

**UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA**

BÁRBARA GOMES DEL REY

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA, FITOQUÍMICA E
ECOTOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA OBTIDA A PARTIR DAS
FOLHAS DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK**

SANTOS/SP

2016

BÁRBARA GOMES DEL REY

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA, FITOQUÍMICA E
ECOTOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO BUTANÓLICA OBTIDA A PARTIR DAS
FOLHAS DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação do Prof. Dr. Walber Toma.

SANTOS/SP

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Del Rey, Bárbara.

Avaliação da atividade antiulcerogênica, fitoquímica e ecotoxicológica da fração butanólica obtida a partir das folhas de *Bauhinia forficata* Link./ Bárbara Gomes Del Rey, 2016.

N. fls.80

Orientador: Prof. Dr. Walber Toma
Dissertação de Mestrado - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2016.

1. *Bauhinia forficata*. 2. Atividade antiulcerogênica. 3. Atividade antioxidante. 4. Avaliação ecotoxicológica. I - Toma, Walber. II - Avaliação da atividade antiulcerogênica, fitoquímica e ecotoxicológica da fração butanólica obtida a partir das folhas de *Bauhinia forficata* Link.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me abençoa em todos os caminhos percorridos.

Aos meus pais Milton Del Rey e Arlinda Ferreira Gomes Del Rey, e meu irmão, Rogério Gomes Del Rey, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido Alexandre Stipanich, incentivador e que me ajuda em todos os momentos difíceis.

Ao meu orientador prof. Dr. Walber Toma, sempre disposto a me ajudar, me ensinando, sendo paciente e compreensivo.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ecologia da Universidade Santa Cecília, por grande participação na minha formação, tanto como mestre, quanto para o meu crescimento pessoal.

À equipe do Laboratório de Ecotoxicologia da Unisanta, pelo auxílio durante as pesquisas.

À Sandra H. A. de Araújo e Imaculada Scorza, da Secretaria da Pós-Graduação stricto sensu, pela disposição em ajudar no que for preciso.

Aos meus colegas de curso, pelas experiências que passamos juntos e auxílio que dedicávamos uns aos outros durante o decorrer desses 2 anos.

À CAPES pela bolsa concedida.

**“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar de novo com mais inteligência.”**

Henry Ford

RESUMO

Sendo responsável por acometer cerca de 10% da população mundial, a úlcera gástrica corresponde a uma das principais doenças do trato gastrointestinal. Atualmente diversos são os fármacos utilizados para o tratamento da úlcera gástrica, como: os antagonistas de receptores H₂, os inibidores da bomba protônica, protetores da mucosa e os antimicrobianos responsivos à bactéria *Helicobacter pylori*. Porém a fitoterapia vem ganhando destaque na medicina tradicional. São várias as espécies disponíveis no mercado e este trabalho destaca a *Bauhinia forficata* Link, que, apesar de ter seus efeitos comprovados como hipoglicemiante de acordo com recentes estudos, o extrato obtido a partir das folhas de *Bauhinia forficata* podem sugerir uma ação antiulcerogênica, sendo tal atividade farmacológica atribuída aos flavonóides, com destaque para a Kaempferitrina. As substâncias químicas que realizam no organismo um efeito terapêutico, são metabolizadas e transformadas em metabólitos, a fim de serem excretadas, porém, assim, são introduzidas no meio ambiente, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais e industriais nos corpos hídricos receptores das águas servidas. A maior preocupação da presença destes fármacos residuais na água, são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos. Sendo assim, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a atividade antiulcerogênica da fração butanólica obtida a partir dos extratos das folhas de *Bauhinia forficata* Link e realizar análises fitoquímicas e ecotoxicológicas desta fração. Os mecanismos de ação antioxidantes foram avaliados quanto as atividade das enzimas antioxidantes e, de acordo com os resultados apresentados nos testes com úlcera gástrica, o pré-tratamento com a FrBUT (6.25 mg.Kg⁻¹) foi capaz de reduzir o surgimento de lesões induzidas por isquemia-reperfusão, quando comparadas ao grupo controle negativo NaCl 0,9%. Ressaltando-se que o nível de significância demonstrado pelo extrato, foi similar àquele obtido a partir do Lansoprazol (controle positivo), demonstrando, deste modo, grande eficácia terapêutica por parte do composto. A análise fitoquímica revelou a presença de Kaempferitrina, metabólito secundário pertencente à classe dos flavonóides, substâncias estas que estão entre os compostos de maior eficácia comprovada para atividade citoprotetora e antiulcerogênica. Perante aos resultados ecotoxicológicos, a FrBUT de *Bauhinia forficata* apresentou efeito tóxico relativamente baixo em exposição crônica ao *Lytechinus variegatus* quando comparado ao Omeprazol e Lansoprazol, de acordo com suas CI₅₀: FrBUT – 43,12mg/L; Omeprazol – 0,74mg/L; e Lansoprazol – 0,33mg/L. Sendo, portanto, o extrato menos danoso ao ambiente.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*. Atividade antiulcerogênica. Atividade antioxidante. Avaliação ecotoxicológica.

