base uma curva padrão, construída a partir da solução padrão de GSH (1 mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

5.2.6.6 *Determinação dos Níveis de MDA*

O grau de peroxidação lipídica na região glandular dos estômagos foi estimado pela determinação dos níveis de malondialdeído através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando o método descrito por Draper, e Hadley, (1990), com algumas modificações.

Os tecidos foram homogeneizados (1 mL/ 100 g de tecido) em tampão fosfato 150 µM (pH 7,4). Após homogeneização, 63 µL do homogenato foi adicionado em microtubos, seguido da adição de 100 µL de ácido perclórico a 35%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, 150 µL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos microtubos e adicionado 50 µL de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. A mistura foi levada ao banho de água fervente (95°C/30 min). Após as amostras esfriarem, foram colocadas em placa de 96 poços e a leitura foi realizada em um leitor de microplacas com comprimento de 535 nm.

A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em micromol de MDA/mg de tecido.

5.2.6.7 *Determinação dos Níveis de MPO*

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada segundo protocolo descrito por Bradley *et al.* (1982). Para isto, os estômagos (porção glandular)

foram homogeneizados (1 mL/100 g de tecido) em solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM.

Em seguida, o homogenato foi centrifugado em 8300 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. 10 µL do sobrenadante foi adicionado a placa de 96 poços e na hora da leitura, foi adicionado 200 µL da solução de reação (cloridrato de o-dionisidina - 0,167 mg/mL, tampão fosfato de sódio 50 mM, e peróxido de hidrogênio 0,0005%). Após a incubação, a reação foi lida em leitor de microplacas com o comprimento de onda de 450 nm, durante cinco minutos, a variação do primeiro e do quinto minuto foram consideradas. Os resultados foram expressos como unidade de mieloperoxidase por miligrama de tecido (UMPO/mg de tecido).

5.2.6.8 Avaliação do Envolvimento do Óxido Nítrico como Possível Mecanismo de Ação da Atividade Gastroprotetora

Após o jejum de 12 horas, os ratos (n= 6) foram divididos em 6 grupos conforme o pré-tratamento: 3 grupos receberam veículo (solução aquosa de Tween 20 1% v.o.) e 3 grupos receberam N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (70 mg/kg i.p.), um agente bloqueador inespecífico da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). Decorridos 30 minutos do pré-tratamento, cada três grupos foram tratados com o veículo, carbenoxolona (100 mg/kg v.o.) e com a melhor dose do EECh (100 mg/kg v.o.), respectivamente.

Após uma hora do tratamento, todos os grupos receberam o agente lesivo (etanol absoluto, 4 mL/kg v.o.) (MATSUDA, H., LI, Y., YOSHIKAWA, M.). Transcorrida mais uma hora, os animais foram eutanasiados, os estômagos dissecados, abertos pela grande curvatura e fotografados, as lesões gástricas foram medidas através da imagem computadorizada, com o auxílio do *Software ImageJ* (RASBAND, 1997). Os resultados foram expressos percentual de lesão ulcerativa (%) em relação à área total da mucosa gástrica.

5.3 Análise Estatística

Todos os dados numéricos deste estudo foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, a fim de analisar se são paramétricos ou não paramétricos.

Posteriormente, os resultados foram expressos como valores de média \pm desvio padrão (D.P.) e avaliados por meio da análise de Variância (*one-way ANOVA*), seguido do teste *Bonferroni* para o ensaio de citotoxicidade e *Tukey* para os demais modelos experimentais. Para verificar a diferença estatística entre os grupos bloqueados e não bloqueados, na avaliação da participação do óxido nítrico como mecanismo de ação gastroprotetor, foi utilizado o teste “t” de Student.

O *software* utilizado foi *GraphPad Prism* (versão 8.0, San Diego, CA, EUA) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Preparação dos Extratos

Os extratos EHCh, EACCh e EECh apresentaram rendimentos de 4,30, 2,20 e 3,42% em relação à massa seca das folhas de *C. heliotropiifolius*, respectivamente.

A utilização do método de extração por maceração para produtos vegetais, em geral, proporciona baixos rendimentos (BUCAR *et al.*, 2013), como pode ser visto em nosso trabalho. A realização de repetidas extrações com o mesmo solvente pode aumentar a captação de metabólitos secundários. Esta medida foi cuidadosamente realizada em nosso processo extrativo.

Uma vantagem associada à seleção da técnica de maceração como processo extrativo, é que a mesma evita a degradação de compostos termolábeis existentes em extratos vegetais, pois o processo ocorre em temperatura ambiente (SEIDEL *et al.*, 2006).

6.2 Estudo Fitoquímico

6.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

A análise dos extratos por cromatografia em camada delgada possibilitou a identificação de flavonoides, triterpenos, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, proantocianidinas e leucoantocianidinas. Saponinas, antocianinas, antocianidinas, fenilpropanoides, alcaloides e taninos hidrolisáveis não foram identificados neste estudo (Tabela 2).

Tabela 2- Classes de metabólitos secundários encontradas nos extratos das folhas de *C. heliotropifolius*.

Classe de metabólitos secundários	EHCh	EACH	EECh
Saponinas	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
Antocianinas e antocianidinas	-	-	-
Fenilpropanoides	-	-	-
Triterpenos e esteroides	+	++	++
Mono e sesquiterpenos	++	++	++
Alcaloides	-	-	-
Proantocianidinas e leucoantocianidinas	+	+	+
Taninos hidrolisáveis	-	-	-

Fonte: Autora. Legenda: (+++) forte; (++) médio; (+) fraco; (-) ausente; (tr) traços.

O gênero *Croton* é rico em compostos bioativos, o que desperta interesse de pesquisadores comprometidos com a investigação da constituição química de suas diversas espécies (SANTOS *et al.*, 2010).

Metabólitos secundários da classe dos fenóis e flavonoides são relatados no gênero, tal como neste trabalho e também na espécie *Croton schiedeanus* (CHIAPPE *et al.*, 2013). Esta classe de compostos desempenha diversas funções biológicas, compreendendo a eliminação de radicais livres e ação anti-inflamatória (SUHARTONO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013), o que pode justificar o uso popular das espécies do gênero no tratamento de feridas, nas inflamações e em problemas intestinais (SARAIVA *et al.*, 2015).

Estudos com *Croton zehntneri* e *Croton sacaquinha* Benth também relataram a presença de terpenos (mono e sesquiterpenos) na sua composição (LOPES *et al.*, 2003; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Estes compostos apresentam importante potencial biológico, sendo associados à boa atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, inseticida e antifúngica (SHIVAKUMAR *et al.*, 2017; APPELHANS *et al.*, 2018; ALLEVATO *et al.*, 2019).

Os taninos são compostos fenólicos divididos em dois grandes grupos de acordo com sua estrutura química, são eles: os taninos hidrossolúveis e os taninos condensados ou proantocianidinas (MONTEIRO *et al.*, 2005). As proantocianidinas estão relacionadas às propriedades antioxidantes, além de

atuarem na diminuição da glicemia e na melhora de complicações do diabetes, como neuropatia, retinopatia e nefropatia (DE LA IGLESIA *et al.*, 2010). Gomes e Bandeira (2012) relataram a presença de proantocianidinas nas raízes e folhas do *C. heliotropiifolius*, deste modo, nossos dados corroboram com este trabalho.

Quanto aos taninos hidrossolúveis, embora tenham sido identificados na espécie *C. heliotropiifolius* (SILVA *et al.*, 2017), nesta análise não foi possível a sua constatação. Esta variação pode estar relacionada à biossíntese dos metabólitos secundários, que são ativados durante momentos específicos do crescimento e desenvolvimento do vegetal, ou, ainda, em situações de estresse, causadas, por exemplo, em limitações nutricionais ou ataques de microrganismos (SANTOS, 2010).

Saponinas estiveram ausentes nos extratos em estudo, bem como na investigação de Cunha *et al.* (2014) com o *Croton linearifolius*. Os alcaloides também estiveram ausentes nas análises, assim como é relatado em estudo descritivo da família Euphorbiaceae (ESPADERO *et al.*, 2019).

Antocianinas, antocianidinas e fenilpropanoides não foram identificados neste estudo, apesar de existirem relatos da presença destes compostos no gênero *Croton* (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

6.2.2 Dosagem de Fenóis Totais, Flavonoides e Proantocianidinas

A classe de compostos fenólicos constitui uma categoria integrada por substâncias diversas e amplamente distribuídas na natureza, sendo reconhecida pelo seu potencial antioxidante de doar elétrons ou hidrogênio, além da capacidade de seus radicais intermediários estáveis impedirem a oxidação lipídica (PINCHUK *et al.*, 2012).

Os extratos EHCh, ECh e EECh apresentaram valores médios de fenóis totais de 25,80; 95,34 e 72,69 mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de extrato, respectivamente. Na dosagem de flavonoides, o EHCh e o EECh apresentaram valores de 15,5 e 33,0 mg equivalente de quercetina (EQT)/g de extrato (Tabela 3). Quanto ao ECh, não foi possível mensurar o teor de flavonoides, isto pode ser atribuído aos baixos níveis destes compostos presentes no extrato.

Na dosagem de proantocianidinas, os extratos EHCh, ECh e EECh apresentaram concentrações inferiores ao limite mínimo mensurável na curva de

catequina, e por este motivo, não foram apresentados.

Estes resultados estão em concordância com os apresentados na análise cromatográfica.

Tabela 3- Teor de fenóis totais e flavonoides presentes nos extratos das folhas de *C. heliotropifolius*.

Extratos	Fenóis Totais (mg EAG/g) ± D.P.	Flavonoides (mg EQ/g) ± D.P.
EHCh	25,80 ±1,28	15,51 ±1,40
ECh	95,34 ± 3,21	-
EECh	72,69 ±1,55	33,00 ± 0,96

Fonte: Autora. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3).

6.2 Atividade Antibacteriana

6.3.1 Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida

A atividade antibacteriana dos extratos EHCh, ECh e EECh, frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, apresentou valores de CMI e CMB distribuídos na Tabela 4.

Tabela 4- Resultados da CMI e CMB dos extratos de *C. heliotropifolius*.

Microrganismos	CMI (µg/mL)			CMB (µg/mL)		
	EHCh	ECh	EECh	EHCh	ECh	EECh
<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86)	930	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 01)	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000	>1.000
<i>Acinetobacter baumannii</i> (UFPEDA 1025-B)	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000
<i>Enterobacter aerogenes</i> (UFPEDA 348)	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000

Fonte: Autora.

Na determinação da CMI e CMB dos extratos, nas condições testadas, apenas o EHCh foi ativo contra o *Bacillus subtilis* e inativo para as demais bactérias.

Segundo à literatura, valores de CIM e CMB inferiores a 100 µg/mL são considerados com boa atividade antimicrobiana, de 100 a 500 µg/mL moderada; de 500 a 1000 µg/mL, fraca e acima de 1000 µg/mL, inativa (AYRES *et al.*, 2008). O ECh e o EECh apresentaram inatividade antibacteriana contra as cepas testadas.

Araújo *et al.* (2017), em seu trabalho com o óleo essencial de *C. heliotropiifolius*, também identificaram capacidade inibitória contra cepas de *Bacillus subtilis*.

A ação antibacteriana de extratos da espécie *C. heliotropiifolius* é pouco mencionada na literatura. No entanto, Alencar Filho *et al.* (2017), em seu estudo, relataram o potencial da espécie contra cepas de *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*, o que pode fundamentar o seu uso popular no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal. Da mesma forma, Queiroz *et al.* (2014) descreveram a capacidade antifúngica da espécie, contra cepas de *Candida albicans*.

6.3.2 Atividade Anti-*Helicobacter pylori* e Ensaio de Inibição da Urease

A bactéria *H. pylori* é considerada um dos principais agentes etiológicos da gastrite, infecção mais comum na espécie humana (ERHART, 2000; PIMANOV; MAKARENKO, 2008), que acomete mais de 80% da população de países em desenvolvimento (KUSTERS; VAN VLIET; KUIPERS, 2006).

A atividade anti- *H. pylori* dos extratos EHCh, ECh e EECh, avaliada por meio da CMI e da CBM, e a capacidade de inibição da enzima urease estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5- Valores da atividade anti- *H. pylori* e da capacidade de inibição da enzima urease.

Extratos/Controle	CMI/CMB (µg/mL)	Inibição da urease
EHCh	Não inibiu/ Não inibiu	Não inibiu
ECh	Não inibiu/ Não inibiu	Não inibiu

EECh	1024/sem CBM	Não inibiu
Amoxicilina	0,156/ -	-

Fonte: Autora.

Os extratos EHCh e ECh não apresentaram inibição frente a *H. pylori*. O extrato EECh, mesmo promovendo inibição na concentração de 1024 µg/mL, é considerado como inativo, tendo em vista que valores de CIM e CMB acima de 1000 µg/mL são associados à inatividade (AYRES *et al.*, 2008). A amoxicilina, usada como padrão, apresentou CMI de 0,156 µg/mL.

O tratamento contra a *H. pylori* tem uma taxa de insucesso de cerca de 20%, sendo este percentual relacionado aos problemas de adesão e continuidade ao tratamento, bem como devido à constante resistência aos antimicrobianos (AYALA *et al.*, 2014). Esta capacidade de gerar resistência pode estar relacionada ao potencial de escape contra os tratamentos e contra o sistema imune, levando à persistência da infecção (ALLEN *et al.*, 2005).

Nenhum dos extratos apresentou inibição frente à urease. Esta enzima constitui 6% do total de proteínas sintetizadas pela *H. pylori*, e promove a manutenção do pH neutro no interior da bactéria, fator decisivo para a permanência do microrganismo em meio à acidez gástrica (JENKS, PJ; KUSTERS, JG, 2000; WEEKS, DL; SACHS, G, 2001).

Apesar dos resultados preliminares não demonstrarem boas ações contra os microrganismos testados, especialmente frente aos que possuem tropismo pelo trato gastrointestinal, isso não enfraquece as potencialidades da espécie, como é possível constatar nas próximas etapas.

6.3 Atividade Antioxidante *in vitro*

6.4.1 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de DPPH

O ensaio que utiliza o radical DPPH na avaliação da capacidade antioxidante consiste em uma técnica rápida, eficiente, simples e econômica. Este método é capaz de mensurar a atividade sequestradora de radicais livres de amostras vegetais em diferentes sistemas de solventes, tanto em soluções aquosas como em solventes orgânicos apolares, e desta forma, facilita a extração de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005;

SENDRA; SENTANDREU; NAVARRO, 2006; KHALED-KHOUDJAA; BOULEKBACHE-MAKHLOUF; MADANI, 2014).

Para expressar a atividade antioxidante pelo método de DPPH, geralmente utiliza-se o índice de atividade antioxidante (%), que corresponde à porcentagem de redução do radical e a concentração inibitória (CI_{50}). A CI_{50} se refere à quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%. Assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007). Os valores de redução do DPPH (%) e da CI_{50} dos extratos e do controle encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6- Atividade antioxidante dos extratos de *C. heliotropiifolius* por sequestro de DPPH.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Redução do DPPH (%)			
	EHCh	EACH	EECh	Quercetina
5	2,24 \pm 0,04	0,53 \pm 0,01	7,25 \pm 0,06	-
10	3,21 \pm 0,02	1,39 \pm 0,01	14,97 \pm 0,09	-
20	3,32 \pm 0,01	2,14 \pm 0,02	21,81 \pm 0,04	-
50	7,49 \pm 0,04	6,63 \pm 0,05	50,58 \pm 0,05	-
100	11,23 \pm 0,02	11,66 \pm 0,01	73,90 \pm 0,05	-
200	26,20 \pm 0,01	25,45 \pm 0,03	81,39 \pm 0,02	-
500	65,13 \pm 0,03	48,98 \pm 0,07	83,74 \pm 0,09	-
CI_{50}	416,18 $\mu\text{g/mL}$	501,00 $\mu\text{g/mL}$	49,43 $\mu\text{g/mL}$	20,80 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Autora. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

O EHCh e o EACH apresentaram baixa atividade antioxidante, porém o EECh exibiu uma atividade significativa, visto que valores de $CI_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$ são relacionados à boa atividade antioxidante, já CI_{50} entre 65 e 152 $\mu\text{g/mL}$ são considerados como atividade intermediária e acima de 152 $\mu\text{g/mL}$, como baixa atividade antioxidante (MELO *et al.*, 2010). A quercetina, utilizada como antioxidante padrão, apresentou uma $CI_{50} = 20,80 \mu\text{g/mL}$.

6.4.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de ABTS

O método de avaliação da capacidade neutralizadora do radical ABTS pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática e, por meio deste ensaio, é possível analisar a atividade de compostos tanto de natureza hidrofílica como lipofílica (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Os percentuais de inibição do radical ABTS pelos extratos e seus respectivos valores de CI_{50} estão apresentados na Tabela 7. A quercetina, antioxidante padrão, apresentou CI_{50} de 52,17 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 7- Atividade antioxidante dos extratos de *C. heliotropiifolius* por sequestro de ABTS.

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Percentual de Inibição (%)			
	EHCh	EACH	EECh	Quercetina
100	3,48 \pm 0,64	3,10 \pm 0,07	25,11 \pm 0,64	-
200	4,79 \pm 0,89	3,77 \pm 0,48	34,52 \pm 1,94	-
300	10,56 \pm 0,13	6,02 \pm 1,29	43,03 \pm 1,49	-
400	11,15 \pm 0,29	10,18 \pm 0,55	57,42 \pm 0,83	-
500	19,55 \pm 0,32	10,43 \pm 0,55	58,57 \pm 3,13	-
1.000	19,93 \pm 0,70	12,81 \pm 0,63	88,32 \pm 2,00	-
2.000	30,53 \pm 0,38	30,97 \pm 0,77	89,74 \pm 2,29	-
4.000	31,34 \pm 1,36	60,21 \pm 1,62	92,28 \pm 0,58	-
CI_{50}	>1000 $\mu\text{g/mL}$	>1000 $\mu\text{g/mL}$	397,50 $\mu\text{g/mL}$	52,17 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Autora. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

O efeito antioxidante do *C. heliotropiifolius* também foi referido por Silva Brito *et al.* (2018) em seus estudos com o extrato metanólico das folhas e do caule dessa espécie, no qual obteve valores de IC_{50} de 314 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de folhas e IC_{50} de 398 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato do caule, no ensaio ABTS. Tais resultados são semelhantes aos obtidos em nossa investigação com o extrato EECh.

A capacidade antioxidante natural de vegetais está associada a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos, como hidrofílicos e carotenoides, como lipofílicos. Os compostos fenólicos, por serem doadores de hidrogênio, possuem ação antioxidante devido à capacidade de reagir de forma enérgica

com o radical ABTS (KUSKOSKI *et al*, 2005). Esta classe de metabólitos foi identificada na composição química dos nossos extratos e pode estar relacionada aos índices de atividade antioxidante observados neste teste.

6.4.3 Atividade Redutora do Íon Férrico (FRAP)

O ensaio de FRAP baseia-se no mecanismo de transferências de elétrons, a fim de reduzir o complexo de ferro férrico tripiridiltiazina (Fe^{+3} -TPTZ) ao complexo de ferro ferroso tripiridiltiazina (Fe^{+2} -TPTZ) (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

Os extratos EHCh, ECh e EECh apresentaram valores médios de redução de íons férricos de 143,62; 307,85 e 723,62 mmol Equivalente de Trolox (ET)/g de extrato, respectivamente e a quercetina, usada como padrão, apresentou 551,57 mmol (ET)/g (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade antioxidante dos extratos de *C. heliotropifolius* por redução de íons férricos.

Extratos	mmol Equivalente de Trolox (ET)/g da amostra
EHCh	143,62 ± 13,60
ECh	307,85 ± 6,57
EECh	723,62 ± 9,62
Quercetina	551,57 ± 17,49

Fonte: Autora. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Em geral, o método de FRAP é empregado principalmente na determinação da capacidade antioxidante de produtos vegetais ricos em compostos fenólicos e, em virtude da capacidade redox do Fe^{+3} -TPTZ e do radical ABTS, os compostos antioxidante tendem a reagir de forma similar em ambos os ensaios (WU, X. *et al*, 2004; RAMADAN; MOERSEL, 2006; SZYDŁOWSKA-CZERNIAK *et al.*, 2008). Este comportamento pode ser observado neste estudo, onde o EECh exibiu os melhores índices de atividade antioxidante e atividade superior ao antioxidante padrão no método FRAP.

6.4.4 Capacidade Antioxidante Total

O ensaio que avalia a capacidade antioxidante total é um método quantitativo que se baseia na redução de Mo (VI) à Mo (V) com formação de um complexo de fosfato de molibdênio, Mo (V). Tanto a atividade antioxidante total (ATT), quanto a redução do íon férrico (FRAP) representam metodologias que utilizam reações de redução de íons metálicos (SHABBIR *et al.*, 2013).