ABSTRACT

Being responsible for affects about 10% of the world population, gastric ulcer corresponds to one of the major diseases of the gastrointestinal tract. Currently, several drugs are used for treating gastric ulcer, such as H₂ receptor antagonists, proton pump inhibitors, mucosal protective and antimicrobial responsive for *Helicobacter Pilyory* bacteria. But the herbal medicine has been gaining attention in folk medicine. There are many species available and this work highlights the *Bauhinia forficata* Link, which despite its proven effects such as hypoglycemic, according to recent studies, the extract obtained from *Bauhinia forficata* leaves, may suggest an anti-ulcer action, and such pharmacological activity is attributed to flavonols, especially the kaempferitrin. The chemicals that perform a therapeutic effect on the organism, are metabolized and converted into metabolites to be secreted, however, they are thus introduced into the environment, mainly from the release means municipal and industrial waste into water bodies receptors wastewater. And the biggest concern of the presence of residual drugs in the water, are the potential adverse effects to human health, animal and aquatic organisms. Thus, the aim of this study was to evaluate the anti-ulcer activity of butanol fraction obtained from the extracts of the leaves of *Bauhinia forficata* Link and perform phytochemical and ecotoxicological analysis of this fraction. The antioxidant action mechanisms were assessed for the activity of antioxidant enzymes and according to the results in tests with gastric ulcer, pre-treatment with FrBUT (6.25 mg.Kg⁻¹) was able to reduce the appearance of lesions induced by ischemia-reperfusion, when compared to the negative control group NaCl 0.9%. Noting that, the significance level shown by the extract, was similar to that obtained from Lansoprazole (positive control), showing, in this way, large therapeutic efficacy by the compound. Phytochemical analysis revealed the presence of kaempferitrin which proven efficacy for cytoprotective and antiulcer activity. Given the ecotoxicological results, the frBUT of *Bauhinia forficata* presented relatively low toxic effects of chronic exposure to *Lytechinus variegatus* compared to Omeprazole and Lansoprazole, according to their CI 50: FrBUT - 43,12mg/L; Omeprazole - 0,74mg/l; and lansoprazole - 0,33mg/L. It is therefore, the extract, been consider less harmful to the environment.