Os extratos EHCh, ECh e EECh apresentaram valores médios de atividade antioxidante total 13, 51; 22, 24 e 55,63 %, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9- Atividade antioxidante total dos extratos de *C. heliotropiifolius*.

Extratos	Atividade antioxidante total (%) ± D.P.
EHCh	13, 51 ± 0,81
ECh	22, 24 ± 4,26
EECh	55,63 ± 2,28
Quercetina	62,40 ± 1,90

Fonte: Autora. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3).

Estes resultados apresentaram concordância entre os ensaios testados, tendo o EECh mostrado os melhores índices de atividade antioxidante.

Contudo, pesquisas afirmam que não existe um ensaio único capaz de avaliar o potencial antioxidante de forma quantitativa e com precisão (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005), o que ampara a nossa utilização de métodos diferentes na investigação da capacidade antioxidante.

6.5 Ensaio Toxicológicos

6.5.1 Atividade Citotóxica

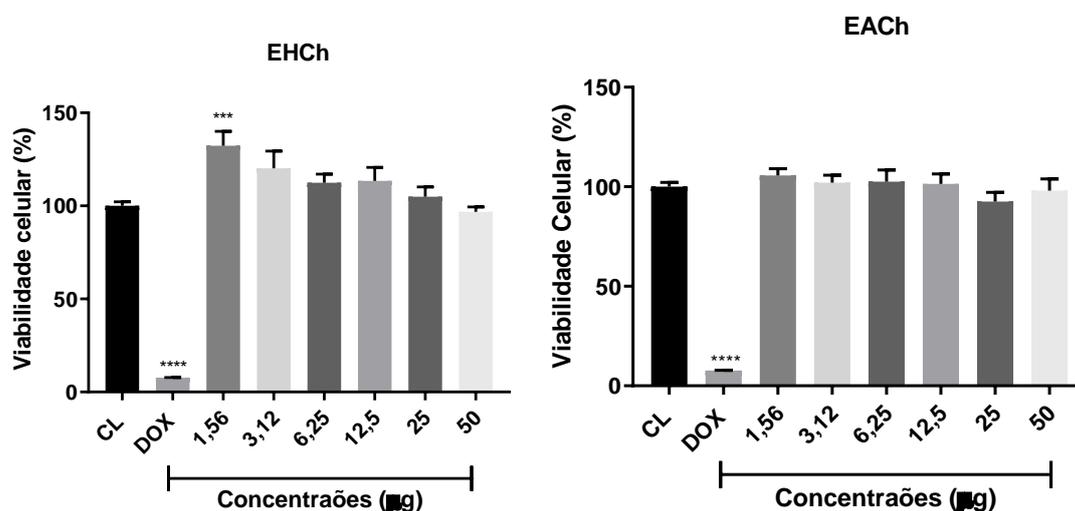
A capacidade citotóxica consiste na habilidade de substâncias influenciarem os mecanismos de quimiotaxia ou quimiorrepulsão em células, através da ação direta de agentes tóxicos, como compostos químicos, ou de maneira indireta, ao influenciar células em um determinado meio extracelular (ALBERTS, 2004). O ensaio que avalia a citotoxicidade usando o MTT é um

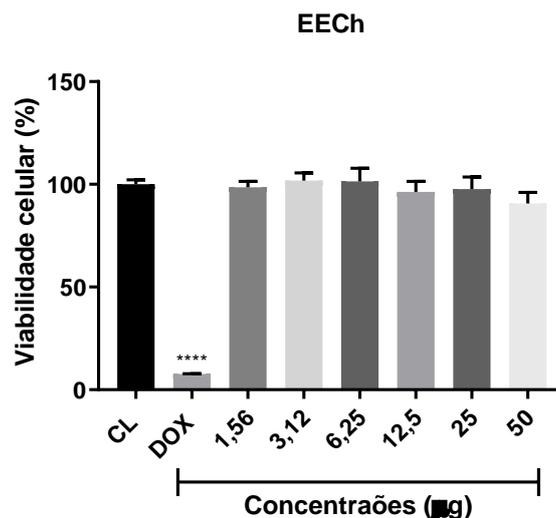
teste laboratorial colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular, também podendo ser usado para medir a citotoxicidade de um potencial agente medicamentoso ou de outros materiais tóxicos (TANG *et al.*, 2007).

A avaliação do potencial citotóxico dos extratos EHCh, ECh e EECh não apresentou, nas condições testadas, morte celular significativa na linhagem L929. Os índices de viabilidade celular (%) não diferiram estatisticamente dos controles, tendo apenas a concentração de 1,56 µg do EHCh apresentado um aumento na concentração celular, com $p < 0,001$ de significância ao controle, o que consiste em um indicativo de proliferação. Os grupos doxorrubicina (Dox), padrão de inibição celular, também apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparados ao controle (Figura 7).

O comportamento proliferativo visto no extrato EHCh, pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos na sua composição química, pois é reconhecido que estes compostos oriundos dos vegetais podem realizar atividade imunomoduladora e estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos (AGYARE *et al.*, 2011).

Figura 7- Percentual de Viabilidade celular da linhagem de fibroblastos de camundongo (L929) submetidas aos EHCh, ECh e EECh.





Fonte: Autora. Legenda: CL-controle negativo, DOX- doxorubicina (5 µg/mL). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de *Bonferroni*, onde *** $p < 0,001$ vs CL e **** $p < 0,0001$ vs CL.

A ausência de citotoxicidade do *C. heliotropiifolius* frente a linhagens celulares, também é relatada no estudo realizado por Silva *et al.* (2017) com o extrato metanólico de folhas da espécie.

6.5.2 Ensaio Toxicológico Não Clínico Agudo

A toxicidade constitui a capacidade de uma substância causar dano aos organismos vivos em função da concentração e da duração da exposição (ALAEZ-VERSON *et al.*, 2011).

Neste teste, não foram observadas mortes nem alterações no sistema nervoso central ou autônomo dos animais tratados com dose única de 2.000 mg/kg dos extratos EHCh, ECh e EECh. De acordo com as recomendações do *Guideline* 423, o teste foi repetido ($n=3$), nas mesmas condições, para todos os grupos e novamente não houve óbitos. Assim, os extratos de *C. heliotropiifolius* estão classificados na categoria 5 (substância com DL_{50} superior a 2000 mg/kg) do *Guideline* 423 (OECD, 2001).

Com relação ao consumo de ração e ganho de massa corporal, foi verificado que os extratos não promoveram variações significativas, porém, o EHCh foi capaz de promover diferença estatística no consumo de água quando comparado ao controle (##### $p < 0,0001$) e aos demais extratos (** $p < 0,001$ e

**** $p < 0,0001$) (Tabela 10). A regulação do consumo de água está intimamente relacionada a eliminação de eletrólitos e resíduos metabólicos (SILVA *et al.*, 2016), no entanto, alterações isoladas nesta variável, sem o comprometimento dos outros índices ponderais, não são capazes de atestar uma possível toxicidade.

Tabela 10- Efeito da administração oral de EHCh, ECh, EECh e solução aquosa de Tween 20 1% (controle) no consumo de água, ração e ganho de massa corporal dos camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	Controle	EHCh	ECh	EECh
Consumo de água (mL)	29,93 ±3,22	24,21 ±2,72####	28,79 ±2,29****	28,64 ±1,55***
Consumo de ração (g)	19,57 ± 2,17	18,79 ±2,00	18,43 ±1,82	18,57 ±1,82
Ganho de massa Corporal (g)	4,33 ±0,52	4,83 ±0,41	5,33 ±0,58	5,17 ±0,75

Fonte: Autora. Legenda: Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde *** $p < 0,001$ vs EHCh, **** $p < 0,0001$ vs EHCh e #### $p < 0,0001$ vs controle.

As características macroscópicas dos órgãos, juntamente com a massa constituem indicadores fisiológicos importantes, pois refletem alterações metabólicas causadas por substâncias tóxicas (VAGHASIYA; SHUKLA; CHANDA, 2011). Entretanto, nesta investigação, estes parâmetros não sofreram alterações significativas quando comparados ao controle, exceto a massa do estômago dos animais tratados com ECh e com EECh (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$), ainda assim, estas alterações isoladamente não configuram toxicidade (Tabela 11).

Tabela 11- Efeito da administração oral de EHCh, ECh, EECh e solução aquosa de Tween 20 1% (controle) na massa dos órgãos dos camundongos fêmeas.

Órgãos	Massa dos Órgãos (g)			
	Controle	EHCh	ECh	EECh
Pulmões	0,378 ±0,01	0,350 ±0,03	0,345 ±0,02	0,360 ±0,06
Coração	0,268 ±0,01	0,271 ±0,02	0,302 ± 0,02	0,263 ±0,03
Rins	0,499 ±0,02	0,528 ±0,02	0,530 ±0,04	0,542 ± 0,04
Baço	0,317 ±0,02	0,270 ±0,06	0,303 ±0,03	0,345 ±0,04

Fígado	2,430 ±0,02	2,208 ±0,43	2,003 ±0,16	2,047 ±0,11
Estômago	0,350 ±0,02	0,419 ±0,03	0,462 ±0,01**	0,507 ±0,04***

Fonte: Autora. Legenda: Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, comparado com o grupo controle (solução aquosa de Tween 20 1%) (n= 6), onde **p<0,01 vs controle e ***p<0,001 vs controle.

A investigação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos refletem possíveis alterações do sangue, funções hepática e renal, sendo indicativos ou não de toxicidade por extratos vegetais (KUMAR *et al.*, 2017). Nestas análises, não foram identificadas diferenças significativas nestes parâmetros nos grupos tratados com os extratos, quando comparados ao grupo controle (Tabela 11 e 13).

Tabela 12- Efeito da administração oral de EHCh, ECh, EECh e solução aquosa de Tween 20 1% (controle) nos parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas.

Parâmetros	Controle	EHCh	ECh	EECh
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	8,53 ±0,40	7,86 ±0,50	8,00 ±0,21	7,85 ±0,53
Hemoglobina (g/dL)	12,82 ±1,12	12,57±1,74	13,40 ±0,17	12,71 ±1,42
Hematócrito (%)	37,92 ±4,92	36,63 ± 5,40	38,90 ±0,36	36,98 ±5,81
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	873,30 ±61,77	797,70 ±49,03	819,00 ±55,51	841,50 ±56,79
Leucócitos Totais (10 ⁶ /mm ³)	5,033 ±0,33	5,150 ±0,36	4,633 ±0,16	4,733 ±0,17
Neutrófilos (10 ³ /mm ³)	7,50 ±1,05	8,33 ±0,82	8,67 ±0,58	7,33 ±0,52
Linfócitos (10 ³ /mm ³)	77,83 ± 6,68	83,33 ±4,18	84,67 ±3,51	84,67 ±4,68
Monócitos (10 ³ /mm ³)	5,67 ± 0,82	6,50 ±0,55	5,33 ±0,58	6,50 ±0,55
Eosinófilos (10 ³ /mm ³)	1,67 ±0,82	1,83 ±0,75	3,00 ±1,00	1,50 ± 0,55

Fonte: Autora. Legenda: Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, comparado com o grupo controle (solução aquosa de Tween 20 1%) (n= 6).

Tabela 13- Efeito da administração oral de EHCh, ECh, EECh e solução aquosa de Tween 20 1% (controle) nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas.

Parâmetros (mg/dL)	Controle	EHCh	ECh	EECh
AST/ TGO	241,20 ±22,14	240,80 ±18,43	327,30 ±20,79	281,80 ±27,19
ALT/ TGP	68,33 ±7,99	61,67 ±9,79	65,33 ±4,51	62,60 ±4,69
Ureia	39,50 ±4,08	45,33 ±3,79	49,00 ±4,00	49,33 ±2,25
Creatinina	0,54 ±0,08	0,52 ±0,07	0,49 ±0,08	0,49 ±0,09
Ácido Úrico	4,30 ±0,50	4,87 ±0,51	4,80 ±0,65	4,97 ±0,83

Fonte: Autora. Legenda: Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, comparado com o grupo controle (solução aquosa de Tween 20 1%) (n= 6).

Na avaliação do potencial tóxico agudo não clínico, os indicadores de toxicidade sistêmica são definidos considerando a redução do desenvolvimento ponderal e da massa corporal dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON 1999; RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002). Outros indicadores de toxicidade são expressos através de alterações hematológicas, bioquímicas e na massa relativa dos órgãos (GONZALEZ; SILVA 2003). Tais alterações não foram observadas neste estudo. Deste modo, é possível inferir que esta espécie vegetal é segura para ensaios posteriores que avaliam sua ação gastroprotetora.

6.6 Atividade Gastroprotetora

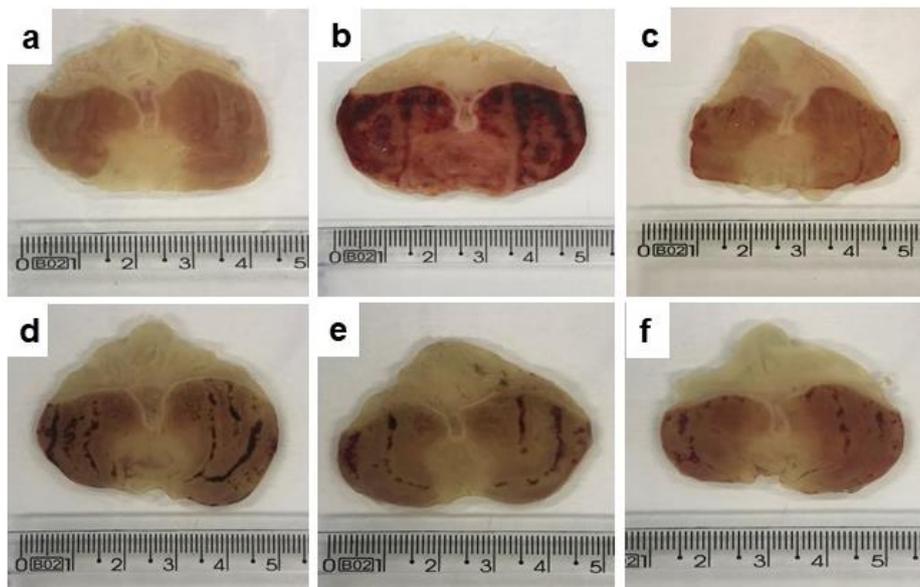
6.6.1 Lesão Gástrica Aguda Induzida por Etanol Absoluto

O modelo animal em que utiliza o etanol como agente indutor de úlcera gástrica é muito útil na seleção de substâncias antiulcerogênicas, pois seu mecanismo causador do dano tecidual tem caráter multifatorial, sendo capaz de atuar no aumento da secreção ácida gástrica, em mediadores pró-inflamatórios e no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na área da lesão (AMIRSHAHROKHI; KHALILI, 2015).

Após a administração do etanol, em poucos minutos, é possível observar lesões hemorrágicas, acompanhadas de aumento da permeabilidade vascular e infiltração leucocitária, além da diminuição da síntese de prostaglandinas e

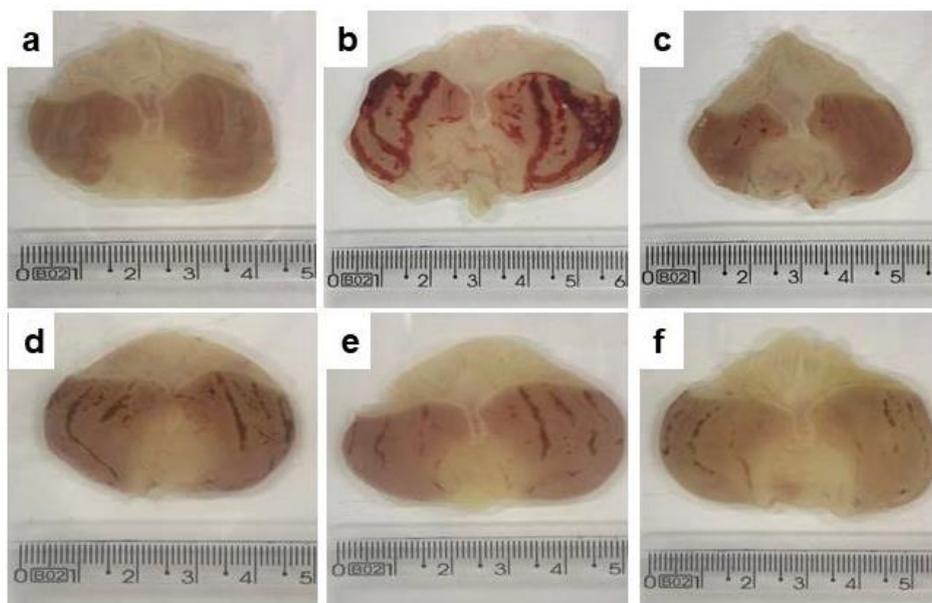
aumento da síntese de leucotrienos (LIANG *et al.*, 2018). O padrão hemorrágico das lesões pode ser observado em nossa análise macroscópica (Figuras 8.b, 9.b e 10.b).

Figura 8- Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EHCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



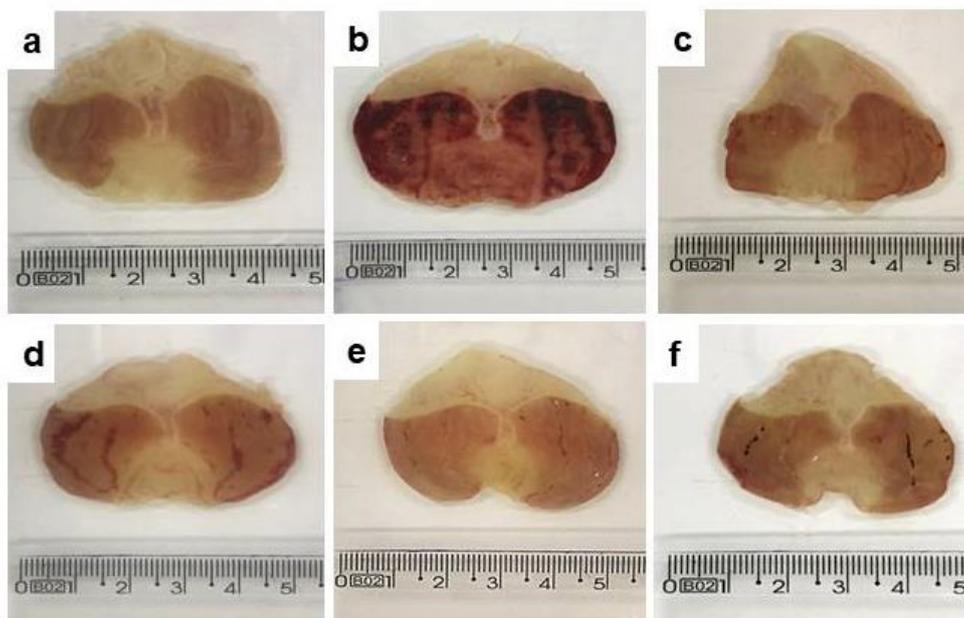
Fonte: Autora. Legenda: a: Sham-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: lansoprazol 30 mg/kg; d: EHCh 50 mg/kg; e: EHCh 100 mg/kg; f: EHCh 200 mg/kg.

Figura 9- Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EACh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: a: *Sham*-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: lansoprazol 30 mg/kg; d: EECh 50 mg/kg; e: EECh 100 mg/kg; f: EECh 200 mg/kg.

Figura 10- Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.

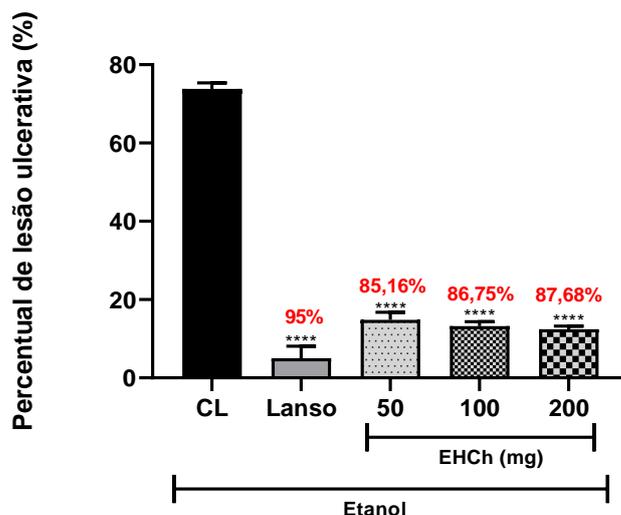


Fonte: Autora. Legenda: a: *Sham*-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: lansoprazol 30 mg/kg; d: EECh 50 mg/kg; e: EECh 100 mg/kg; f: EECh 200 mg/kg.

Ainda quanto à análise macroscópica dos estômagos, ficou constatada a progressiva redução das lesões conforme os pré-tratamentos com os extratos e com o fármaco padrão (lansoprazol). O grupo *sham* demonstrou arquitetura tecidual preservada (Figuras 8, 9 e 10).

Em nosso estudo, com o modelo de indução por etanol, o EECh, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, reduziu as lesões em 85,16; 86,75 e 87,68 %, respectivamente. Não foi constatada diferença entre as concentrações testadas, porém, estes valores de redução foram capazes de promover diferença significativa ($p < 0,0001$), quando comparados ao controle lesionado, que apresentou um percentual de lesão ulcerativa de 73,84% (Figura 11).

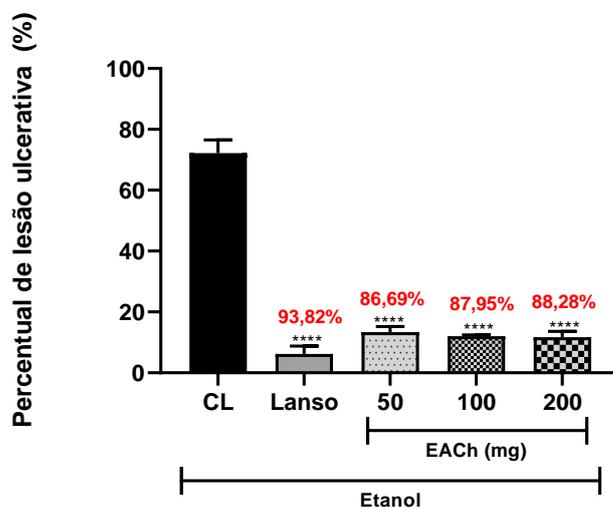
Figura 11- Efeito da administração oral de EHCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/kg. EHCh – extrato hexânico de *C. heliotropiifolius* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL.

O ECh, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, foi capaz de reduzir as lesões gástricas em 86,69; 87,95 e 88,28 %, respectivamente. Também não foi observada diferença significativa entre as concentrações testadas, apenas em relação ao controle lesionado ($p < 0,0001$), que apresentou percentual de lesão ulcerativa de 72,23 % (Figura 12).

Figura 12- Efeito da administração oral de ECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.

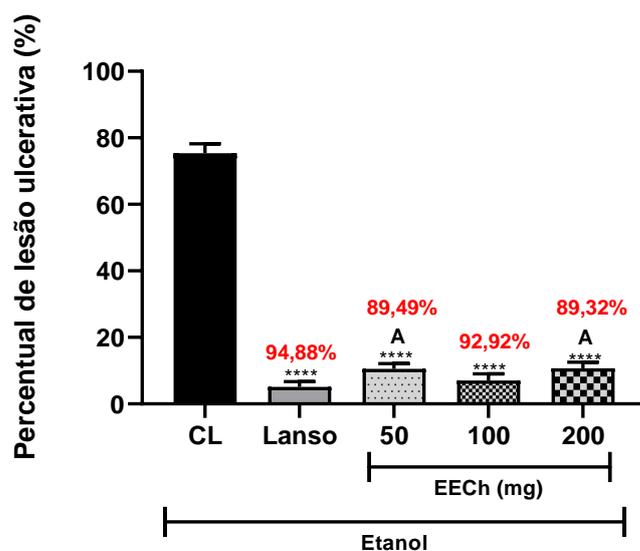


Fonte: Autora. Legenda: CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/kg. EECh – extrato acetato de *C. heliotropiifolius* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância one way ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL.

O EECh, nas mesmas doses dos demais extratos, reduziu as lesões em 89,49; 92,92 e 89,32 %, respectivamente, sendo estes, os melhores valores e apresentado diferença significativa quando comparados ao controle lesionado.

Também foi observada diferença estatística entre as concentrações de 50 e 100 mg/kg e entre as 100 e 200 mg/kg, com $p < 0,05$, indicando que a probabilidade desses valores serem estatisticamente iguais é menor que 5%, pois o valor de p é definido como a probabilidade de se observar um valor maior ou igual ao encontrado (FERREIRA; PATINO, 2015) (Figura 13).

Figura 13- Efeito da administração oral de EECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/Kg. EECh – extrato etanólico de *C. heliotropiifolius* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância one way ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL. A $p < 0,05$ vs 100.

A literatura correlaciona a capacidade gastroprotetora de espécies vegetais com a presença de compostos como taninos e flavonoides em sua composição (RODRIGUES *et al.*, 2008; KUSHIMA *et al.*, 2009; MOLEIRO *et al.*, 2009). Em especial os taninos, são referidos pela habilidade de interagir com as proteínas do muco, melhorando o efeito citoprotetor pela formação de um

revestimento proteico na mucosa gastrintestinal (MOLEIRO *et al.*, 2009).

Os triterpenos também são relatados como agentes protetores contra úlceras gástricas (ANDRADE *et al.*, 2008). A presença destes compostos foi constatada em nossa investigação fitoquímica e pode justificar os altos índices de proteção da mucosa gástrica encontrados neste estudo.

O efeito gastroprotetor tem sido relatado em espécies do gênero *Croton*, como no *C. campestris* A. St.- Hill (JÚNIOR *et al.*, 2013) e no *C. urucurana* Baillon bark (urucuana) (CORDEIRO *et al.*, 2012), assim como em estudo com o óleo essencial do *C. heliotropiifolius*, no qual foi utilizado os modelos de indução de lesão gástrica por etanol, que apresentou uma redução de 15,92 cm² para 9,19 cm² da área da lesão, na concentração de 400 mg/kg (VIDAL *et al.*, 2017).

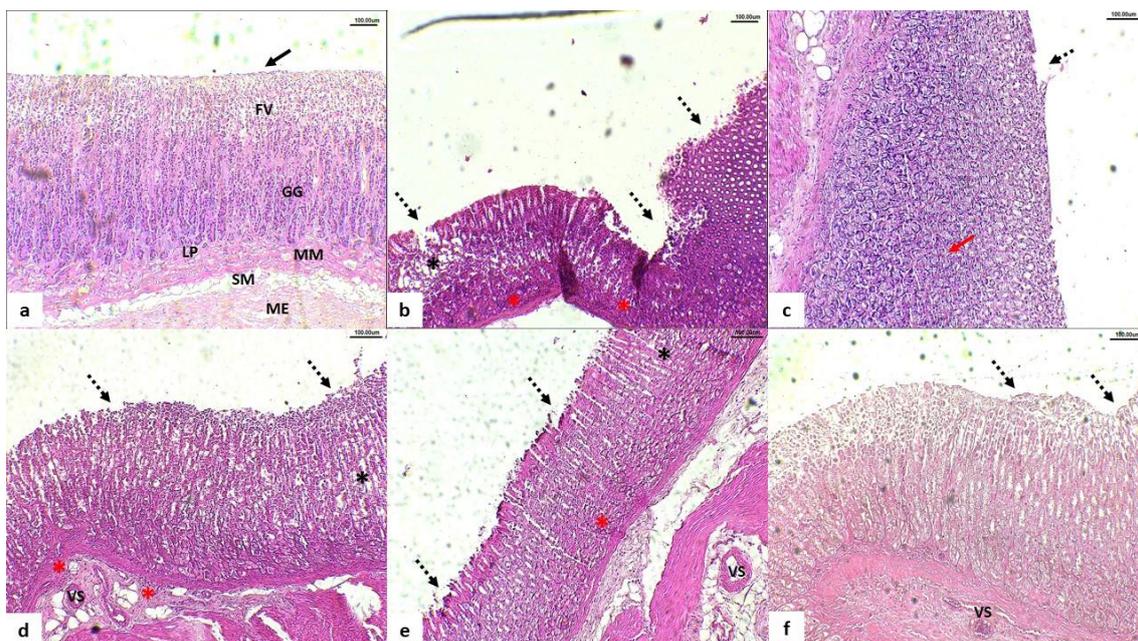
Contudo, nossos extratos foram capazes de promover melhores índices de redução das lesões e em menores concentrações.

6.6.1.1 *Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica em Lesões Induzidas por Etanol*

Estudos histológicos são de suma importância na identificação de estruturas e características morfológicas de tecidos (SOUZA; MEDRADO; GITIRANA, 2010). Assim, a fim de complementar as análises macroscópicas foi realizada a investigação histopatológica.

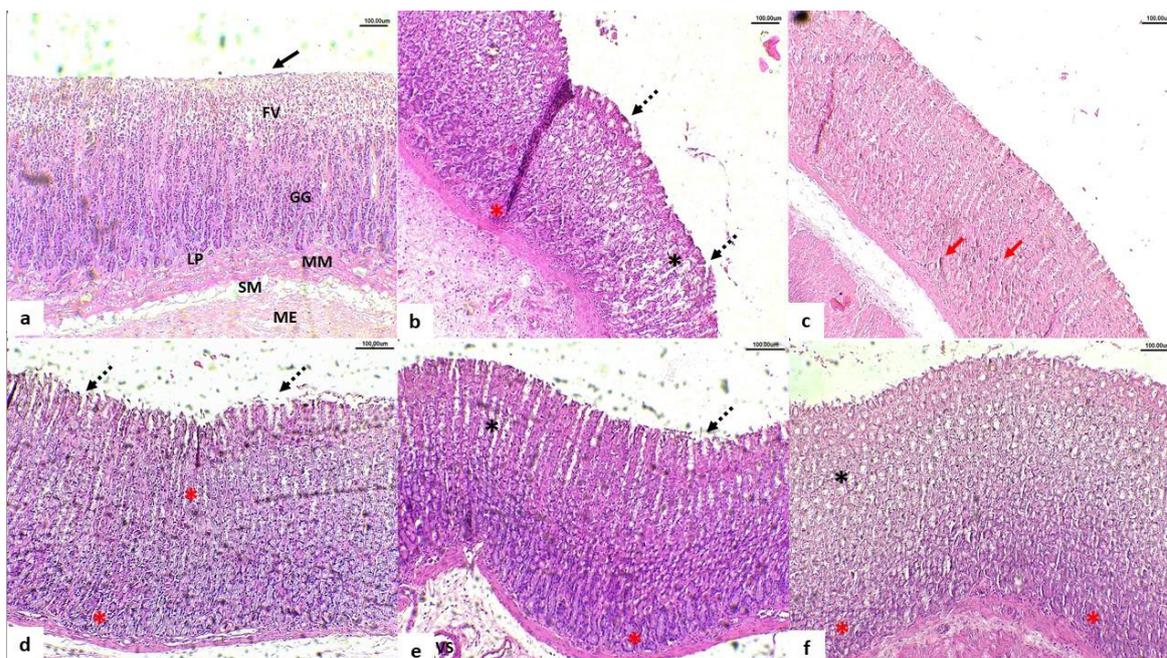
As figuras 14, 15 e 16 apresentam fotomicrografias das secções histológicas coradas com hematoxilina – eosina (HE) dos estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de lesão gástrica por etanol absoluto.

Figura 14-Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EHCh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



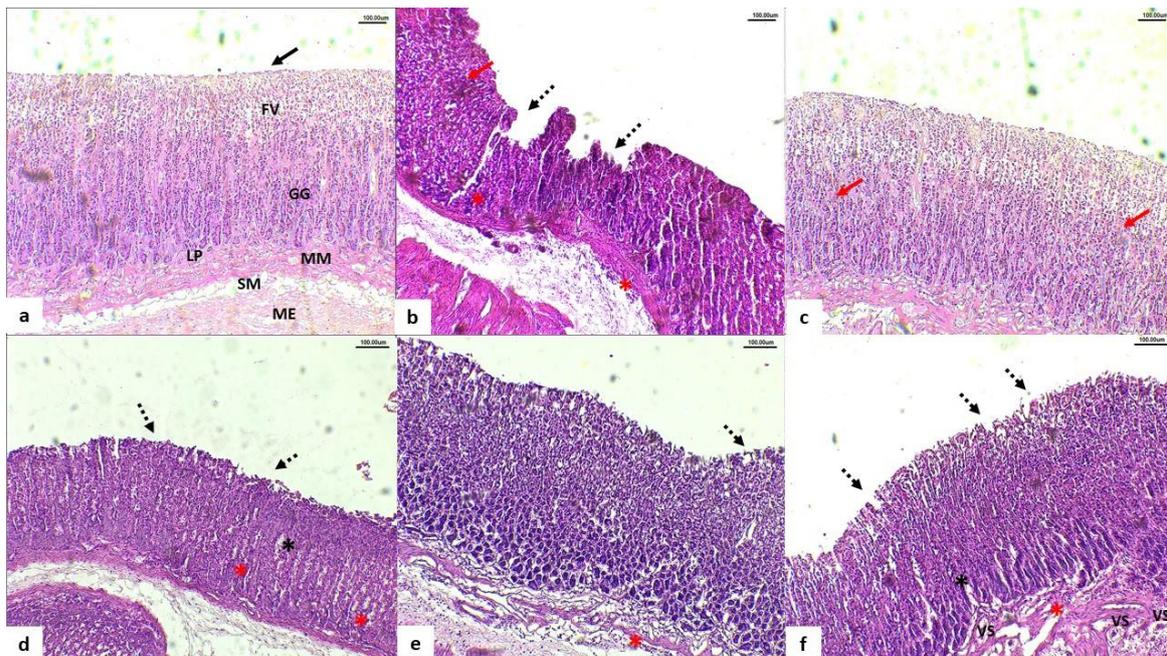
Fonte: Autora. Legenda: a: Sham-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: Lansoprazol 30 mg/kg; d: EHCh 50 mg/kg; e: EHCh 100 mg/kg; f: EHCh 200 mg/kg. Epitélio simples cilíndrico (seta); favéolas gástricas (FV); glândulas gástricas (GG); lâmina própria (LP); camada muscular da mucosa (MM); submucosa (SM); muscular externa (ME); edema (asterisco preto); infiltrado leucocitário (asterisco vermelho); perda da arquitetura glandular superficial (seta pontilhada); hiperemia (seta vermelha).

Figura 15-Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do ECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: a: Sham-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: Lansoprazol 30 mg/kg; d: ECh 50 mg/kg; e: ECh 100 mg/kg; f: ECh 200 mg/kg. Epitélio simples cilíndrico (seta); favéolas gástricas (FV); glândulas gástricas (GG); lâmina própria (LP); camada muscular da mucosa (MM); submucosa (SM); muscular externa (ME); edema (asterisco preto); infiltrado leucocitário (asterisco vermelho); perda da arquitetura glandular superficial (seta pontilhada); hiperemia (seta vermelha).

Figura 16-Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: a: Sham-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: Lansoprazol 30 mg/kg; d: EECh 50 mg/kg; e: EECh 100 mg/kg; f: EECh 200 mg/kg. Epitélio simples cilíndrico (seta); favéolas gástricas (FV); glândulas gástricas (GG); lâmina própria (LP); camada muscular da mucosa (MM); submucosa (SM); muscular externa (ME); edema (asterisco preto); infiltrado leucocitário (asterisco vermelho); perda da arquitetura glandular superficial (seta pontilhada); hiperemia (seta vermelha).

Neste estudo histopatológico, no grupo *sham* foi possível evidenciar a arquitetura tecidual organizada, representada pelo epitélio simples cilíndrico (seta) característico da superfície da mucosa gástrica, com suas invaginações que formam as favéolas gástricas (FV) e mais internamente as glândulas gástricas (GG), que constituem estruturas responsáveis pela produção do conteúdo digestivo e protetor do estômago. Também foi possível observar a lâmina própria (LP), camada de tecido conjuntivo localizada logo abaixo do epitélio de superfície; a camada muscular da mucosa (MM), que consiste em duas camadas finas de músculo liso com função de auxiliar a expulsão das secreções das glândulas gástricas para o lúmen do estômago; a submucosa (SM), espessa

camada de tecido conjuntivo e a muscular externa (ME), também conhecida como túnica muscular, que consiste no músculo liso localizado profundamente à submucosa (Figuras 14.a, 15.a e 16.a).

Nos controles lesionados é possível notar alterações epiteliais de extensão variável, representadas por desorganização das favéolas e glândulas gástricas, edema (asterisco preto), infiltrado leucocitário (asterisco vermelho), com perda da arquitetura tecidual de superfície (seta pontilhada), ocasionados pelo dano tecidual (Figuras 14.b, 15.b e 16.b).

. Nos grupos tratados com lansoprazol (30 mg/kg) foi possível evidenciar extensa área de preservação do epitélio foveolar. As glândulas mostraram-se bem definidas, compatíveis com a normalidade. Também foi possível observar poucas áreas focais de hiperemia (seta vermelha) e presença ocasional de descamação das células epiteliais (Figuras 14.c, 15.c e 16.c). Este fármaco é utilizado com frequência como gastroprotetor, pois atua inibindo a bomba de prótons, e conseqüentemente a secreção de ácido clorídrico (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Os grupos tratados com a dose de 50 mg/kg do EHCh e do ECh, apresentaram sinais mais evidentes de lesão tecidual, embora estes estiveram limitados às áreas focais de pequena extensão no tecido (Figuras 14.d, 15.d). Os grupos que receberam as doses de 100 e 200 mg/kg do EHCh e do ECh, bem como as três doses do EECh (50, 100 e 200 mg/kg), apresentaram epitélio glandular mais preservado em sua maior extensão. Quando presentes, as lesões se limitavam ao terço superficial do epitélio e poucas alterações nas camadas subjacentes (Figuras 14.e, 14.f, 15.e, 15.f, 16.d, 16.e, e 16.f).

Portanto, os achados macro e microscópicos confirmaram a atividade gastroprotetora promissora do *C. heliotropiifolius*.

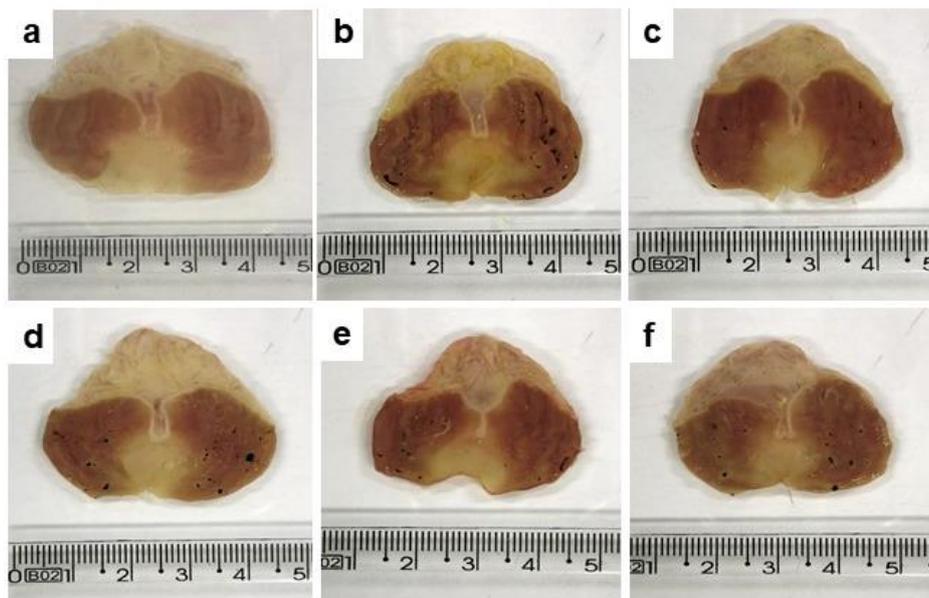
6.6.2 Lesão Gástrica Induzida por Indometacina (AINE)

A utilização da indometacina como modelo de indução de lesão gástrica promove uma investigação mais específica, pois sua patogênese envolve a inibição da síntese de prostaglandinas e, conseqüentemente, diminuição dos mecanismos citoprotetores (ADINORTEY *et al.*, 2013; PALLE; KANAKALATHA; KAVITHA, 2018).

Para este modelo de indução, escolhemos apenas o EECh, por ser o extrato com os melhores índices de redução de lesão gástrica no modelo etanol.

A análise macroscópica dos estômagos apresentou lesões puntiformes (petéquias) na mucosa e progressiva diminuição do dano tecidual conforme os pré-tratamentos com o extrato e com o fármaco padrão, a ranitidina (60 mg/kg). O controle *sham* apresentou morfologia tecidual preservada (Figura 17).