Keywords: *Bauhinia forficata*. Antiulcer activity. Antioxidant activity. Ecotoxicological assessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flavonóides presentes em <i>B. forficata</i>	24
Figura 2 - Estrutura Química da Kaempferitrina	25
Figura 3 - Exsicata da <i>Bauhinia forficata</i> (HUSC 4651)	30
Figura 4 - Folhas de <i>B. forficata</i> secas e moídas	31
Figura 5. Fluxograma de obtenção da fração butanólica de <i>Bauhinia forficata</i> pelo processo de maceração	31
Figura 6 - Avaliação do efeito gastroprotetor de FrBut de <i>Bauhinia forficata</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão em ratos	38
Figura 7 - Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)	39
Figura 8 - Atividade enzimática da Glutaciona Peroxidase (GPx)	39
Figura 9 - Atividade enzimática da Glutaciona Redutase (GR)	40
Figura 10 - Atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO)	41
Figura 11 - Atividade enzimática da LPO	42
Figura 12 - Análise da atividade antioxidante in vitro da FrBUT de <i>B. forficata</i>	43
Figura 13 - Molécula identificada como Kaempferitrina (Kaempferol -3,7- di-O-rhamnoside) apresentando o íon pseudo-molecular de [M+H] ⁺ em 579 m/z	44
Figura 14 - Molécula identificada como Rutina (Quercetina-3-O rutinosídeo) apresentando o íon pseudo-molecular de [M+H] ⁺ em 611 m/z	44
Figura 15 - Molécula identificada como Quercetina-3-rhaminoside apresentando o íon pseudo-molecular de [M+H] ⁺ em 449 m/z	45
Figura 16 - Molécula identificada como Quercetina-3-pentose apresentando o íon pseudo-molecular de [M+H] ⁺ em 435 m/z	45
Figura 17 - Valores médios de toxicidade aguda (fertilização) de <i>L. variegatus</i> frente à exposição a diferentes concentrações de FrBUT de <i>Bauhinia forficata</i>	47
Figura 18 - Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de <i>L. variegatus</i> frente à exposição a diferentes concentrações de FrBUT de <i>Bauhinia forficata</i>	49
Figura 19 - Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de <i>L. variegatus</i> frente à exposição a diferentes concentrações de Omeprazol	51

Figura 20 - Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Lansoprazol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de solventes, em ordem crescente de polaridade e os respectivos grupos de metabolitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos.	25
Tabela 2 - Classificação de FrBUT de Bauhinia forficata baseada na diretiva 93/67/EEC da União Europeia	48
Tabela 3 - Kow de fármacos antiulcerogênicos da classe dos inibidores da bomba de prótons	50
Tabela 4 - CI50 dos fármacos sintéticos omeprazol e lansoprazol e do fitoterápico <i>B. forficata</i>	52

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de Variância

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CE₅₀ – Concentração Efetiva Mediana

CENO – Concentração de Efeito Não-Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

CI₅₀ – Concentração Inibitória Média

clamp – Pinça utilizada para ocluir vasos sanguíneos

dp - distância percorrida pelos componentes

dm - distância percorrida pela fase móvel

DPPH – Radical Livre (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila)