Figura 17- Avaliação macroscópica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



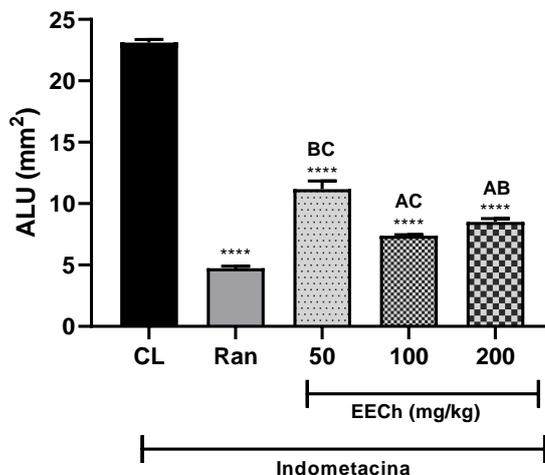
Fonte: Autora. Legenda: a: Sham-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: ranitidina 60 mg/kg; d: EECh 50 mg/kg; e: EECh 100 mg/kg; f: EECh 200 mg/kg.

Devido as lesões se apresentarem na forma de petéquias neste modelo de indução, não iremos representá-las em função da área total do estômago, através do percentual de lesão ulcerativa e sim, conforme a sua extensão, de acordo com a área total de lesão ulcerativa (ALU).

O EECh, nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg, apresentou ALUs de $11,18 \pm 0,66$, $7,39 \pm 0,08$ e $8,51 \pm 0,27$ mm², respectivamente. Estes valores apresentaram diferença estatística entre si e também quando comparados ao ALU de $23,11 \pm 0,27$, correspondente ao grupo controle lesionado (Figura 18).

A ranitidina, fármaco antagonista do receptor H₂, foi usado como controle e o grupo pré-tratado com este fármaco apresentou valor de ALU de $4,74 \pm 0,16$ (Figura 18).

Figura 18- Efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1 %); Ran – ranitidina 60 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL, A: $p < 0,0001$ vs EECh 50, B: $p < 0,0001$ vs EECh 100 e C: $p < 0,0001$ vs EECh 200.

Este bom desempenho gastoprotetor pode estar associado ao potencial citoprotetor de compostos bioativos, principalmente da classe dos flavonoides (BARROS *et al.*, 2016), tendo em vista que o EECh apresentou o maior teor dosado neste estudo e também por ter apresentado expressiva atividade antioxidante.

A diminuição das lesões gástricas promovida pelo pré-tratamento com a dose de 100 mg/kg do EECh foi a mais eficiente nos dois modelos de indução. O comportamento dose não dependente do extrato etanólico, nas concentrações testadas, pode ser justificado pela maior variabilidade fitoquímica ocasionada pelo aumento da concentração, que pode acarretar uma maior disponibilidade de compostos bioativos, bem como de compostos potencialmente tóxicos (KUSHIMA, 2006).

Quanto ao aumento da concentração de compostos bioativos, é possível relacionar neste contexto, o aumento da capacidade de inibição da acetilcolinesterase, tendo em vista que esta enzima é capaz de inativar a ação da acetilcolina, e, quando inibida, aumenta os níveis deste neurotransmissor, que é relacionado à maior produção e secreção de ácido gástrico, funcionando como cofator em danos erosivos na mucosa gástrica (YUAN; PADOL; HUNT

2006). Tal capacidade de inibição da acetilcolinesterase foi reconhecida por Queiroz *et al.* (2014) em seu estudo com o extrato etanólico da casca do caule de *C. heliotropiifolius*.

A utilização prolongada de anti-inflamatórios não esteroides ocasiona diversas complicações gástricas, incluindo lesões na parede do estômago, como gastrites, lesões superficiais agudas, conhecidas como úlceras, chegando até a lesões crônicas profundas com perfuração da parede do estômago (KWIECIEN *et al.*, 2014).

Embora haja diversos tratamentos no mercado, ainda não foi encontrada uma terapia adequada para tratar as complicações gástricas acarretadas pelos AINEs (CHATTERJEE *et al.*, 2012). Assim, o uso consciente de fármacos anti-inflamatórios, associado a estudos como este, que levam em consideração os conhecimentos etnobotânicos, representam alternativas importantes no auxílio desta problemática de saúde.

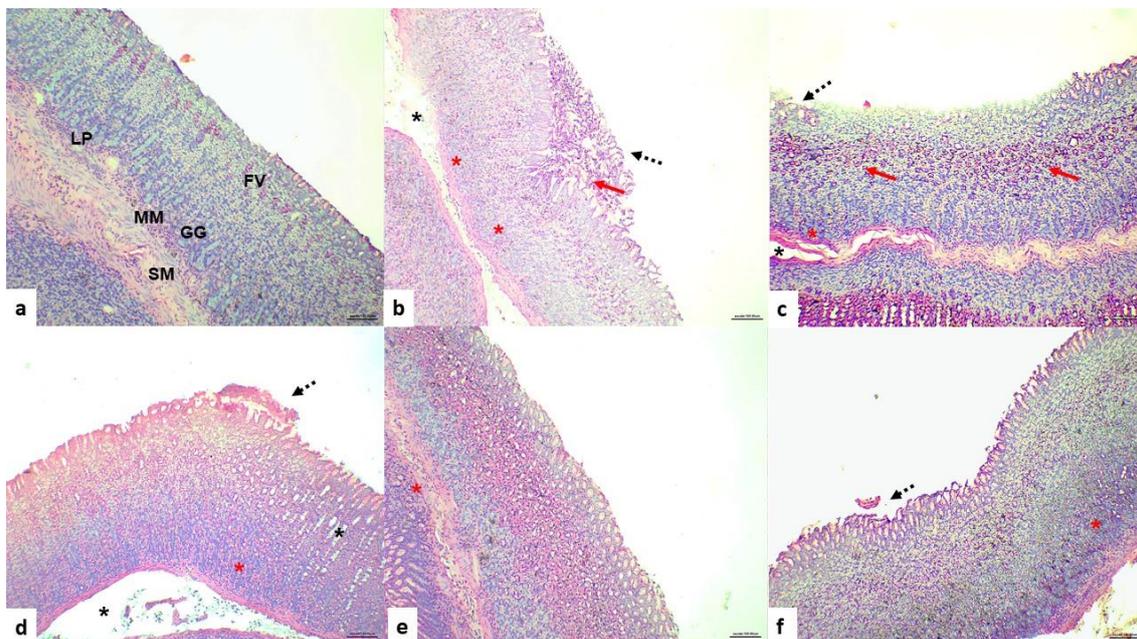
6.6.2.1 Análise Histopatológica da Mucosa Gástrica em Lesões Induzidas por Indometacina

A análise histopatológica da mucosa gástrica dos animais submetidos ao modelo de lesão induzida por indometacina revelou, nas fotomicrografias do grupo controle a destruição do tecido epitelial simples cilíndrico, caracterizada por desarranjo das fossetas gástricas (seta pontilhada), presença de infiltrado leucocitário (asterisco vermelho), edema (asterisco preto) e hiperemia (seta vermelha) (Figura 19.b).

O extrato EECh, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, mostrou ação gastroprotetora com preservação das fossetas gástricas, em sua maior extensão tecidual, e apenas pontos focais de hemorragia e edema (Figura 19.d, 19.e. e 19.f).

A fotomicrografia da mucosa gástrica dos animais tratados com ranitidina (60 mg/kg) apresentou leve destruição das fossetas gástricas, pouco desarranjo do tecido epitelial simples cilíndrico e presença moderada de danos hemorrágicos e edema na mucosa gástrica (Figura 19.c). O grupo *sham* apresentou arquitetura tecidual preservada (Figura 19.a).

Figura 19 - Avaliação histopatológica do efeito da administração oral do EECh sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: a: Sham-Grupo saudável; b: Controle lesionado; c: ranitidina 60 mg/kg; d: EECh 50 mg/kg; e: EECh 100 mg/kg; f: EECh 200 mg/kg. Epitélio simples cilíndrico (seta); favéolas gástricas (FV); glândulas gástricas (GG); lâmina própria (LP); camada muscular da mucosa (MM); submucosa (SM); edema (asterisco preto); infiltrado leucocitário (asterisco vermelho); perda da arquitetura glandular superficial (seta pontilhada); hiperemia (seta vermelha).

Estes achados microscópicos apresentam concordâncias com as análises macroscópicas das lesões gástricas induzidas por indometacina.

6.6.4 Determinação dos Níveis de NO

O óxido nítrico é um mediador gasoso que possui relação direta na conservação da integridade da mucosa gástrica, estando associado à regulação da secreção de muco, de bicarbonato e de ácido gástrico, além da manutenção do fluxo sanguíneo. Deste modo, o NO atua como agente citoprotetor e anti-inflamatório, pois está envolvido em processos de inibição da aderência de leucócitos ao endotélio vascular (SANTIN *et al.*, 2013; MAGIEROWSKI *et al.*, 2015).

As dosagens de NO teciduais, no modelo de lesão induzida por etanol, apresentaram valores médios para o EECh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e para EECh, nas mesmas doses, de $36,69 \pm 2,43$; $41,16 \pm 2,96$; $41,94 \pm 2,81$; $24,19 \pm 3,80$; $27,64 \pm 2,36$ e $27,08 \pm 3,51$ $\mu\text{mol/g}$ de tecido, respectivamente

aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/kg; Ran - ranitidina 60 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde * $p < 0,5$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ vs CL, # $p < 0,5$ ## $p < 0,01$ #### $p < 0,0001$ vs SHAM, ap $< 0,5$ vs 50.

As dosagens de óxido nítrico no tecido gástrico demonstraram aumento significativo, em todas as doses dos extratos, quando comparadas aos controles lesionados no ensaio de lesão induzida por etanol. Deste modo, a ação gastroprotetora dos extratos pode estar relacionada à capacidade citoprotetora do NO e motivou a realização da investigação do seu possível envolvimento como mecanismo de ação gastroprotetor.

No ensaio de lesão induzida por indometacina, a única concentração que apresentou diferença estatística em relação ao controle foi o extrato EECh na dose de 100 mg/kg, o que ampara a escolha dessa concentração para o ensaio de mecanismo de ação.

6.6.5 Determinação dos Níveis de GSH

A glutathiona reduzida (GSH), antioxidante intracelular e extracelular, atua em vários processos reduzindo peróxidos de hidrogênio (HUANG *et al.*, 2010). No trato gastrointestinal, o GSH age como um varredor de radicais livres e substâncias tóxicas ingeridas na alimentação ou produzidas pelo metabolismo gástrico (SHIRIN *et al.*, 2001).

Os níveis de GSH teciduais, no modelo de lesão induzida por etanol, apresentaram valores médios para o EHCh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e para ECh, nas mesmas doses, de $679,90 \pm 64,67$; $696,50 \pm 48,56$; $726,70 \pm 37,97$; $675,60 \pm 70,40$; $691,40 \pm 60,91$ e $688,10 \pm 48,94$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente (Figura 21.a e 21.b).

O EECh, nas mesmas doses dos demais extratos, exibiu valores médios de $635,00 \pm 46,41$; $661,10 \pm 37,18$ e $669,20 \pm 54,54$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente. No ensaio de lesão gástrica induzida por indometacina, os valores de GSH teciduais foram de $718,60 \pm 45,22$ $\mu\text{g/g}$ de tecido para o grupo sham, $455,40 \pm 46,54$ $\mu\text{g/g}$ de tecido para o controle lesionado, $545,10 \pm 14,70$ $\mu\text{g/g}$ de tecido para o grupo tratado com a ranitidina (60 mg/kg) e para as

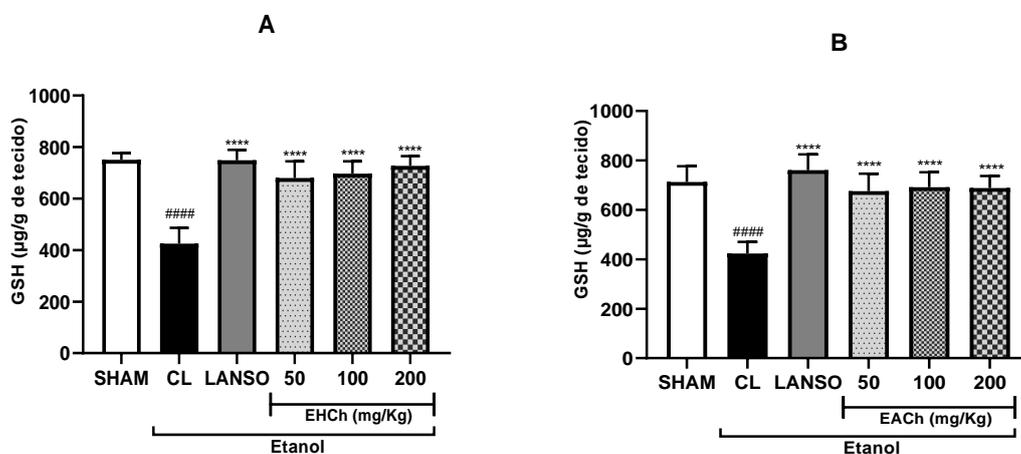
concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg do EECh, os valores médios foram de $466,60 \pm 40,09$; $573,40 \pm 28,25$ e $566,70 \pm 39,62$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, respectivamente (Figura 21.c e 21.d).

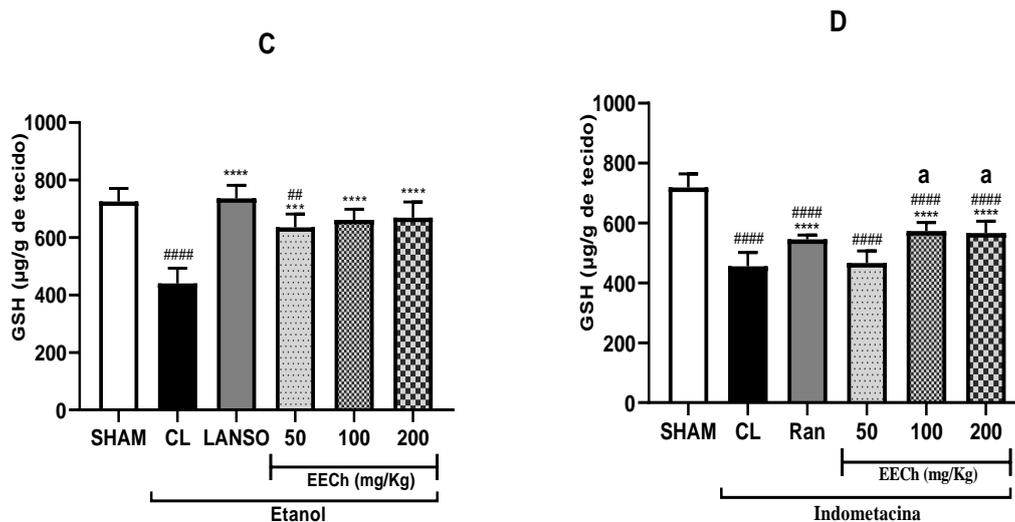
Neste trabalho, todas as doses testadas dos extratos, foram capazes de aumentar os níveis de GSH teciduais, apresentando diferença estatística quando comparadas aos controles lesionados.

O GSH em concentrações elevadas desempenha papel importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica (ALTINKAYNAK *et al.*, 2003), pois tanto o etanol (por ser um indutor de estresse oxidativo), quanto os AINEs são capazes de reduzir os níveis de GSH teciduais (REPETTO; LLESUY, 2002; ODABASOGLU *et al.*, 2005).

Assim, nossos resultados também demonstram possível envolvimento do GSH nos mecanismos gastroprotetores da espécie em estudo.

Figura 21- Efeito da administração oral dos EHCh ECh e EECh nas concentrações de GSH na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).





Fonte: Autora. Legenda: A: pré-tratamento com EHCh no modelo de úlcera por etanol absoluto; B: pré-tratamento com ECh no modelo de úlcera por etanol absoluto; C: pré-tratamento com EECh no modelo de úlcera por etanol absoluto; D: pré-tratamento com EECh no modelo de úlcera por indometacina. Onde: SHAM - grupo saudável; CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/kg; Ran - ranitidina 60 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ vs CL, ## $p < 0,01$ #### $p < 0,0001$ vs SHAM e a $p < 0,5$ vs 50.

6.6.6 Determinação dos Níveis de MDA

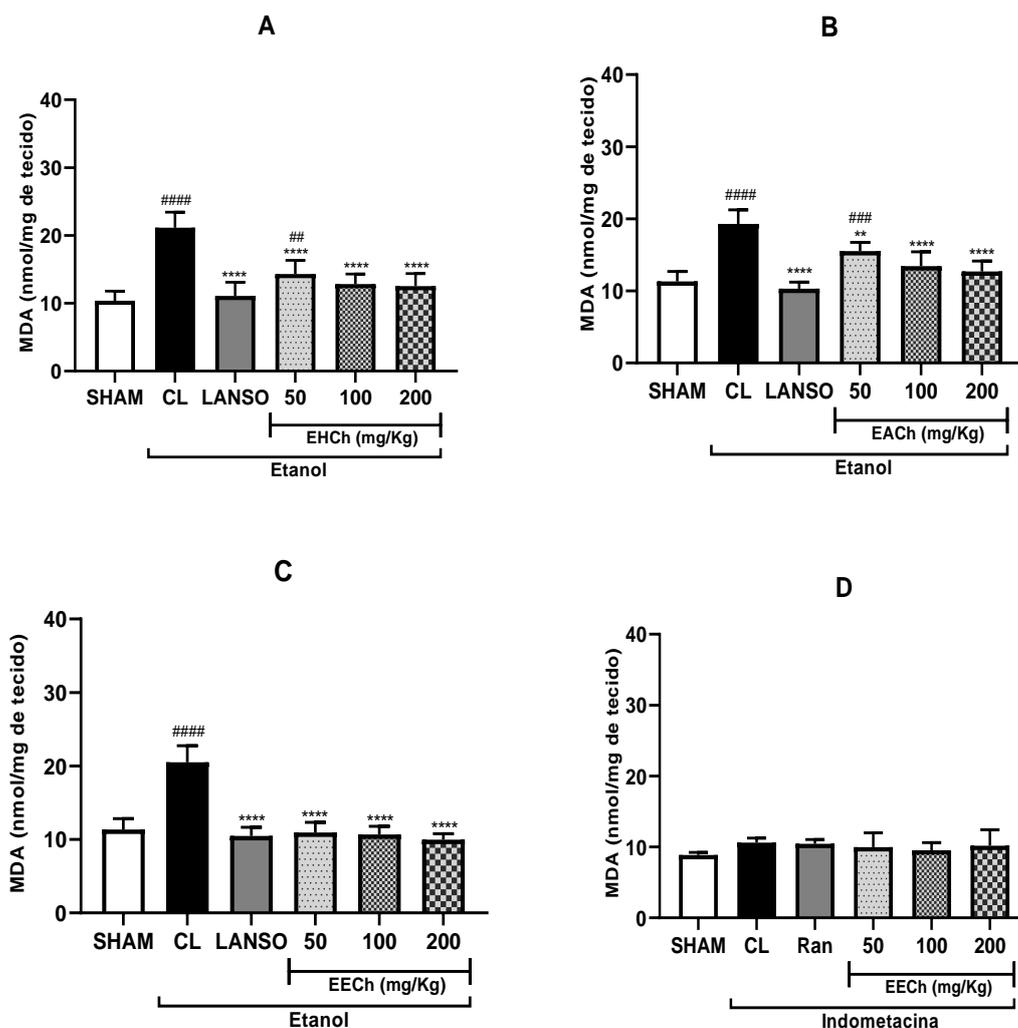
O malondialdeído (MDA) constitui um marcador de dano causado pelo estresse oxidativo, podendo ser utilizado na investigação da eficiência do sistema antioxidante (GAŁECKI, 2014).

A determinação dos níveis de MDA teciduais, no modelo de lesão induzida por etanol, apresentaram valores médios para o EHCh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e para ECh, nas mesmas doses, de $14,32 \pm 2,00$; $12,84 \pm 1,48$; $12,54 \pm 1,84$; $15,51 \pm 1,21$; $13,45 \pm 1,96$ e $12,71 \pm 1,44$ nmol/mg de tecido, respectivamente (Figura 22.a e 22.b).

O EECh, nas mesmas doses dos demais extratos, exibiu valores médios de $10,97 \pm 1,36$; $10,68 \pm 1,15$ e $9,97 \pm 0,80$ nmol/mg de tecido, respectivamente. No ensaio de lesão gástrica induzida por indometacina, os valores de MDA teciduais foram de $8,86 \pm 0,34$ nmol/mg de tecido para o grupo *sham*, $10,60 \pm 0,64$ nmol/mg de tecido para o controle lesionado, $10,45 \pm 0,59$ nmol/mg de tecido para o grupo tratado com a ranitidina (60 mg/kg) e para as concentrações

de 50, 100 e 200 mg/kg do EECh, os valores médios foram de $9,96 \pm 2,02$; $9,52 \pm 1,07$ e $10,19 \pm 2,24$ nmol/mg de tecido, respectivamente (Figura 22.c e 22.d).

Figura 22- Efeito da administração oral dos EHCh, ECh e EECh nas concentrações de MDA na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).



Fonte: Autora. Legenda: A: pré-tratamento com EHCh no modelo de úlcera por etanol absoluto; B: pré-tratamento com ECh no modelo de úlcera por etanol absoluto; C: pré-tratamento com EECh no modelo de úlcera por etanol absoluto; D: pré-tratamento com EECh no modelo de úlcera por indometacina. Onde: SHAM - grupo saudável; CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/kg; Ran - ranitidina 60 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde **** $p < 0,0001$ vs CL, # $p < 0,5$ ## $p < 0,01$ #### $p < 0,0001$ vs SHAM.

Os níveis de MDA dosados nos tecidos das mucosas gástricas, após os tratamentos com os extratos, apresentaram reduções significativas quando comparados aos grupos não tratados (controles lesionados). Desta forma, é possível que os extratos possuam ação gastroprotetora via redução do estresse oxidativo, mantendo os níveis de GSH elevados e reduzindo a produção de MDA, principalmente em lesões induzidas por etanol (DAMASCENO *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2016), o que não foi observado no modelo de indução de lesão gástrica por indometacina, pois sua patogênese está relacionada principalmente à inibição da síntese das prostaglandinas e aumento da produção de citocinas inflamatórias (KOIZUMI *et al.*, 2009).

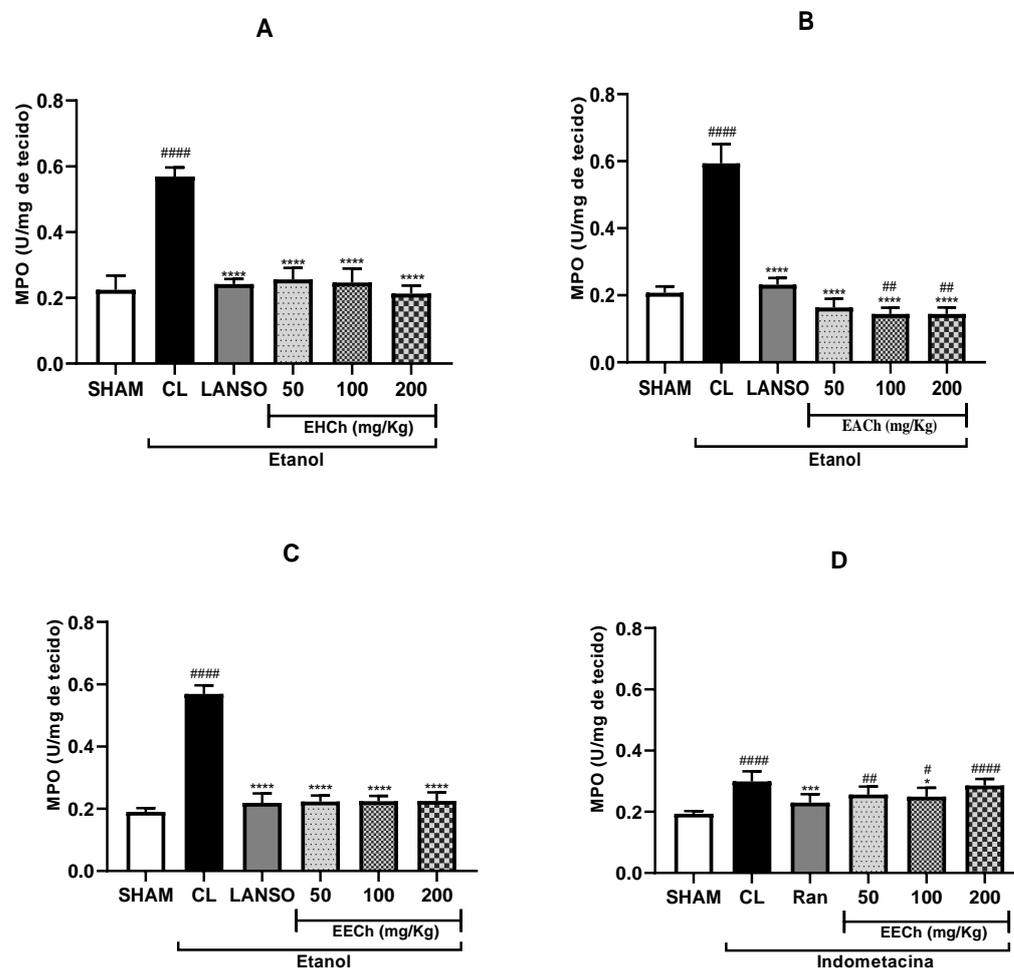
6.6.7 Determinação dos Níveis de MPO

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e é comumente utilizada como marcador do conteúdo leucocitário tecidual. O princípio do método baseia-se na liberação de MPO para o tecido lesionado pelos neutrófilos que migram para o local do estímulo inflamatório (SOARES *et al.*, 2008).

Os níveis de MPO teciduais, nos modelos de lesão induzida por etanol, apresentaram valores médios para o EHCh nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e para ECh, nas mesmas doses, de $0,256 \pm 0,03$; $0,246 \pm 0,04$; $0,213 \pm 0,02$; $0,163 \pm 0,03$; $0,144 \pm 0,01$ e $0,144 \pm 0,01$ U/mg de tecido, respectivamente (Figura 23.a e 23.b).

O EECh, nas mesmas doses dos demais extratos, exibiu valores médios de $0,223 \pm 0,01$; $0,224 \pm 0,01$ e $0,224 \pm 0,02$ U/mg de tecido, respectivamente. No ensaio de lesão gástrica induzida por indometacina, os valores de MPO teciduais foram de $0,193 \pm 0,00$ U/mg de tecido para o grupo *sham*, $0,299 \pm 0,03$ U/mg de tecido para o controle lesionado, $0,230 \pm 0,02$ U/mg de tecido para o grupo tratado com a ranitidina (60 mg/kg) e para as concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg do EECh, os valores médios foram de $0,255 \pm 0,02$; $0,249 \pm 0,02$ e $0,285 \pm 0,02$ U/mg de tecido, respectivamente (Figura 23.c e 23.d).

Figura 23- Efeito da administração oral dos EHCh, ECh e EECh nas concentrações de MPO na mucosa gástrica dos animais submetidos aos modelos de indução de úlceras agudas por etanol (A,B,C) e AINE (D).



Fonte: Autora. Legenda: A: pré-tratamento com EHCh no modelo de úlcera por etanol absoluto; B: pré-tratamento com ECh no modelo de úlcera por etanol absoluto; C: pré-tratamento com EECh no modelo de úlcera por etanol absoluto; D: pré-tratamento com EECh no modelo de úlcera por indometacina. Onde: SHAM - grupo saudável; CL - controle lesionado (solução aquosa de Tween 20 1%); Lanso - lansoprazol 30 mg/kg; Ran - ranitidina 60 mg/kg. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, onde * $p < 0,5$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ vs CL, # $p < 0,5$ ### $p < 0,001$ #### $p < 0,0001$ vs SHAM.

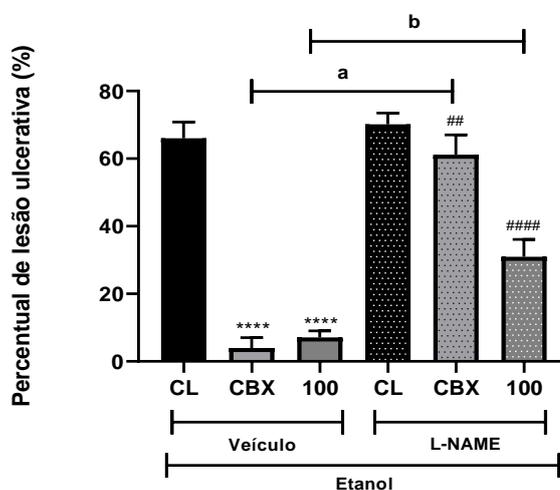
Com a determinação dos níveis gástricos da enzima MPO, foi possível observar uma redução significativa em todos os grupos tratamentos com os extratos, quando comparados aos controles lesionados no teste de lesão induzida por etanol e na dose de 100 mg/kg do EECh, pelo ensaio de lesão induzida por indometacina. Estes resultados corroboram os dados presentes na

literatura, que mostram redução da atividade desta enzima por diversos produtos naturais com atividade anti-inflamatória e gastroprotetora (RIOS *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2011).

6.6.8 Avaliação do Envolvimento do Óxido Nítrico como Possível Mecanismo de Ação Gastroprotetor

A avaliação da participação do óxido nítrico no mecanismo de ação antiulcerogênico do EECh envolveu a administração prévia de um agente bloqueador, o N-Nitro- L –arginina (L-NAME) que é um inibidor inespecífico da NO sintase. Desta forma, foi possível observar que o tratamento prévio com L-NAME promoveu uma redução parcial de 92,92% para 69,03% na ação gastroprotetora do EECh (Figura 24), sugerindo a participação do NO nesse efeito.

Figura 24- Efeito do EECh frente ao inibidor de NO (L-NAME) em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos.



Fonte: Autora. Legenda: Pré-tratamento com veículo (solução aquosa de Tween 20 1%); Pré-tratamento com L-NAME. Tratamento: CL - controle lesionado; CBX – carbenoxolona (100 mg/kg); EECh (100 mg/kg). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância *one way* ANOVA, seguido do teste de Tukey, **** $p < 0,0001$ vs CL, ## $p < 0,01$ vs CL + L-NAME e #### $p < 0,001$ vs CL + L-NAME. A comparação entre os grupos não bloqueados e bloqueados foi feita pelo teste “t” de *Student*, a $p < 0,0001$ vs CBX e b $p < 0,0001$ vs 100.

A ação gastroprotetora da ferramenta farmacológica carbenoxolona é associada ao aumento da síntese de muco gástrico a partir do aumento na

produção de prostaglandina. Esse aumento promove uma maior proteção da mucosa contra a ação direta do ácido gástrico e pepsina, acarretando assim, efeito citoprotetor (JEWELL, 2007).

O óxido nítrico por sua vez, é um mediador gasoso endógeno, que na úlcera gástrica apresenta efeito dual, tanto antiulcerogênico quanto ulcerogênico, o que depende da concentração da isoforma de NOS envolvida. As isoformas constitutivas são capazes de influenciar a produção de muco, além de promover o aumento do fluxo sanguíneo, a regulação da secreção ácida, a diminuição da agregação de neutrófilos e aderência de leucócitos na parede do endotélio vascular, o que auxilia na ação protetora no trato gastrointestinal (WALLACE; MILLER, 2000; MAGIEROWSKI *et al.*, 2015).

Estes dados apresentam uma redução parcial da capacidade gastroprotetora do EECh, tendo em vista que o bloqueio da NO sintase pelo L-NAME, promoveu o aumento significativo do ILU no grupo bloqueado e tratado com o EECh, entretanto, este aumento também diferiu estatisticamente do controle lesionado.

Os resultados apresentados sugerem o efeito gastroprotetor *C. heliotropiifolius* e o possível envolvimento concomitante de outras vias na gastroproteção, além da via do NO, como foi sugerido nas dosagens de GSH, MDA e MPO e na atividade antioxidante.

7 CONCLUSÕES

- Os extratos das folhas de *C. heliotropiifolius* apresentaram compostos fenólicos condizentes com o gênero *Croton* e com a família Euphorbiaceae;
- A avaliação da atividade antimicrobiana exibiu fraca ação do EHCh frente ao *Bacillus subtilis* e inatividade dos demais extratos contra todas as cepas testadas, bem como contra a *H. pylori*;
- A pesquisa *in vitro* do potencial antioxidante mostrou capacidade estabilizadora de radicais por parte dos extratos e concordâncias entre os métodos testados, tendo o EECh sido o com melhor atividade;
- Os extratos exibiram mínimos efeitos citotóxicos *in vitro* ou tóxico agudo *in vivo*, nas condições testadas;
- Foi constatado o efeito gastroprotetor dos extratos de *C. heliotropiifolius* em modelo de lesão gástrica induzida por etanol e por indometacina, sendo o EECh o mais ativo;
- Foi observada a melhora dos parâmetros antioxidante e anti-inflamatórios de NO, GSH, MDA e MPO do tecido estomacal, após o tratamento com EHCh EACH e EECh, o que sugere que a ação gastroprotetora dos extratos envolva múltiplos fatores;
- Foi confirmado o envolvimento do NO como um dos mecanismos de ação gastroprotetora do extrato EECh.

Portanto, este trabalho foi capaz de fornecer informações científicas acerca do *C. heliotropiifolius*, contribuindo com o conhecimento etnobotânico, com o uso racional da espécie e com a busca de novas estratégias farmacológicas úteis para os tratamentos futuros contra as lesões gástricas. Desta maneira, apesar das limitações impostas pela pandemia da COVID-19, foi possível contribuir com o fortalecimento e com a inovação nas pesquisas que valorizam a biodiversidade e as riquezas naturais do Brasil.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, Omar ME et al. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 105-127, 2001.

ABREU, Alcicley da S. et al. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2001.

ADINORTEY, Michael Buenor et al. In vivo models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. **Ulcers**, v. 2013, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico. 2018.

AGYARE, Christian et al. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 617-624, 2011.

ALAEZ-VERSON, Carmen et al. HPV-16 and HLA-DRB1 alleles are associated with cervical carcinoma in Mexican Mestizo women. **Archives of medical research**, v. 42, n. 5, p. 421-425, 2011.

ALBERT, Matthew L. Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 223-231, 2004.

AL-HUSSIN, Ahmed; ALSAYED, Raghda; YOUSIF, Emad. Potential applications of antioxidants-A Review. **International Journal of Research in Engineering and Innovation**, v.1, p. 78-82, 2017.

ALI, Syed Saqib et al. Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 3, p. e13145, 2020.

ALLEN, Adrian; FLEMSTRÖM, Gunnar. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. C1-C19, 2005.

ALLEVATO, Daniella M. et al. Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae). **Phytochemistry**, v. 163, p. 132-146, 2019.

ALLEY, Michael C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer research**, v. 48, n. 3, p. 589-601, 1988.

ALVES, Maria et al. Floristic survey from an Atlantic Forest remnant on the northern coast of Bahia State, Brazil. **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 581-595, 2015.

ALZHRANI, Salem; MOHAMMAD, Abdul Wahab. Challenges and trends in membrane technology implementation for produced water treatment: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 4, p. 107-133, 2014.

AMIRSHAHROKHI, Keyvan; KHALILI, Ali-Reza. The effect of thalidomide on ethanol-induced gastric mucosal damage in mice: involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide. **Chemico-biological interactions**, v. 225, p. 63-69, 2015.

ANGÉLICO, Elissandra Couras et al. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. **BioFar**, v. 7, p. 57-61, 2012.

APPELHANS, Marc S. et al. Phylogeny and biogeography of the pantropical genus *Zanthoxylum* and its closest relatives in the proto-Rutaceae group (Rutaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 126, p. 31-44, 2018.

ARAÚJO, Floricéa M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 203-206, 2017.

ARIN, Rosa M. et al. Adenosine: direct and indirect actions on gastric acid secretion. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 737, 2017.

AVILÉS HIDALGO, Iván André et al. Actividad antibacteriana in vitro de *Croton lechleri* sobre *Streptococcus mutans*. **Odontol. sanmarquina (Impr.)**, 2018.

AYALA, Guadalupe et al. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 6, p. 1450, 2014.

AYRES, Mariane CC et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BADKE, Colleen M. et al. Autonomic nervous system dysfunction in pediatric sepsis. **Frontiers in pediatrics**, v. 6, p. 280, 2018.

BADKE, Marcio Rossato et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.

BARBOSA, Jéssica Andréia Pereira et al. Gastroprotective effect of ethyl acetate extract from *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechman and underlying mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108582, 2019.

BARROS, Jaime et al. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. **Nature Plants**, v. 2, n. 6, p. 1-9, 2016.

BASTOS, Valéria Delgado. Inovação farmacêutica: padrão setorial e perspectivas para o caso brasileiro. 2005.

BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P. E. 1964-Piante medicinali. **Chimica Farmacologica e Terapia**, p. 1-2, 1962.

BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P. E. Piante medicinali, chimica, farmacologia e terapia, vol. I. **Milano: Inverni e Della Beffa**, 1962.

BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BOLTIN, Doron; NIV, Yaron. Pharmacological and alimentary alteration of the gastric barrier. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 6, p. 981-994, 2014.

BONAMIN, Flavia et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-biological interactions**, v. 212, p. 11-19, 2014.

BRADLEY, Peter P.; CHRISTENSEN, Robert D.; ROTHSTEIN, Gerald. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. 1982.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRASIL; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2ª Edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2021.

BRASSEUR, Thierry; ANGENOT, Luc. Flavonol glycosides from leaves of *Strychnos variabilis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 563-564, 1986.

BRUNEEL, Johan; D'ESTE, Pablo; SALTER, Ammon. Investigating the factors that diminish the barriers to university–industry collaboration. **Research policy**, v. 39, n. 7, p. 858-868, 2010.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e. **Pharmacotherapy of the Epilepsies, Valproic Acid**, 2011.

BUCAR, Franz; WUBE, Abraham; SCHMID, Martin. Natural product isolation—how to get from biological material to pure compounds. **Natural product reports**, v. 30, n. 4, p. 525-545, 2013.

BUCCIARELLI, Alejandro et al. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1025-1030, 2010.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

CASALI, Jairo Júnior et al. Epidemiological analysis and use of rapid urease test in patients with perforated peptic ulcers. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 2, p. 93-98, 2012.

CASTELO-BRANCO, Vanessa Naciuk; TORRES, Alexandre Guedes. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173-187, 2011.

CHATTERJEE, Arijit Kumar et al. A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against *E. coli*. **Nanotechnology**, v. 23, n. 8, p. 085103, 2012.

CHAUHAN, Rajinder Singh; SOOD, Archit. Comparative genomics in Euphorbiaceae. In: **Jatropha, challenges for a new energy crop**. Springer, New York, NY, 2013. p. 351-374.

CHESBROUGH, Henry. **Open business models: How to thrive in the new innovation landscape**. Harvard Business Press, 2006.

CHIAPPE PULIDO, Andrea Carolina. Estudio fitoquímico de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeanus* (Euphorbiaceae). **Departamento de Química**, 2013.

CHOBOT, Vladimir et al. Pro-and antioxidant activity of three selected flavan type flavonoids: catechin, eriodictyol and taxifolin. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, p. 1986, 2016.

COELHO-DE-SOUZA, Andreina N. et al. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 288-298, 2013.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M. D.; SODRÉ, R. C.; MARTINS, M. L. L. Manihot in Lista de espécies da flora do Brasil, v. 6, 2015. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17591>. Acesso em: 08 mar. 2019.

CORDEIRO, Kátia Wolff et al. Antiulcerogenic effect of Croton urucurana Baillon bark. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 331-337, 2012.

COSTA, Cíntia Reis; PARANHOS, Julia; VASCONCELLOS, Alexandre. Brasil, Índia e China: o marco legal da biodiversidade e a proteção patentária no âmbito do sistema farmacêutico de inovação. In: **XV Congresso Latino Iberoamericano de Gestão de Tecnologia**. 2013. p. 1-15.

CRAVEIRO, Afrânio A.; SILVEIRA, Edilberto R. Two cleistanthane type diterpenes from Croton sonderianus. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982.

CRUZ, Alessandro Teles da; PEREIRA, Joseanny Cardoso da Silva; MENDONÇA, Sara Raquel. STIMULATION OF LATEX PRODUCTION IN SERINGUEIRA (HEVEA BRASILIENSIS L.) WITH ETRHEL DOSES. **Revista Árvore**, v. 41, n. 5, 2017.

CUNHA, Sandra Lúcia et al. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de Croton linearifolius Mull. Arg.(Euphorbiaceae) sobre larvas de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae). **Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.

DA COSTA FILHO, Luiz Oliveira et al. Foliar cuticular n-alkane of some Croton species from Brazilian semiarid vegetation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 13-15, 2012.

DA SILVA BRITO, Sara Samanta et al. Croton argyrophyllus Kunth and Croton heliotropiifolius Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 308-315, 2018.

DA SILVA CARVALHO, Karine et al. Toxicological evaluation of essential oil from the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus*. **Parasitology research**, v. 115, n. 9, p. 3441-3448, 2016.

DA SILVA, Gabriel Araujo et al. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 1, 2014.

DAMASCENO, Samara RB et al. Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 320-328, 2013.

DATTA, Triparna; ROYCHOUDHURY, Uttam. SEM Imaging for Observation of Morphological Changes in Anaemic Human Blood Cell. In: **Advances in Optical Science and Engineering**. Springer, New Delhi, 2015. p. 359-362.