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA - Teste Imunoenzimático

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

FrBut – Fração Butanólica

GP_x - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

Grupo Sham – Grupo Controle

H⁺/K⁺ ATPase – Bomba de Prótons

H₂ - Hidrogênio

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

h - hora

Hp – *Helicobacter pylori*

IBPs – Inibidores de Bombas de Prótons

IM – Intra Muscular

Kow - Coeficiente de partição octanol-água

KCl – Cloreto de Potássio

LPO - Lipoperoxidação

M - Molaridade

mg - miligramas

mg.mL⁻¹ – miligrama por mililitro

mg.Kg⁻¹ – miligrama por quilo

mg.L⁻¹ – miligrama por Litro
m/z – razão massa sobre a carga
min - minutos
mL - mililitros
mM - milímetros
mM/H₂O – milímetros de água
mol - molar
MPO - Mieloperoxidase
μL - microlitro
NADPH – Redução da NAD⁺
Nm - nanometro
O₂ - Oxigênio
OH - Hidroxila
p/v – percentual de massa por volume
pH – produto hidrogeniônico da água
Rf – fator de Retenção
rpm – rotação por minuto
SOD - Superóxido Dismutase
Torr – Torricelli (unidade de pressão)
U/mg – UNIDADE por miligrama
USEPA – Agência de Proteção Ambiental
UV – Ultravioleta
v/v – volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 ÚLCERAS GÁSTRICAS E SUA FISIOLOGIA.....	19
2.2 ÚLCERA GÁSTRICA E SEUS TRATAMENTOS.....	20
2.3 TRATAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	22
2.4 FITOTERÁPICOS E A ÚLCERA GÁSTRICA.....	23
2.5 BAUHINIA FORFICATA E SEUS COMPOSTOS QUÍMICOS.....	24
2.6 COMPOSTOS QUÍMICOS E SEUS METABÓLITOS.....	26
2.7 ECOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 COLETA E PROCESSO EXTRATIVO.....	30
4.2 ANIMAIS.....	31
4.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	32
4.3.1 ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA- REPERFUSÃO.....	32
4.3.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “ <i>IN VIVO</i> ”.....	32
4.3.2.1 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO).....	32
4.3.2.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	33
4.3.2.3 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	33
4.3.2.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX).....	33
4.3.2.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	34
4.3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “ <i>IN VITRO</i> ” (MÉTODO DPPH).....	34
4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	34
4.4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	34
4.5 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	35
4.5.1 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO AGUDO (FERTILIZAÇÃO) COM <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i>	35

4.5.2 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO CRÔNICO (EMBRIOLARVAL) DE CURTA DURAÇÃO COM <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i> (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)	36
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO I – DADOS BRUTOS DO ENSAIO AGUDO DA <i>B. FORFICATA</i>	69
ANEXO II – DADOS BRUTOS DO ENSAIO CRÔNICO DA <i>B. FORFICATA</i>	71
ANEXO III – CÁLCULO DA CE50 DO ENSAIO CRÔNICO DA <i>B. FORFICATA</i>	73
ANEXO IV – DADOS BRUTOS DO ENSAIO CRÔNICO DO OMEPRAZOL	74
ANEXO V – DADOS BRUTOS DO ENSAIO CRÔNICO DO LANSOPRAZOL	76
ANEXO VI – CÁLCULO DA CI50 DA <i>B. FORFICATA</i>	78
ANEXO VII - CÁLCULO DA CI50 DO OMEPRAZOL	79
ANEXO VIII - CÁLCULO DA CI50 DO LANSOPRAZOL	80

1. INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica corresponde a uma das principais doenças do trato gastrointestinal, sendo responsável por acometer cerca de 10% da população mundial (CORDEIRO, 2012). Do ponto de vista fisiopatológico a úlcera gástrica trata-se de uma doença bem compreendida. Através da célula parietal sabe-se que, o aumento da transmissão colinérgica via receptor Muscarínico do tipo 3 (M_3) associado ao aumento da ativação do receptor CCK pela gastrina e aumento dos níveis de histamina via receptor H_2 , são capazes de promover estímulo da sinalização intracelular com consequente aumento da secreção de ácido no meio gástrico por intermédio da molécula transportadora H^+/K^+ /ATPase (Bomba Protônica) (DE FARIA et al., 2012). A exacerbação desta secreção ácida-gástrica atrelada à falha de mecanismos protetores, tais como a secreção de muco, bicarbonato e prostaglandinas, são elementos totalmente associados ao desenvolvimento de lesões ulcerogênicas.

Elementos tais como estresse, tabagismo, o uso de Antiinflamatórios Não-Esteroidais, o consumo de álcool e a presença da bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), são os principais fatores atualmente associados ao desequilíbrio dos fatores de proteção e de secreção ácida gástrica, e consequentemente diretamente associados à etiologia desta doença (IJIMA et al., 2014).