DE ALENCAR FILHO, José MT et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2017.

DE ALMEIDA, Cynthia Layse Ferreira et al. *Spondias purpurea* L.(Anacardiaceae): antioxidant and antiulcer activities of the leaf hexane extract. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

DE ALMEIDA, Thiago Silva et al. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.

DE ANDRADE, Sérgio Faloni et al. Antiulcerogenic activity of fractions and 3, 15-dioxo-21 α -hydroxy friedelane isolated from *Maytenus robusta* (Celastraceae). **Archives of pharmacal research**, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2008.

DE CASTRO COITINHO, Rodrigo Leandro Braga et al. Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 176-182, 2006.

DE FARIAS, Sabrina Queiroz; MEDEIROS, Débora; RIINA, Ricarda. A new species of dragon's blood Croton (Euphorbiaceae) from Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brazil). **PhytoKeys**, v. 126, p. 13, 2019.

DE FREITAS, Pedro Henrique Santos et al. Extratos glicólicos de “ora-pro-nobis”(Pereskia aculeata Miller): Avaliação do teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 1748-1760, 2021.

DE LA IGLESIA, Rocío et al. Healthy properties of proanthocyanidins. **Biofactors**, v. 36, n. 3, p. 159-168, 2010.

DE MORAIS, Selene Maia et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670-675, 2007.

DI CAMILLO ORFALI, Guilherme et al. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. **World journal of clinical oncology**, v. 7, n. 2, p. 189, 2016.

DI MARIO, Francesco; GONI, Elisabetta. Gastric acid secretion: changes during a century. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 6, p. 953-965, 2014.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rats. **Scand J Gastroenterol**, v. 4, p. 265-267, 1969.

DÓRIA, Grace AA et al. A study of the larvicidal activity of two Croton species from northeastern Brazil against Aedes aegypti. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

DRAPER, H. H; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DUARTE, Noélia; LAGE, Hermann; FERREIRA, Maria-José U. Three new jatrophane polyesters and antiproliferative constituents from Euphorbia tuckeyana. **Planta medica**, v. 74, n. 01, p. 61-68, 2008.

ERCAN, Gulcin et al. Potent therapeutic effects of ruscogenin on gastric ulcer established by acetic acid. **Asian journal of surgery**, v. 43, n. 2, p. 405-416, 2020.

ESPADERO, Mónica et al. Evaluación Microbiológica Y Composición Química De Extractos Orgánicos De Euphorbia aff. viridis (klotzsch & garcke) boiss sobre staphylococcus aureus, klebsiella pneumoniae y Escherichia coli. **LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida**, v. 29, n. 1, p. 119-129, 2019.

EUPHORBIACEAE in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>. Acesso em: 07 ago. 2020.

EVERHART, James E. Recent developments in the epidemiology of Helicobacter pylori. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 559-578, 2000.

FAGUNDES NETO, Ulysses. Gastrites. Instituto de Gastroenterologia de Pediátrica de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em:< <https://tecnoblog.net/responde/referencia-site-abnt-artigos/>>. Acesso em: 16 de mar. de 2022.

FARRÉ, Ricard; TACK, Jan. Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. **American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 5, p. 698-706, 2013.

FERREIRA, Juliana Carvalho; PATINO, Cecilia Maria. O que realmente significa o valor-p?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, p. 485-485, 2015.

FORTE, John G.; FORTE, Gertrude M.; SALTMAN, Paul. K+-stimulated phosphatase of microsomes from gastric mucosa. **Journal of cellular physiology**, v. 69, n. 3, p. 293-304, 1967.

GAŁECKI, Piotr et al. COX-2 gene expression is correlated with cognitive function in recurrent depressive disorder. **Psychiatry research**, v. 215, n. 2, p. 488-490, 2014.

GALURA, Gian M. et al. Gastroduodenal injury: role of protective factors. **Current gastroenterology reports**, v. 21, n. 8, p. 1-7, 2019.

GARAYEV, Elnur et al. Bioassay-guided isolation and UHPLC-DAD-ESI-MS/MS quantification of potential anti-inflammatory phenolic compounds from 100lowers of *Inula montana* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 226, p. 176-184, 2018.

GOLDSTEIN, Jay L.; CRYER, Byron. Gastrointestinal injury associated with NSAID use: a case study and review of risk factors and preventative strategies. **Drug, healthcare and patient safety**, v. 7, p. 31, 2015.

GOMES, Thiago Bezerra; BANDEIRA, Fábio Pedro Souza de Ferreira. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 796-809, 2012.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica animal. **Porto Alegre: Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2003.

GOVAERTS, Rafaël et al. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

GREEN, Laura C. et al. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

HARBORNE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. springer science & business media, 1998.

HAVENS, Joaquim M. et al. Malnutrition at intensive care unit admission predicts mortality in emergency general surgery patients. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 156-163, 2018.

HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HSIA, Ning-Yi et al. Increased risk of peptic ulcer in patients with early-onset cataracts: A nationwide population-based study. **Plos one**, v. 13, n. 11, p. e0207193, 2018.

HUANG, F.-M. et al. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells is related to intracellular glutathione levels. **International endodontic journal**, v. 43, n. 12, p. 1091-1097, 2010.

JENKS, PJ; KUSTERS, JG. Pathogenesis and virulence of *Helicobacter pylori*. **Currnet Opinion Gastroenterology**, v.16, n.1(suppl.), p. S11-8, 2000.

JEWELL R. Carbenoxolone. In Enna SJ, Bylund DB (eds.). *xPharm: Compr Pharmacol Ref*. 2007. Elsevier Inc., p. 1- 5.

JÚNIOR, Francisco EB et al. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

KANGWAN, Napapan et al. Quality of healing of gastric ulcers: natural products beyond acid suppression. **World journal of gastrointestinal pathophysiology**, v. 5, n. 1, p. 40, 2014.

KATZUNG, Bertam G. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KAVITT, Robert T. et al. Diagnosis and treatment of peptic ulcer disease. **The American journal of medicine**, v. 132, n. 4, p. 447-456, 2019.

KHALED-KHODJA, Nabyla; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, Lila; MADANI, Khodir. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. **Industrial crops and products**, v. 61, p. 41-48, 2014.

KIM, Hyung-Ho et al. Long-term results of laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: a large-scale case-control and case-matched Korean multicenter study. 2014.

KOIZUMI, Wasaburo et al. Addition of docetaxel to S-1 without platinum prolongs survival of patients with advanced gastric cancer: a randomized study (START). **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, n. 2, p. 319-328, 2014.

KOMEN, N. A. P. et al. Helicobacter genotyping and detection in peroperative lavage fluid in patients with perforated peptic ulcer. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 12, n. 3, p. 555-560, 2008.

KUMAR, Vinay; SHARMA, Neha; MAITRA, S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 7, n. 4, p. 243-256, 2017.

KUSHIMA, Hélio et al. Davilla elliptica and Davilla nitida: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-Helicobacter pylori action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 430-438, 2009.

KUSHIMA, Hélio. Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de Davilla elliptica St. Hill. e Davilla nitida (Vahl) Kubitzki (DILLENIACEAE). 2006.

KUSKOSKI, E. Marta et al. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutas. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KUSTERS, Johannes G.; VAN VLIET, Arnoud HM; KUIPERS, Ernst J. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 449-490, 2006.

KWIECIEN, S. et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 5, p. 613-622, 2014.

LAINÉ, Loren; TAKEUCHI, Koji; TARNAWSKI, Andrzej. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LANAS, Angel; CHAN, Francis KL. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 613-624, 2017.

LEOW, AH-R. et al. Time trends in upper gastrointestinal diseases and Helicobacter pylori infection in a multiracial Asian population—a 20-year experience over three time periods. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 43, n. 7, p. 831-837, 2016.

LI, Hua-Bin et al. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.

LIANG, Jiali et al. Prophylactic efficacy of patchoulene epoxide against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Chemico-biological interactions**, v. 283, p. 30-37, 2018.

LIMA, Letícia Ribes de; PIRANI, José Rubens. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae ss). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 0-0, 2008.

LIU, Zehou et al. Regulation, evolution, and functionality of flavonoids in cereal crops. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 11, p. 1765-1780, 2013.

LONGHINI, Renata et al. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p. 254-271, 2017.

LOPES, Daíse et al. Essential oil from leaves of *Croton sacaquinha* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 1, p. 48-49, 2003.

LOPES, Elton Luz et al. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2169-2172, 2012.

LUCENA, M. F. A. Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae–Euphorbiaceae) nas zonas do litoral e da Mata do estado de Pernambuco–Brasil. **Estudos taxonômicos do gênero Croton L. (Crotonoideae–Euphorbiaceae) nas zonas do Litoral e da Mata do estado de Pernambuco–Brasil**, 2000.

LUCENA, Maria de Fátima de Araújo; ALVES, Marccus. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae sl do Nordeste do Brasil. **Hoehnea**, v. 37, n. 1, p. 71-85, 2010.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.

MAGALHÃES, C. R. I. et al. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1150-1158, 2015.

MAGIEROWSKI, Marcin et al. Endogenous prostaglandins and afferent sensory nerves in gastroprotective effect of hydrogen sulfide against stress-induced gastric lesions. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0118972, 2015.

MAGIEROWSKI, Marcin et al. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9099-9123, 2015.

MAHBOUBI, Mohaddese; KAZEMPOUR, Nastaran; TAGHIZADEH, Mohsen. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of *Vaccinium arctostaphylos* L. extracts. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 3, n. 4, p. 241-247, 2013.

MATULJA, Dario et al. Anticancer Activities of Marine-Derived Phenolic Compounds and Their Derivatives. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1449, 2022.

MATSUDA, Hisashi; LI, Yuhao; YOSHIKAWA, Masayuki. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. PL27-PL32, 1999.

MELO, E. de A.; ANDRADE, RAM de S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro Bioactive compounds and antioxidant potential from the "umbuzeiro" fruits. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 453-458, 2010.

MOLEIRO, Fábio Cruz et al. Mouriri elliptica: validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 359-368, 2009.

MONTEIRO, Julio Marcelino et al. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

MORIMOTO, Yasuo et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 495-505, 1991.

MOSMANN, T. R.; FONG, T. A. T. Specific assays for cytokine production by T cells. **Journal of immunological methods**, v. 116, n. 2, p. 151-158, 1989.

MOTTA, Lucimar B. et al. Flavonoids and the taxonomy of Camarea (Malpighiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 3, p. 201-205, 2009.

MWINE, Julius T.; VAN DAMME, Patrick. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of medicinal plants research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

NAJM, Wadie I. Peptic ulcer disease. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 38, n. 3, p. 383-394, 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—eighth edition. NCCLS document M2–A8. Wayne (PA): The Committee; 2003.

NJOYA, Emmanuel Mfotie; ELOFF, Jacobus N.; MCGAW, Lyndy J. Croton gratissimus leaf extracts inhibit cancer cell growth by inducing caspase 3/7 activation with additional anti-inflammatory and antioxidant activities. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

OBEY, Jackie K. et al. Antimicrobial activity of Croton macrostachyus stem bark extracts against several human pathogenic bacteria. **Journal of pathogens**, v. 2016, 2016.

OCDE. Manual de Oslo: Diretrizes para a Coleta e Interpretação de Dados sobre Inovação. Rio de Janeiro: **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)**, 2004.

OECD. Guideline for testing of chemicals 423: **Acute oral toxicity**, p. 14, 2001.

- OKIGBO, R. N.; ANUAGASI, C. L.; AMADI, J. E. Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. **Journal of medicinal plants Research**, v. 3, n. 2, p. 086-095, 2009.
- OLIVEIRA, Diogo Gallo. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de Caatinga em Sergipe. **Scientia Plena**, v. 9, n. 4, 2013.
- ONASANWO, S. A. et al. Anti-ulcerogenic and in vitro antioxidant activities of Lagenaria breviflora (LB) whole fruit ethanolic extract in laboratory animals. **Pharmacognosy research**, v. 3, n. 1, p. 2, 2011.
- ORLANDINI, Priscila; LIMA, Letícia Ribes de. Sinopse do gênero Manihot Mill.(Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 51-60, 2014.
- PALLE, Suresh; KANAKALATHA, A.; KAVITHA, Ch N. Gastroprotective and antiulcer effects of Celastrus paniculatus seed oil against several gastric ulcer models in rats. **Journal of dietary supplements**, v. 15, n. 4, p. 373-385, 2018.
- PARANHOS, J.; PINTO, M. Interação entre Empresas e Instituições de Ciência e Tecnologia no Sistema Farmacêutico de Inovação Brasileiro: estrutura, conteúdo e dinâmica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- PEKAL, Anna; PYRZYNSKA, Krystyna. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, 2014.
- PÉRICO, Larissa Lucena et al. Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 265, 2020.
- PIMANOV, S. I.; MAKARENKO, E. V. Potentialities of a serological method in diagnosis of atrophic gastritis. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 80, n. 2, p. 15-21, 2008.
- PINCHUK, I. et al. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and physics of lipids**, v. 165, n. 6, p. 638-647, 2012.
- POULSEN, A. H. et al. Proton pump inhibitors and risk of gastric cancer: a population-based cohort study. **British journal of cancer**, v. 100, n. 9, p. 1503-1507, 2009.

PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QUEIROZ, Marcos Marçal Ferreira et al. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. lxxxviii-xciii, 2014.

RAMADAN, Mohamed Fawzy; MOERSEL, Joerg-Thomas. Screening of the antiradical action of vegetable oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 8, p. 838-842, 2006.

RAMOS, Freddy et al. Ent-3, 4-seco-labdane and ent-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2406-2410, 2008.

RAMOS, José Mirabeau O. et al. Chemical constituents and potential anti-inflammatory activity of the essential oil from the leaves of *Croton argyrophyllus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 644-650, 2013.

RAMSAY, Philip T.; CARR, Aaron. Gastric acid and digestive physiology. **Surgical Clinics**, v. 91, n. 5, p. 977-982, 2011.

RANDAU, K. P. et al. Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* HBK and *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RASBAND, Wayne S. ImageJ software. **National Institutes of Health: Bethesda, MD, USA**, v. 2012, 1997.

RASHEED, Naila et al. Differential response of A 68930 and sulpiride in stress-induced gastric ulcers in rats. **European journal of pharmacology**, v. 643, n. 1, p. 121-128, 2010.

RAZA, M. et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 70:135- 145, 2002.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

RIOS, Emiliano Ricardo Vasconcelos et al. Mechanisms involved in the gastroprotective activity of esculin on acute gastric lesions in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 1, p. 246-254, 2010.

ROBERTS, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. The phenolic substances of manufactured tea. I.—fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 2, p. 72-80, 1957.

ROCHA, Bárbara S. et al. Diffusion of nitric oxide through the gastric wall upon reduction of nitrite by red wine: physiological impact. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 3, p. 235-241, 2010.

ROCHA, Nayrton Flávio Moura et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 384, n. 6, p. 525-533, 2011.

RODRIGUES, P. A. et al. Atividade antioxidante e gastro-protetora de produtos naturais em animais experimentais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 116-123, 2008.

ROLLINGER, J. M.; LANGER, T.; STUPPNER, H. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 1491-1507, 2006.

ROMERO-TRUJILLO, Jorge Oswaldo et al. Sistema nervioso entérico y motilidad gastrointestinal. **Acta pediátrica de México**, v. 33, n. 4, p. 207-214, 2012.

ROQUE, Alan de Araújo; ROCHA, Renato de Medeiros; LOIOLA, Maria Iracema Bezerra. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria L. Faria; NEGRI, Giuseppina. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SÁNCHEZ-MENDOZA, María Elena et al. Gastroprotection of calein D against ethanol-induced gastric lesions in mice: Role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 622, 2019.

SANTIN, José Roberto et al. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae)(Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 334-339, 2010.

SANTIN, José Roberto et al. 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. e76894, 2013.

SANTOS, Flávia Cassia Maria dos. O cenário da inovação e indústria farmacêutica: estudo de caso do Departamento de Farmácia da UFPE. 2020.

SANTOS, Hércio S. et al. Chemical composition and cholinesterase inhibition of essential oils of three chemotypes from *Croton zehntneri*. **Revista latinoamericana de química**, v. 38, n. 1, p. 45-51, 2010.

SANTOS, Natália Cardoso et al. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, 2010.

SANTOS, Rogério Nunes dos; SILVA, Maria Goretti de Vasconcelos; BRAZ FILHO, Raimundo. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae): Chemical constituents isolated from the wood of *Senna reticulata* Willd. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1979-1981, 2008.

SARAIVA, Manuele Eufrazio et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.

SÁTIRO, Larissa Nascimento; ROQUE, Nádia. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of functional foods**, v. 14, p. 111-125, 2015.

SCHUBERT, Mitchell L. Gastric secretion. **Current opinion in gastroenterology**, v. 27, n. 6, p. 536-542, 2011.

SCHUBERT, Mitchell L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 578-582, 2014.

SCHUBERT, Mitchell L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. **Current opinion in gastroenterology**, v. 31, n. 6, p. 479-485, 2015.

SCHUBERT, Mitchell L. Gastric acid secretion. **Current opinion in gastroenterology**, v. 32, n. 6, p. 452-460, 2016.

SCHUBERT, Mitchell L. Physiologic, pathophysiologic, and pharmacologic regulation of gastric acid secretion. **Current opinion in gastroenterology**, v. 33, n. 6, p. 430-438, 2017.

SCHUCHARDT, Ulf; RIBEIRO, Marcelo L.; GONÇALVES, Adilson R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEIDEL, Heinz et al. Effect of different types of elemental sulfur on bioleaching of heavy metals from contaminated sediments. **Chemosphere**, v. 62, n. 9, p. 1444-1453, 2006.

SENDRA, Jose M.; SENTANDREU, Enrique; NAVARRO, Jose L. Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 5, p. 615-624, 2006.

SHABBIR, Maria; KHAN, Muhammad Rashid; SAEED, Naima. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2013.

SHEH, Alexander; FOX, James G. The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Gut microbes**, v. 4, n. 6, p. 505-531, 2013.

SHIRIN, Haim et al. *Helicobacter pylori* decreases gastric mucosal glutathione. **Cancer letters**, v. 164, n. 2, p. 127-133, 2001.

SHIVAKUMAR, M. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using pre-hydrolysis liquor of *Eucalyptus* wood and its effective antimicrobial activity. **Enzyme and microbial technology**, v. 97, p. 55-62, 2017.

SIDAHMED, Heyam Mohamed Ali et al. Anti-ulcerogenic activity of dentatin from *clausena excavata* Burm. f. against ethanol-induced gastric ulcer in rats: possible role of mucus and anti-oxidant effect. **Phytomedicine**, v. 55, p. 31-39, 2019.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SILVA, Jéssica de Andrade Gomes et al. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017.

SILVA, Juliana Santos et al. Sinopse das espécies de Croton L.(Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA, Juliana Santos; SALES, Margareth Ferreira de. Mimosa L.(Leguminosae-Mimosoideae) in the microrregion of Ipanema Valley, Pernambuco. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 435-448, 2008.

SILVA, Juliana Santos; SALES, Margareth Ferreira de; CARNEIRO-TORRES, Daniela Santos. O gênero Croton (Euphorbiaceae) na microrregião do vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 879-901, 2009.

SILVA, Simoni Lobato da et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de Parahancornia amapa (Apocynaceae). **Acta amazônica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SOARES, Pedro MG et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91-98, 2008.

SODRÉ, Rodolfo Carneiro; SILVA, Marcos José da; SALES, Margareth Ferreira de. Croton L. (Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 1, p. 221-234, 2014.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, Willer M. et al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae Solieria filiformis: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate polymers**, v. 152, p. 140-148, 2016.

SOUZA, Pierre Farias de et al. Estudos fitossociológicos e dendrométricos em um fragmento de caatinga, São José de Espinharas-PB. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p. 1317-1330, 2016.

STERMER, Edy. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. **IMAJ-RAMAT GAN**-, v. 4, n. 3, p. 200-202, 2002.

STOPPA, Marcos Aurélio et al. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

STRAND, Daniel S.; KIM, Daejin; PEURA, David A. 25 years of proton pump inhibitors: a comprehensive review. **Gut and liver**, v. 11, n. 1, p. 27, 2017.

SUHARTONO, Eko et al. Total flavonoid and antioxidant activity of some selected medicinal plants in South Kalimantan of Indonesian. **APCBEE Procedia**, v. 4, p. 235-239, 2012.

SUN, Baoshan; RICARDO-DA-SILVA, Jorge M.; SPRANGER, Isabel. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4267-4274, 1998.