Com o avançar dos estudos relacionados às úlceras gástricas, ganharam grande destaque, sobretudo nos últimos 20 anos, estudos relacionados às Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), mais comumente chamados de Radicais Livres Derivados do Oxigênio. Estudos comprovam que a presença de fatores etiológicos externos e internos já citados anteriormente são capazes de estimular inflamação da mucosa gástrica através da ativação de macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, citocinas inflamatórias e outros medidores que contribuem para o estresse oxidativo com consequente aumento da formação dos EROS (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Atualmente diversos são os fármacos utilizados para o tratamento da úlcera gástrica. Dentre tais classes terapêuticas destacam-se os neutralizadores do ácido clorídrico, os antagonistas de receptores H_2 , os inibidores da bomba protônica e os antimicrobianos responsivos à bactéria *H. pylori* (SZABO, 2014). Apesar desta ampla gama terapêutica, ainda são muitos os trabalhos realizados na busca de novas propostas farmacológicas para o tratamento das úlceras gástricas. Vale ressaltar

ainda que, apesar da vasta possibilidade de tratamento das úlceras gástricas, não há ainda no mercado farmacêutico, um tratamento farmacológico com propósito de tratamento desta patologia envolvendo mecanismos antioxidantes. Dentro deste contexto, ganham destaque os estudos com as plantas medicinais.

Estudos epidemiológicos apontam que cerca de 80% da população em países em desenvolvimento dependem das práticas da medicina tradicional para o tratamento de suas doenças (OYEBODE *et al.*, 2016). Apesar das estratégias de marketing e investimentos significativos da indústria farmacêutica objetivando o desenvolvimento de medicamentos alopáticos, a medicina tradicional, em específico a Fitoterapia, continua sendo grande segmento atrativo a cerca de pesquisas científicas com propósito do desenvolvimento de novas propostas terapêuticas (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

Dentre tantas espécies disponíveis em território brasileiro e com potencial atividade farmacológica, destaca-se neste trabalho a espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinioideae). Esta corresponde a uma das cerca de 300 espécies do gênero *Bauhinia*, sendo também conhecida popularmente como Unha-de-Vaca, Pata-de-Vaca e Casco-de-Vaca, devido ao formato de suas folhas. Trata-se de uma árvore ornamental, devido às suas flores brancas vistosas sendo muito utilizada no paisagismo e na arborização urbana. Nativa da Mata-Atlântica, esta espécie encontrada do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul, e deste modo é muito comum sua presença no litoral da Baixada Santista (LORENZI, 2002).

Pizzolatti *et al.* (2003), relatam que *Bauhinia forficata* Link é uma espécie que vem sendo utilizada na medicina tradicional da África, Ásia e América para o tratamento de várias doenças. Além disso, a infusão das folhas de *B. forficata* é utilizada na medicina tradicional brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (MARTINS *et al.*, 1998). Vale ressaltar ainda que, *B. forficata*, trata-se de uma das diversas espécies vegetais de interesse por parte do Ministério da Saúde para futura inclusão da mesma na lista da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Sistema Único de Saúde (RENAME SUS) com indicação para o tratamento do Diabetes Mellitus (Brasil, 2006).

Podemos destacar que, o crescente interesse do mundo científico acerca da espécie *Bauhinia forficata* está associado não apenas aos estudos envolvendo suas indicações terapêuticas com base na medicina tradicional, mas também com suporte

em trabalhos de avaliação fitoquímica. Muitos são os trabalhos que citam a presença de flavonóides, tais como quercetina, Kaempferol (PIZZOLATTI *et al.*, 2003) e Kaempferitrina (HORST, 2005; ENGEL *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2004) em extratos obtidos a partir das folhas de *B. forficata*. Jain (2015), relata em seus trabalhos que dentre os metabólitos secundários vegetais mais estudados com propriedades antiulcerogênicas, destacam-se os alcalóides, terpenos, taninos e principalmente flavonóides. Tendo em vista o histórico que flavonóides apresentam potencial atividade antiulcerogênica mediante mecanismos antioxidantes e, associando estudos que demonstram a presença desta classe de metabólitos nas folhas de *Bauhinia forficata* e somando ainda o fato de que não foram encontrados trabalhos científicos envolvendo avaliação de extratos obtidos a partir desta espécie vegetal no tratamento das úlceras gástricas, considera-se como relevante este estudo que tem como um de seus propósitos avaliar potencial atividade antiulcerogênica de extrato obtido a partir das folhas de *B. forficata*.