SZABO, Sandor. "Gastric cytoprotection" is still relevant. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 29, p. 124-132, 2014.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, Aleksandra et al. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 899-905, 2008.

TAKEUCHI, Hiroya et al. Laparoscopy-assisted proximal gastrectomy with sentinel node mapping for early gastric cancer. **World journal of surgery**, v. 35, n. 11, p. 2463-2471, 2011.

TANAKA, Toru; KAWASE, Masami; TANI, Satoru. Urease inhibitory activity of simple α , β -unsaturated ketones. **Life Sciences**, v. 73, n. 23, p. 2985-2990, 2003.

TANG, Si-Yuan et al. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 708-718, 2007.

TARNAWSKI, Andrzej; AHLUWALIA, Amrita; K JONES, Michael. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of

gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 1, p. 126-132, 2013.

TEO, Steve et al. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

THOLEN, Daniel W. et al. **Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline**. Wayne, PA: CLSI, 2003.

TOFOVIC, Stevan P.; JACKSON, Edwin K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999.

TOLKE, Elisabeth et al. Flora vascular de um inselbergue no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 39-48, 2011.

TRINDADE, MJ de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

TURNER, J. R. O Trato Gastrointestinal. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

VAGHASIYA, Y. K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* boiss extract in mice. **J Pharmacol Toxicol**, v. 6, n. 2, p. 113-23, 2011.

VALLE, J. D. Doenças ulcerosa péptica e distúrbios relacionados. In LONGO, D. L. et al. *Gastrenenterologia e hepatologia de Harrison*. Porto Alegre: AMGH, 2 ed., cap.14, p. 99-121, 2015.

VAN EE, Benjamin W.; BERRY, Paul E. A phylogenetic and taxonomic review of *Croton* (Euphorbiaceae ss) on Jamaica including the description of *Croton jamaicensis*, a new species of section *Eluteria*. **Systematic Botany**, v. 34, n. 1, p. 129-140, 2009.

VEZZA, Teresa et al. Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 211, 2016.

VIDAL, Cinara Soares et al. Gastroprotective effect and mechanism of action of Croton rhamnifolioides essential oil in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 47-55, 2017.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.

WALLACE, John L.; MILLER, Mark JS. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512-520, 2000.

WANG, Hui-Ju et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. **European journal of cancer**, v. 46, n. 12, p. 2295-2303, 2010.

WEEKS, David L.; SACHS, George. Sites of pH regulation of the urea channel of Helicobacter pylori. **Molecular microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1249-1259, 2001.

WILSON, Rickesha L.; STEVENSON, Christina E. Anatomy and physiology of the stomach. In: **Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set**. Content Repository Only!, 2019. p. 634-646.

WOOLF, Andrew; ROSE, Robert. Gastric ulcer. **StatPearls. Treasure Island (FL)**, 2019.

WU, Xianli et al. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food composition and analysis**, v. 17, n. 3-4, p. 407-422, 2004.

XU, Wen-Hui; LIU, Wei-Yi; LIANG, Qian. Chemical constituents from Croton species and their biological activities. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2333, 2018.

YANDRAPU, Harathi; SAROSIEK, Jerzy. Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: an overview. **Current gastroenterology reports**, v. 17, n. 6, p. 1-8, 2015.

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

APÊNDICE A – Capítulo de Livro**Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato hexânico de
Croton heliotropiifolius Kunth****II CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE ÚNICA
(INTERFACE MUNDIAL) (ONLINE)**

**Jéssica de Andrade Gomes Silva¹, Rayane Siqueira de Sousa¹, Elizabeth
Fernanda de Oliveira Borba¹, Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos¹,
Maria Gabriela Oliveira de Sousa¹, Stella de Jesus Lourenço da Silva¹, Teresinha
Gonçalves da Silva¹**

¹Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

[\(jessica.andrade.gs@gmail.com\)](mailto:jessica.andrade.gs@gmail.com)

Resumo

A utilização de produtos de origem natural vem crescendo ao longo dos anos, no entanto, o uso indiscriminado associado a utilização inadequada, podem ocasionar efeitos nocivos à saúde. A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth tem sido usada pela população para o alívio da dor de estômago, na disenteria e como antitérmico. Assim, visando garantir a segurança do uso da espécie, este estudo objetiva avaliar o efeito toxicológico agudo do extrato hexânico de *C. heliotropiifolius* em modelo animal. O extrato hexânico *C. heliotropiifolius* (EHCh) foi obtido pelo método de maceração em temperatura ambiente. A toxicidade aguda foi avaliada em camundongos swiss (*Mus musculus*) fêmeas após dose única de 2000 mg/kg do EHCh por via oral (gavagem), segundo o guia da OECD n°423 (2001). A Ingestão de água, ração, massa corporal, alterações comportamentais e mortalidade foram registradas após a administração do extrato e diariamente durante 14 dias. Ao fim do experimento, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas para análises de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e seus órgãos (cérebro, pulmão, coração, rins, baço, fígado e estômago) foram submetidos à análise macroscópica. Todos os dados numéricos foram avaliados por meio do teste “t” de

Student não pareado (unpaired t test) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. Os resultados mostraram que o EHCh não causou mortes nos animais. Também não foram constatados sinais de mudanças comportamentais ou alterações significativas nos parâmetros de toxicidade. Portanto, o EHCh está classificado na categoria 5 (substância com DL_{50} superior a 2000 mg/kg) do *Guideline 423* da OECD. Contudo, pode concluir que o extrato hexânico de *C. heliotropiifolius* não causou sinais evidentes de toxicidade aguda nos animais testados, porém, ainda assim, se faz necessário estudos adicionais para o seu uso como produto vegetal.

Palavras-chave: Produtos naturais. Toxicologia. Fitoterapia.

Área Temática: Fitoterápicos.

INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como terapia é uma prática milenar da medicina popular (YANG *et al.*, 2014). O emprego destes produtos de origem natural, ou fitoconstituintes, vem crescendo ao longo dos anos, no entanto, o uso indiscriminado associado a utilização inadequada, sem conhecimento sobre vias de administração, dose e tempo de tratamento, podem ocasionar doenças (CARVALHO *et al.*, 2015; SECA; PINTO, 2019).

Diante disto, uma medida prioritária é a investigação da capacidade tóxica de produtos vegetais, pois muitos compostos presentes em suas constituições, além de possuírem propriedades farmacológicas, também são capazes de causar efeitos nocivos à saúde (FRESHNEY, 2000).

Testes de toxicidade são métodos que têm por finalidade avaliar o potencial tóxico de uma substância teste, quando administrada durante um período específico e seguido de monitoramento do modelo experimental (OECD, 2001). Estes testes, em geral, utilizam um número reduzidos de animais, quando comparados aos testes clássicos empregados no decorrer da história, e fornecem informações relevantes, como nível de letalidade (DIPASQUALE; HAYES, 2001), triagem comportamental com identificação de uma possível atividade do composto no Sistema Nervoso Central (SNC) bem como, indica possíveis efeitos do mesmo sob o metabolismo dos animais (ALMEIDA, 2006).

A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth constitui um dos principais representantes do gênero *Croton*, sendo, assim como o gênero, largamente utilizada em infusões medicinais (GOVAERTS *et al.*, 2000) e na composição de fitoterápico (LONGHINI *et al.*, 2017). Na medicina popular, a espécie vem sendo referida como útil no alívio da dor de estômago, na disenteria e como antitérmico (RANDAU *et al.*, 2004).

Diante do exposto e visando garantir a segurança do uso da espécie, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito toxicológico agudo do extrato hexânico de *C. heliotropiifolius* em modelo animal.

METODOLOGIA

Material vegetal

A espécie *C. heliotropiifolius* (Euphorbiaceae) foi coletada em fevereiro de 2019, no município de Garanhuns (PE). A identificação botânica foi realizada no Herbário do Instituto Agronômico de Pesquisa (IPA), com o número de catálogo 93034.

Animais

Foram utilizados camundongos swiss (*Mus musculus*), fêmeas, pesando entre 25-30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, *Campus* Recife, Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Presence, Brasil) e água a *ad libitum*. Os procedimentos experimentais tiveram a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE com o processo nº 135/2019.

Obtenção do extrato

As folhas coletadas de *C. heliotropiifolius* foram secas em estufa (40 °C), posteriormente trituradas em moinho de facas e submetidas à extração por maceração em hexano, com troca de solvente a cada 72 horas. Posteriormente, o conteúdo da extração foi filtrado e seco em evaporador rotativo sob pressão reduzida para a obtenção do extrato hexânico (EHCh).

Ensaio toxicológico não clínico agudo

O estudo de toxicidade aguda foi realizado em camundongos swiss fêmeas e seguiu as determinações descritas na OECD n°423 (2001).

Os camundongos foram separados em 2 grupos de 3 animais cada, onde o grupo teste recebeu EHCh (2000 mg/kg; via oral) e o grupo controle recebeu solução aquosa contendo Tween 20 a 1%, também por via oral. Após os tratamentos, os animais foram observados nas duas primeiras horas e depois a cada 24 horas durante 14 dias, a fim de estabelecer um *screening* hipocrático, com observações comportamentais, como disposição geral, efeitos no sistema motor, e outros efeitos sistema nervoso central e autônomo (**Figura 1**) (KUMAR *et al.*, 2017). Também foram avaliados padrões fisiológicos através do consumo de água, de alimento e a variação de massa corporal.

No 14º dia, após a última observação dos parâmetros fisiológicos, os animais foram submetidos a um jejum de 4 horas e anestesiados com cetamina/xilazina (0,2 mL/100 g e 0,1 mL/100g, respectivamente) para a coleta de sangue por punção cardíaca destinada à realização de exames hematológicos e bioquímicos. Os hemogramas foram realizados em contador hematológico ABX Pentra XL 80 Details – HORIBA e a dosagem dos parâmetros bioquímicos foram realizadas no equipamento Metrolab 2300 PLUS (Wiener lab). Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico e seus órgãos foram dissecados (cérebro, pulmão, coração, rins, baço, fígado e estômago), pesados e examinados macroscopicamente. O experimento foi repetido com a mesma dose (n =3 fêmeas), obtendo-se um número final de 6 animais por grupo, conforme recomendado pela OECD.

Figura 7-Screening hipocrático de camundongos tratados com EHCh.

OBSERVAÇÕES		5m	15m	30m	45m	1h	2h	24h	
EXCITÁRIOS	Peso inicial								
	Peso final								
	Agitação								
	Convulsões								
	Frêmito vocal								
	Irritabilidade								
	Movimentos esteriotipados								
	Resposta ao toque								
	Salivação								
	Taquicardia								
	Tremores								
	INIBITÓRIOS	Contorção abdominal							
		Estiramento							
		Ptose							
Sonolência									
Trem posterior									
Cianose									
Defecação									
Diarréia									
Lacrimejamento									
Micção									
Piloereção									
Óbito									

Fonte: Autores.

Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) e avaliados por meio do teste “t” de Student não pareado (unpaired t test). Foi utilizado o software *GraphPad Prism* (versão 8.0) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio toxicológico pré-clínico agudo, a administração da dose de 2000 mg/kg do EHCh em camundongos swiss fêmeas, não provocou nenhuma alteração aparente nos parâmetros comportamentais no *Screening* hipocrático, quando comparados ao grupo controle. As observações descritas na triagem comportamental auxiliam a investigação de uma possível ação a nível de SNC (QUINTANS-JÚNIOR, 2004).

Neste teste, não ocorreram mortes após a administração, nem durante o período de análise (14 dias). Portanto, o EHCh está classificado na categoria 5 (substância com DL_{50} superior a 2000 mg/kg) do *Guideline 423* (OECD, 2001).

Com relação ao consumo de ração e ganho de massa corporal (**Tabela 1**), foi verificado que o extrato não promoveu variações significativas quando comparados ao controle, entretanto, foi capaz de promover diferença estatística (** $p < 0,01$) no consumo de água. A regulação do consumo de água está intimamente relacionada a eliminação de eletrólitos e resíduos metabólicos (SILVA *et al.*, 2016), no entanto, alterações isoladas nesta variável, sem o comprometimento dos outros índices ponderais, não são capazes de atestar uma possível toxicidade.

Tabela 2- Efeito da administração oral de EHCh e solução aquosa de Tween 20 1% (controle) no consumo de água, ração e ganho de massa corporal dos camundongos fêmeas, durante 14 dias.

Parâmetros	Controle	EHCh
Consumo de água (mL)	29,93 ($\pm 5,77$)	24,21 ($\pm 4,64$)**
Consumo de ração (g)	19,57 ($\pm 2,17$)	18,79 ($\pm 2,00$)
Ganho de massa Corporal (g)	3,66 ($\pm 1,36$)	4,83 ($\pm 1,17$)

Legenda: Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student não pareado (unpaired t test), comparado com o grupo controle (n= 6). ** $p < 0,01$ (Teste “t” de student).

Na análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, também não foram identificadas alterações significativas no grupo tratado com EHCh, quando comparados ao controle (**Tabela 2 e 3**).

Tabela 3- Efeito da administração oral de EHCh e solução aquosa contendo 1% de Tween 20 (controle) nos parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas.

Parâmetros	Controle	EHCh
Hemácias ($10^6 / \text{mm}^3$)	8,53 ($\pm 0,63$)	7,36 ($\pm 1,14$)
Hemoglobina (g/dL)	12,82 ($\pm 1,12$)	12,57 ($\pm 1,74$)
Hematócrito (%)	37,92 ($\pm 4,92$)	36,63 ($\pm 5,40$)
Plaquetas ($10^3 / \text{mm}^3$)	873,30 ($\pm 183,90$)	731,10 ($\pm 151,20$)
Leucócitos Totais ($10^6 / \text{mm}^3$)	5033,00 ($\pm 326,60$)	5150,00 ($\pm 361,90$)
Neutrófilos ($10^3 / \text{mm}^3$)	7,50 ($\pm 1,04$)	8,33 ($\pm 2,58$)
Linfócitos ($10^3 / \text{mm}^3$)	77,83 ($\pm 6,68$)	83,33 ($\pm 4,18$)
Monócitos ($10^3 / \text{mm}^3$)	5,66 ($\pm 3,01$)	6,50 ($\pm 3,01$)
Eosinófilos ($10^3 / \text{mm}^3$)	1,67 ($\pm 0,82$)	1,83 ($\pm 0,75$)

Legenda: Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student não pareado (unpaired t test), comparado com o grupo controle (n= 6).

Tabela 4- Efeito da administração oral de EHCh e solução aquosa contendo 1% de Tween 20 (controle) nos parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas.

Parâmetros (mg/dL)	Controle	EHCh
AST/ TGO	241,20 (\pm 60,88)	240,80 (\pm 60,91)
ALT/ TGP	68,33 (\pm 7,92)	61,67 (\pm 9,79)
Ureia	39,67 (\pm 4,09)	45,33 (\pm 3,79)
Creatinina	0,53 (\pm 0,20)	0,54 (\pm 0,33)
Ácido Úrico	4,30 (\pm 1,17)	5,37 (\pm 2,37)

Legenda: Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student não pareado (unpaired t test), comparado com o grupo controle (n= 6).

Na avaliação do potencial tóxico agudo pré-clínico, os indicadores de toxicidade sistêmica são definidos considerando a redução do desenvolvimento ponderal e da massa corporal dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON 1999; RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002). Outros indicadores de toxicidade são expressos através de alterações hematológicas, bioquímicas e na massa relativa dos órgãos (GONZALEZ; SILVA 2003). Tais alterações não foram observadas em nosso estudo.

As características macroscópicas dos órgãos, juntamente com a massa constituem indicadores fisiológicos importantes, pois refletem alterações metabólicas causadas por substâncias tóxicas (VAGHASIYA; SHUKLA; CHANDA, 2011). Entretanto, em nossa investigação, estes parâmetros não sofreram alterações significativas quando comparados ao controle, exceto no estômago (* $p < 0,5$), porém esta alteração, isoladamente, não configura toxicidade (**Tabela 4**).

Tabela 5-Efeito da administração oral de EHCh e do controle composto por solução aquosa a 1% de Tween 20 na massa dos órgãos dos camundongos fêmeas.

Órgãos	Massa dos Órgãos (g)	
	Controle	EHCh
Cérebro	0,388 (\pm 0,04)	0,372 (\pm 0,03)
Pulmões	0,378 (\pm 0,09)	0,350 (\pm 0,03)
Coração	0,268 (\pm 0,05)	0,271 (\pm 0,02)
Rins	0,499 (\pm 0,12)	0,528 (\pm 0,02)
Baço	0,317 (\pm 0,06)	0,270 (\pm 0,06)
Fígado	2,430 (\pm 0,14)	2,208 (\pm 0,43)
Estômago	0,350 (\pm 0,07)	0,419 (\pm 0,03)*

Legenda: Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student não pareado (unpaired t test), comparado com o grupo controle (n= 6). *p< 0,5 (Teste “t” de student).

Os resultados deste trabalho apresentam informações importantes acerca da capacidade tóxica da espécie, visto que este é o primeiro estudo *in vivo* com o extrato hexano.

CONCLUSÃO

Tendo em vista os dados obtidos neste estudo é possível concluir que o extrato hexânico de *C. heliotropiifolius* não causou sinais evidentes de toxicidade aguda nos animais testados. Ainda assim, a ausência de sinais de toxicidade aguda neste tipo de modelo experimental não configura total segurança para a utilização terapêutica, sendo necessário estudos adicionais, como por exemplo, os que avaliem a toxicidade de doses repetidas ou crônica, o que agregará maiores informações e segurança para o seu uso como produto vegetal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., v.11, p. 131-137, 2006.

DE CARVALHO, Claudemir et al. Screening hipocrático de ratos tratados com extrato hidroetanólico de *Solanum auriculatum* AITON. **Revista Panorâmica online**, v. 18, p. 15–25, 2015.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. **Hayes, AW Principles and methods of toxicology**, v. 4, p. 853-916, 2001.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. John Wiley & Sons, 2015.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica animal. **Porto Alegre: Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2003.

GOVAERTS, Rafaël et al. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

KUMAR, Vinay; SHARMA, Neha; MAITRA, S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 7, n. 4, p. 243-256, 2017.

LONGHINI, Renata et al. Trichilia catigua: therapeutic and cosmetic values. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p. 254-271, 2017.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 423: Guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001.

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José et al. Toxicidade aguda e alterações comportamentais induzidas pela fração de alcalóides totais das vagens de Prosopis juliflora (Sw) DC (Leguminosae) em roedores. **Acta Farmacêutica**, v. 23, n. 1, p. 5-10, 2004.

RANDAU, K. P. et al. Estudo farmacognóstico de Croton rhamnifolius HBK e Croton rhamnifolioides Pax & Hoffm. (EUPHORBIACEAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, A.O.; EL-HADIYAH, T.M.; AL-MAJED, A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 70:135-145, 2002.

SECA, Ana ML; PINTO, Diana CGA. Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. 2019.

SILVA, Simoni Lobato da et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de Parahancornia amapa (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SILVA, Jéssica de Andrade Gomes et al. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017.

TEO, Steve et al. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TOFOVIC, Stevan P.; JACKSON, Edwin K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999.

VAGHASIYA, Y. K.; SHUKLA, V. J.; CHANDA, S. V. Acute oral toxicity study of *Pluchea arguta* boiss extract in mice. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 113-23, 2011.

YANG, H. et al. Alveolar bone regeneration potential of a traditional Chinese medicine, B u-S hen-G u-C hi-W an, in experimental periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 49, n. 3, p. 382-389, 2014.

APÊNDICE B – Artigo Publicado

JOURNAL OF BIOLOGY & PHARMACY AND AGRICULTURAL MANAGEMENT

BOTANICAL CONSIDERATIONS AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF THE SPECIES *Croton heliotropiifolius* Kunth (EUPHOBIACEAE): A LITERATURE REVIEW

Considerações botânicas e potencial biológico da espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth (Eupobiaceae): Uma revisão de literatura

Jéssica de Andrade Gomes Silva¹, Rayane Siqueira de Sousa², Elizabeth Fernanda de Oliveira Borba³, Katharina Rodrigues de Lima Porto Ramos², Marília Grasielly de Farias Silva¹, Teresinha Gonçalves da Silva⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

⁴Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

*Autor para Correspondência: jessica.andrade.gs@gmail.com

ABSTRACT

The species *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularly known as "velamen", constitutes an important representative of the genus *Croton* and the Family Euphorbiaceae. In this way, this review aimed to elucidate the geographic distribution, morphological characteristics, ethnomedicinal value, phytochemical composition and biological activities of the species. For that, consultations were carried out in the Lilacs, Pubmed, Scielo and Science direct databases, in the period from 2000 to 2021, where national and international articles were analyzed. With this consultation, it was possible to verify the neotropical

distribution of the species, having in Brazil occurring predominantly in the vegetation of the caatinga. Morphologically, *C. heliotropiifolius* presents itself as a sub-shrub to shrub up to two meters high. As for its ethnomedicinal value, it has been used mainly to relieve pain, gastric and intestinal problems and inflammation. The biological activities attributed to the species are related to the ability to inhibit acetylcholinesterase, antifungal, antibacterial activity, larvicidal capacity, insecticide and repellent, based on its chemical composition, which comprises several biologically active compounds. However, despite the population's use and knowledge about the species, many of its activities have not yet been investigated, thus motivating further studies. In this way, works like ours are an important tool for understanding the potential of the species, developing new research and using this plant resource in a more targeted and compatible way with its already recognized properties, which helps the planning of public policies and the insertion species in the arsenal of medicinal plants applied to health.