Nas últimas décadas tem ganhado grande destaque o desenvolvimento de trabalhos científicos associados à contaminação de fármacos e produtos de higiene pessoal (Poluentes Orgânicos Emergentes) no meio ambiente. Muitos são os trabalhos publicados nesta área, tendo como destaque o envolvimento de grupos de pesquisas multi e interdisciplinares, na tentativa de detectar problemas e soluções futuras no que diz respeito aos chamados poluentes orgânicos emergentes (DAUGHTON, 2016). Deste modo, para identificar os efeitos dessas substâncias sobre a biota aquática, tem se utilizado como um dos recursos científicos testes de toxicidade aguda e crônica com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo com as diferentes classes de fármacos e com distintos organismos-teste (COCCARO, 2014).

Os ensaios para avaliação de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo. Usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. A partir de seus resultados, podem-se empregar os métodos estatísticos, com o propósito de calcular a concentração mediana que causa efeito adverso em 50% dos organismos expostos durante o período de ensaio CE₅₀.

E os ensaios para avaliação de toxicidade crônica avaliam os efeitos de substâncias químicas que ocorrem durante uma parte significativa do ciclo de vida do organismo, tais como embrionária e larval. Os resultados destes ensaios podem

ser utilizados para estimar a maior concentração que não causa efeitos aos organismos-teste (CENO) e a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo aos organismos-teste (CEO) (COCCARO, 2014), além de estimar um valor pontual para determinar a concentração do agente tóxico que causa uma determinada porcentagem de redução no desenvolvimento dos organismos exposto, a concentração de inibição CI_{50} (ABNT, 2006).

Ambos os tipos de testes fornecem dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios para melhoria da qualidade ambiental. Além de permitir o estabelecimento de limites permissíveis para várias substâncias químicas e, também, avaliar o possível impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos receptores (BEAUSSE, 1994). Vários são os estudos com as substâncias sintetizadas, porém estudos sobre a ecotoxicidade de plantas medicinais ainda é bastante escasso.

Perante, portanto, a necessidade da busca de novas propostas terapêuticas com baixa probabilidade de efeitos adversos para a patologia da úlcera gástrica, somada às preocupações no que tange às questões ambientais, quanto ao uso de compostos com propriedades terapêuticas, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a atividade antiulcerogênica da fração butanólica obtida a partir dos extratos das folhas de *Bauhinia forficata* Link e realizar análises fitoquímicas e ecotoxicológicas desta fração.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ÚLCERAS GÁSTRICAS E SUA FISIOLOGIA

O estômago produz o suco gástrico, um líquido claro, transparente, altamente ácido, que contém ácido clorídrico, muco, enzimas e sais. O ácido clorídrico mantém o pH do interior do estômago entre 0,9 e 2,0 e isto contribui para destruir os microorganismos, digerir os alimentos e criar condições de pH ideais para a atuação da enzima pepsina (GUYTON & HALL, 2006). O muco protege a mucosa gástrica da agressão do suco gástrico, bastante corrosivo.

Esta secreção gástrica, produzida pelo estômago, é ativada por nutrientes (aminoácidos e aminas) que estimulam diretamente a células G a produzirem gastrina. Esta, por sua vez, ativa as células parietais por mecanismos diretos e indiretos. Durante estes processos, também entram em atividade vários mecanismos que inibem a produção gástrica de ácido. A somatostatina é libertada pelas células endócrinas da mucosa gástrica (células D) em resposta ao HCl. Este hormônio pode inibir a produção de ácido por mecanismos diretos (célula parietal) e indiretos (diminuição da libertação de histamina pelas células enterocromafins (ECL) e de gastrina pelas células G) (BARRETT, 2104).

A célula parietal exprime receptores para alguns estimulantes da secreção de ácido clorídrico, que são, além da gastrina, a Histamina (H_2) e a Acetilcolina (M_3). As diferentes ligações e seus receptores correspondentes levam à ativação de diferentes vias de sinalização, explicando a potencialização da produção de ácido, que ocorre quando a histamina, a gastrina ou a acetilcolina são combinadas (GUYTON & HALL, 2003). Já a enzima $H^+/K^+/ATPase$, que é responsável pela produção de concentrações altas de H^+ , utiliza a energia química do ATP para transferir íons H^+ do citoplasma das células parietais para os canalículos secretores, em troca de K^+ . Esta enzima localiza-se no canalículo secretor e nas vesículas tubulares citoplasmáticas não-secretoras, estruturas impermeáveis ao K^+ , resultando em inativação da bomba nesse local. Em condições de repouso, apenas 5% das bombas estão localizadas dentro do canalículo secretor, enquanto que, depois da estimulação das células parietais, as vesículas tubulares são transferidas para a membrana dos canalículos secretores, onde 60-70% das bombas estão ativadas. Sua atividade fisiológica fica sujeita à modulação (estimulação e inibição) pelos sinais moleculares neuronais e endócrinos, como a secreção de acetilcolina, gastrina, histamina e somatostatina (DAL-PAZ *et al.*, 2008).

Eventualmente ocorre desequilíbrio entre todos estes processos de estimulação da produção do ácido com a defesa do organismo, o que resulta em inflamação difusa da mucosa (gastrite) ou mesmo no aparecimento de feridas dolorosas que sangram (úlceras gástricas) (SILVERTHORN, 2003).

Na maioria dos casos, as úlceras gástricas estão localizadas distalmente à junção entre o antro e a mucosa produtora de ácido, sendo muito raras no fundo gástrico. As úlceras gástricas tendem a ocorrer numa faixa etária maior do que as lesões duodenais, com pico de incidência na sexta década de vida. Mais de metade destas úlceras surgem em homens e são lesões menos comuns que as úlceras duodenais, talvez porque elas tenham mais tendência para não causar sintomas e serem detectadas apenas depois das complicações (COELHO, 2003).

Embora a etiologia da úlcera não seja bem compreendida, o estresse, tabagismo, o uso abusivo de Antiinflamatórios Não-Esteroidais, o consumo de álcool e a presença da bactéria *H. pylori*, são os principais fatores que podem estar associados à doença (IIJIMA et al., 2014), e podem ser responsáveis por causar um desvio do equilíbrio entre os mecanismos lesivos da mucosa (secreção do ácido clorídrico pelas células parietais) e os mecanismos citoprotetores, representados basicamente pela secreção de muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico e substâncias sulfidrílicas não protéicas (BIGHETT et al., 2002).

2.2 ÚLCERA GÁSTRICA E SEUS TRATAMENTOS

Para haver o tratamento de uma doença, se faz necessário conhecer sua causa, e embora a etiologia da úlcera gástrica não seja muito bem compreendida, podemos ressaltar alguns distúrbios fisiológicos encontrados em pacientes portadores desta doença, para assim poder ser realizado um tratamento adequado.

Em estudos realizados com pacientes portadores dessas úlceras, foram apresentadas várias alterações como: maior secreção de ácido e pepsina; maior massa de células parietais; maior sensibilidade da célula parietal ao estímulo da gastrina; aumentada liberação de gastrina; controle deficiente na regulação da liberação de gastrina através do pH ácido; esvaziamento gástrico acelerado; e menor produção de bicarbonato pelo duodeno com deficiente neutralização duodenal do ácido clorídrico. E, apesar dos indivíduos com úlcera gástrica serem geralmente normo ou hiposecretores, o ácido possui grande importância na sua gênese (CARVALHO, 2000).