Keywords: velamen; caatinga; phytochemistry; ethnomedician.

RESUMO

A espécie *Croton heliotropiifolius* Kunth, popularmente conhecida como “velame”, “velaminho” e “velame-de-cheiro”, constitui um importante representante do gênero *Croton* e da Família Euphorbiaceae. Deste modo, esta revisão teve o objetivo de elucidar a distribuição geográfica, características morfológicas, valor etnomedicinal, composição fitoquímica e atividades biológicas da espécie. Para isto, foram realizadas consultas nas bases de dados *Lilacs*, *Pubmed*, *Scielo* e *Science direct*, no período de 2000 a 2021, onde foram analisados artigos nacionais e internacionais. Com esta consulta, foi possível constatar a distribuição neotropical da espécie, tendo no Brasil ocorrência predominante na vegetação da caatinga. morfologicamente, o *C. heliotropiifolius* apresenta-se como subarbusto a arbusto com até dois metros de altura. Quanto ao seu valor etnomedicinal, tem sido usado principalmente no alívio da dor, em problemas gástricos, intestinais e na inflamação. As atividades biológicas

atribuídas a espécie estão relacionadas à capacidade de inibição da acetilcolinesterase, atividade antifúngica, antibacteriana, capacidade larvicida, inseticida e repelente, fundamentadas em sua composição química, que compreende diversos compostos biologicamente ativos. Contudo, apesar do uso e conhecimento da população acerca da espécie, muitas de suas atividades ainda não foram investigadas, motivando assim novos estudos. Desta forma, trabalhos como o nosso constituem ferramenta importante para o entendimento das potencialidades da espécie, desenvolvimento de novas pesquisas e uso deste recurso vegetal de forma mais direcionada e compatível com suas propriedades já reconhecidas, o que auxilia o planejamento de políticas públicas e a inserção da espécie no arsenal de plantas medicinais aplicadas à saúde.

Palavras-chave: velame; caatinga; fitoquímica; etnomedicinal.

INTRODUCTION

The genus *Croton* is the second largest genus belonging to the Euphorbiaceae family. It has a predominantly pantropical distribution in America and comprises about 1,200 species, of which approximately 350 occur in Brazil (BERRY *et al.*, 2005). Numerous biological assays have been performed to verify the properties claimed by the popular use of this species, such as anti-inflammatory (RAMOS *et al.*, 2013), gastroprotective (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2013), wound healing (CAVALCANTI *et al.*, 2012) and anticancer activities (SYLVESTRE *et al.*, 2006).

Croton heliotropiifolius Kunth is a species endemic to the Brazilian Northeast region. It is popularly known as "velamen", "velaminho" and "velame-de-cheiro" due to its tiny trichomes. It can be found frequently in the Caatinga, but it also occurs in marshes, Restingas and Cerrado (COMPAGNONE *et al.*, 2010).

Studies focusing on *Croton heliotropiifolius* have reported a predominant presence of alkaloids, polyphenols and reducing compounds (SOUZA *et al.*, 2017). This species is reported as useful in relieving stomach pain and dysentery and as an antipyretic (RANDAU, 2001).

The species blossoms in May, June, July and November. The fruiting occurs in May and June (SILVA *et al.*, 2010). It differs from *C. campestris* by its concolorous leaves, inflorescences, glandular trichomes, smooth seeds and branches with dendritic trichomes (SÁTIRO *et al.*, 2008). The nomenclature of this species was *C. rhamnifolius*. Its name was changed to *C. heliotropiifolius* Kunth (GOVAERT *et al.*, 2000).

The objective of this literature review was to elucidate the geographic distribution, the morphological characteristics, the ethnomedicinal value, the phytochemical composition and the biologic activities of the species *C. heliotropiifolius* to contribute to the understanding of this species' potentialities and help to develop new studies using this plant resource in a more targeted way taking into account the already recognized properties of this plant.

METHODOLOGY

This study was elaborated from an integrative literature review in the digital databases Lilacs, Pubmed, Scielo and Science direct, in the period from 2000 to 2021, using the keywords “*Croton heliotropiifolius*” and “*Croton heliotropiifolius* Kunth”. 42 national and international articles were found, of which 25 were selected after checking the content. The other works were excluded because they portray studies of other species, because they are review articles, or because they are outside the context of this work.

RESULTS AND DISCUSSION

Geographic distribution

The species *Croton heliotropiifolius* has a wide distribution in neotropical regions. It can be found from Panama to Brazil (GOVAERTS *et al.*, 2000). In Brazil, it extends from the state of Minas Gerais to the Northeast region (LUCENA, 2000). It occurs predominantly in the Caatinga, Brejos, Restingas and the Cerrado (RANDAU *et al.*, 2004).

In the northwestern part of the state of Bahia, the so-called dunes of the middle course of São Francisco river form a sandy corridor along which the

Caatinga vegetation appear and where species belonging to the Euphorbiaceae family are found, including *Croton heliotropiifolius* (SÁTIRO *et al.*, 2008).

In Pernambuco, the species can be found in vacant lots, high Brejo areas, in the Mata Atlântica, Zona da Mata and the Caatinga (SILVA *et al.*, 2010). The presence of this species in the Rio Grande do Norte (ROQUE *et al.*, 2010), Paraíba (TOLKE *et al.*, 2011) and Goiás (SODRÉ *et al.*, 2014) states was also described.

Morphological characteristics

C. heliotropiifolius is a sub-shrub or shrub up to two meters high with a colorless, creamy to reddish latex. Its branches are cylindrical, green to grayish. There are small lanceolate stipules (1 mm). The leaves are alternate and slightly subopposite at the apex, sessile to petiolate, and greenish. The limbus has an ovoid membranaceous or charcoal consistency with an acute apex, a reentrant base, a serrated border. There are peni-nervous trichomes on both sides. The main vein protrudes on the dorsal surface. There is a marginal insertion of the petiole, which is slightly biconvex in the cross section. The flowers are arranged in terminal inflorescences; they are racemiform and congesta. The fruit is a capsule oblong to sub-globous. Seeds are elliptic to oblong, with a brown to black tegument (RANDAU *et al.*, 2004; SODRÉ *et al.*, 2014).

The species has dense stellate-porrect trichomes in vegetative and reproductive structures, providing a tomentose appearance. In general, it does not present nectaries on the petiole or, when present, they are inconspicuous, globose and often covered by trichomes (SÁTIRO *et al.*, 2008; SODRÉ *et al.*, 2014).

Ethnomedicinal properties

Biodiversity associated with cultural diversity leads populations to use plants differently (CREPALDI *et al.*, 2016). Ethnobotanical studies focus on the Euphorbiaceae family due to its different uses (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2009; CARTAXO *et al.*, 2010), including several species used in different situations. Particularly, the medicinal uses have been deemed the most significant for the genus *Croton* (CREPALDI *et al.*, 2016).

The species *C. heliotropiifolius* has been used in several medicinal treatments as shown in Table 1.

Table 1. Popular uses of the species *Croton heliotropiifolius*.

Popular use	Reference
Stomachache	RANDAU, 2001
Vomiting	RANDAU, 2001
Dysentery	RANDAU, 2001
Antipyretic	RANDAU, 2001
Flu	SARAIVA <i>et al.</i> , 2015
Pains	SARAIVA <i>et al.</i> , 2015
Inflammation	SARAIVA <i>et al.</i> , 2015
Skin diseases	SARAIVA <i>et al.</i> , 2015
Wound healing	CREPALDI <i>et al.</i> , 2016
Aphrodisiac	LONGHINI <i>et al.</i> , 2016

The use of *C. heliotropiifolius* in popular medicine is related to a medicinal potential attributed to the genus. In general, species belonging to this genus are often used as infusions or teas for pain relief (ABREU *et al.*, 2001), to treat intestinal dysfunctions, diarrhea, digestive disorders and infections, and wound healing (SALATINO *et al.*, 2007). This species has also been reported for the treatment of common health problems, such as influenza, inflammation, dermatitis and cysts (SARAIVA *et al.*, 2015).

The extract of *C. heliotropifolius* associated with extracts of *Trichilia catiguá* and *Paullinia cupana* Kunth comprises the most recent formulation of Catuama, a psychoanaleptic or stimulant medicine recorded at the National Sanitary Surveillance Agency as a herbal medicine and marketed by the Catarinense Laboratory in the form of capsules or as an oral solution (LONGHINI *et al.*, 2016).

Phytochemistry

The phytochemical profile of *C. heliotropiifolius* shows the main classes of

compounds present in species of the genus *Croton* and the family Euphorbiaceae. Based on the methanolic extract of leaves of this species, there was the presence of flavonoids and the absence of alkaloids, coumarins, saponins and condensed tannins (SILVA *et al.*, 2016). Polyphenols such as coumarins are rare substances in the Euphorbiaceae family. In the genus *Croton*, there is only scopoletin in *C. sonderianus* (CRAVEIRO; SILVEIRA, 1982). The absence of saponins is also reported for *Croton linearifolius* (SILVA *et al.*, 2014).

A phytochemical analysis of the ethanolic extract of the stem bark identified the alkaloid taspine and the diterpene acetate of velamolone (QUEIROZ *et al.*, 2014), a compound also described for *Croton campestris* A. St.-Hil. (EI BABILI *et al.*, 2006).

Studies on the chemical composition of the essential oil extracted from the leaves of *C. heliotropiifolius* showed α -pinene, sabinene, linalool, bornyl acetate, β -caryophyllene, germacrene D, δ -cadinene, α -humulene, bicyclogermacrene, espatulenol and eucalyptol as a main component. However, Silva Brito *et al.* (2018), in his study with the essential oil of the species, found Limonene, α -pinene, cariofilene, as major compounds. In the thallus of this species, there were *p*-cymene, α -pinene, eucalyptol, linalool, β -caryophyllene and germacrene D similar to those identified in its leaves (SILVA, 2008; ANGÉLICO *et al.*, 2012).

Biological activities

Due to the richness of the biologically active compounds present in *C. heliotropiifolius*, its biological potential has been evaluated. Some of the described biological activities are shown in Table 2.

Activity	Material	Reference
Larvicide	Essential oil	DÓRIA <i>et al.</i> , 2010.
Antifungal	Ethanolic extract	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2014.
Inhibition of Acetylcholinesterase	Ethanolic extract	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2014.
Insecticide	Essential oil	MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2015.
Repellent	Essential oil	MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2015.

Antibacterial	Essential oil	ALENCAR FILHO <i>et al.</i> , 2017.
Nematocidal	Aqueous extract	LIMA <i>et al.</i> , 2019.

Table 2. Biological Activities of the species *Croton heliotropiifolius*.

The essential oil of *C. heliotropiifolius* presented a relevant larvicidal effect against *Aedes aegypti*, which may represent a contribution to alternative methods of mosquito control (DÓRIA *et al.*, 2010).

The antifungal potential against *Candida albicans* and the acetylcholinesterase inhibitory activity of the *C. heliotropiifolius* ethanolic extract from the stem bark was described by Queiroz *et al.* (2014). In their study, the alkaloid taspine was identified, a compound reported as a strong acetylcholinesterase inhibitor (ROLLINGER *et al.*, 2006). The antifungal capacity against *Candida albicans* strains has also been described by Silva Brito *et al.* (2018). The identification of acetylcholinesterase inhibitor compounds may explain the insecticidal activity of the essential oil of this plant (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

Magalhães *et al.* (2015) also reported a repellent activity of the essential oil against *Tribolium castaneum*. This activity is an important property for pest control: the higher the repellency, the lower the infestations (COITINHO *et al.*, 2006).

The antimicrobial potential of *C. heliotropiifolius* against strains of *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* was described by Alencar Filho *et al.* (2017) and may justify the popular use of this species to treat disorders of the gastrointestinal tract. The species was also referred to as nematocidal against *Scutellonema bradys* in a study with the aqueous extract of leaves and stem (LIMA *et al.*, 2019).

CONCLUSION

The species *C. heliotropiifolius* has a wide medicinal value based on its chemical composition, which comprises several biologically active compounds. However, when compared to popular knowledge, many of its activities have not yet been studied. This motivates new studies. Studies such as this are important

tools to understand the potential of the properties of this species. New studies should be conducted using this vegetal resource in a more targeted way taking into account its already recognized properties. This helps to plan public policies and establish this species among the arsenal of medicinal plants applied to health.

REFERENCES

- ABREU, A. D. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). **Rev Virt Iniciação Científica**, v. 1, p. 1-9, 2001.
- ALBUQUERQUE, U.P.; OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 156-170, 2007.
- ALENCAR FILHO, J. M.; ARAÚJO, L. D. C.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; PACHECO, A. G.; SILVA, F. S.; ARAÚJO, E. C. D. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 27, P. 440-444, 2017.
- ANGÉLICO, E. C.; DA COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. **BioFar**, v. 7, p. 57-61, 2012.
- BERRY, P. E.; HIPPI, A. L.; WURDACK, K. J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.
- CARTAXO S.L.; SOUZA M.M.A.; ALBUQUERQUE U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.
- CAVALCANTI, J. M.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DINIZ, L. R. L.; PORTELLA, V. G.; COSTA, C. O.; LINARD, C. F. B. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 240-247, 2012.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; BARRETO, J. E.; YUM, M. E.; OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. D.; DE ALBUQUERQUE, A. A. Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 288-298, 2013.

COITINHO, R. L. B. C. Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 2009.

COMPAGNONE, R. S.; CHAVEZ, K.; MATEU, E.; ORSINI, G.; ARVELO, F.; SUÁREZ, A. I. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. **Records of Natural Products**, v. 4, n. 2, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; SILVEIRA, E. R. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2571-2574, 1982.

CREPALDI, C. G.; CAMPOS, J. L. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; SALES, M. F. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 157-165, 2016.

DA SILVA BRITO, S. S., SILVA, F., MALHEIRO, R., BAPTISTA, P., PEREIRA, J. A. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. **Industrial crops and products**, v. 113, p. 308-315, 2018.

DÓRIA, G. A.; SILVA, W. J.; CARVALHO, G. A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C. A study of the larvicidal activity of two *Croton* species from northeastern Brazil against *Aedes aegypti*. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 6, p. 615-620, 2010.

EL BABILI, F.; FABRE, N.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 384-387, 2006.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)**. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

LIMA, R. D. S., MUNIZ, M. D. F. S., COSTA, J. G. D., SILVA, K. B. D., BEHLING, A. Extratos aquosos de *Annona* spp. e *Croton heliotropiifolius* sobre *Scutellonema bradys* e prospecção química dos compostos. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 223-224, 2019.

LONGHINI, R.; LONNI, A. A.; SEREIA, A. L.; KRZYZANIAK, L. M.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. *Trichilia catigua*: therapeutic and cosmetic values. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 254-271, 2017.

LUCENA, M. F. A. Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae – Euphorbiaceae) nas zonas do Litoral e da Mata do estado de Pernambuco – Brasil. 2000.

MAGALHÃES, C.; OLIVEIRA, C.; MATOS, C.; BRITO, S.; MAGALHÃES, T.; FERRAZ, M. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium*

castaneum em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1150-1158, 2015.

MELO, J. W. D. S.; DOMINGOS, C. A.; GONDIM JR, M. G.; DE MORAES, G. J. Can *Euseius alatus* DeLeon (Acari: Phytoseiidae) Prey on *Aceria guerreronis* Keifer (Acari: Eriophyidae) in Coconut Palm?. **Neotropical entomology**, v. 38, n. 1, p. 885-889, 2009.

NASCIMENTO, I. L.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. D. L. A.; PEREIRA, E.; GONÇALVES, P. N. Q. C.; DE MEDEIROS, M. S. Superação da dormência em sementes de faveira (*Parkia platycephala* Benth). **Revista Árvore**, v. 33, p. 33-45, 2009.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F. D.; ZERAIK, M. L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES-PIRES, C.; BOLZANI, V. D. S. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. lxxxviii-xciii, 2014.

RAMOS, J. M. D. O. Identificação dos constituintes químicos e estudo farmacológico do óleo essencial das folhas da *Croton argyrophyllus* Kunth. 2013.

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* HBK e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (EUPHORBIACEAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 89-96, 2004.

RANDAU, K.P. Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacoquímico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). 2001.

ROLLINGER, J. M.; LANGER, T.; STUPPNER, H. Strategies for efficient lead structure discovery from natural products. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 1491-1507, 2006.

ROQUE, A. D. A.; ROCHA, R. D. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 31-42, 2010.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 18, p. 11-33, 2007.

SARAIVA, M. E.; DE ALENCAR ULISSES, A. V. R.; RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA, L. G. S.; DE MACÊDO, D. G.; DE SOUSA, F. D. F. S.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 141-153, 2015.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 99-118, 2008.

SILVA, F. K. S. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Cróton rhamnifolius* (Euphorbiaceae). 2008.

SILVA, G. A.; DE BRITO, N. J. N.; DOS SANTOS, E. C. G.; LÓPES, J. A.; DAS GRAÇAS ALMEIDA, M. Gênero *Spondias*: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 1, 2014.

SILVA, J. A. G.; SILVA, G. C.; SILVA, T. M. S.; RANGEL, I. Estudo Fitoquímico das Folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). **Anais I Conbracis**. v. 1, 2016.

SILVA, J. S.; SALES, M. F. D.; GOMES, A. P. D. S.; CARNEIRO-TORRES, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 441-453, 2010.

SODRÉ, R. C.; SILVA, M.; SALES, M. *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, p. 221-234, 2014.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 99-102, 2006.

SOUZA, G. S. D.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. D.; BARBOSA, Y. P. Chemical composition and yield of essential oil from three *Croton* species. **Ciência Rural**, v. 47, 2017.

TOLKE, E.; SILVA, J. B.; PEREIRA, A. R. L.; DE MELO, J. I. M. Flora vascular de um inselbergue no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 39-48, 2011.

ANEXO A


 Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária

 PERNAMBUCO
ESTADO DO PERNAMBUCO

 HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 20/2019

	Nº de Tamba	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1	93034	Velame (de Garanhuns)	Euphorbiaceae	Croton <i>Heliotropisifolius</i> Kunth	F. Gallardo
2	93035	Velame (de Bezerros)	Euphorbiaceae	Croton <i>Heliotropisifolius</i> Kunth	F. Gallardo
3	93036	Velame (de Bezerros)	Euphorbiaceae	Croton <i>Heliotropisifolius</i> Kunth	F. Gallardo

Dr.^a Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbário IPA

Consulta: Jessica de Andrade Gomes Silva tel.: (81) 996239815.

Procedência: PE - Garanhuns – zona rural, Sítio Flamengo.

Coletor: Cibele Luiza Marques.

Data da coleta: 25/02/2019

Data da entrada no Laboratório: Abril de 2019

Determinada em: 11/04/2019

Obs.: Material botânico em estudo para fim de investigação farmacológica em Tese de Doutorado da aluna **Jessica de Andrade Gomes Silva**, pelo PPGIT da UFPE, sob orientação da ~~Prof.^a Dr.^a~~ Terezinha Gouçalves Silva.

Resultado encaminhado por e-mail: jessica.andrade.gs@gmail.com em 12.04.2019.

Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. São Martin, 1371 – Boa Viagem – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
CNPJ 10.912.253/0001-37 – FONE: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento

ANEXO B



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 17 de fevereiro de 2020

Ofício nº 06/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Teresinha Gonçalves da Silva**

Centro de Biociências

Departamento de Antibióticos/ UFPE

processo nº 135/2019

Certificamos que a proposta intitulada " **Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e gastropotetora das folhas de *Croton heliotropifolius* Kunth.** registrado com o **135/2019** sob a responsabilidade da **Prof. Teresinha Gonçalves da Silva** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 17/12/2019

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2019 a Dezembro/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss e Ratos heterogenico
Nº de animais	Camundongos(24) e Ratos heterogenico (204)
Peso/Idade	Camundongos 25g/60dias/ Ratos heterogenico 220g/80 dias
Sexo	Machos (204) e Femea (24)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 -Presidente CEUAUFPE
 SIAPE 2343691