A regulação da secreção de ácido pelas células parietais, portanto, sendo um fator importante na patogenia da úlcera péptica constitui um grande alvo para a ação de fármacos (BRAGA *et al.*, 2011). Atualmente diversos são os fármacos utilizados para o tratamento da úlcera gástrica. Dentre tais classes terapêuticas destacam-se:

- os neutralizadores do ácido clorídrico (que podem conter magnésio, alumínio, cálcio ou bicarbonato), são eficazes quando usados em altas doses. Costuma-se usar 5 a 10 ml por dose, das formulações mais potentes, dependendo da idade. São usados em quatro tomadas diárias, uma hora após as três principais refeições e ao deitar. O grande número de doses e o sabor desagradável, além dos efeitos colaterais (diarréia ou constipação), dificultam a aderência ao tratamento, o que os torna drogas praticamente fora do uso rotineiro.

- os antagonistas de receptores H_2 , que diminuem a secreção ácida por inibição dos receptores H_2 histamínicos das células parietais e têm boa eficácia na cura da úlcera péptica. Na prática diária essas drogas são usadas em uma (à noite) ou duas doses diárias (manhã e noite), por um período médio de oito semanas. Nos casos em que for necessário o tratamento de manutenção, após a cura da ulceração como na úlcera recidivante, usa-se a metade da dose à noite, por período prolongado.

- os inibidores da bomba protônica, onde envolve uma inibição irreversível da enzima $H^+/K^+/ATPase$ das células parietais, a qual resulta em drástica redução da secreção ácida pela bomba de prótons. São ligeiramente mais eficazes que os antagonistas dos receptores H_2 na cura da úlcera péptica, não complicada. Os IBPs são administrados em dose única matinal, 30 minutos antes da primeira refeição do dia, de preferência com a cápsula intacta.

- protetores da mucosa, onde o sucralfato, que é uma molécula complexa composta por octassulfato de sacarose e hidróxido de alumínio, combina com as proteínas do tecido exulcerado ou ulcerado quando presente, formando um complexo aderente que protege a mucosa da ação nociva das secreções digestivas.

- os antimicrobianos, responsivos à bactéria *H. pylori*. Como a maioria dos esquemas antimicrobianos se associa à efeitos colaterais, caso o paciente esteja muito sintomático é preferível primeiro um inibidor de secreção ácida e iniciar os antimicrobianos tão logo haja melhora clínica, o que ocorre em média em sete dias com os ARH_2 e em três dias com os IBPs (CARVALHO, 2000; MORAES-FILHO, 2013).

E, apesar desta ampla gama terapêutica, ainda são muitos os trabalhos realizados na busca de novas propostas farmacológicas para o tratamento das úlceras gástricas (ARAKAWA *et al.*, 2012).

2.3 TRATAMENTOS FITOTERÁPICOS

Apesar das estratégias de marketing e investimentos significativos da indústria farmacêutica objetivando o desenvolvimento de medicamentos alopáticos, a medicina tradicional, em específico a Fitoterapia, continua sendo grande segmento atrativo a cerca de pesquisas científicas com propósito do desenvolvimento de novas propostas terapêuticas (BONIFÁCIO *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população em países em desenvolvimento dependem das práticas da medicina tradicional para o tratamento de suas doenças (PIRES *et al.*, 2011). Trata-se de uma forma eficaz de atendimento a saúde, podendo complementar ao tratamento usualmente empregado para a população. A realização segura desses atendimentos está vinculada ao conhecimento prévio do profissional de saúde sobre a terapêutica com fitoterápicos ou plantas medicinais. A orientação para uma utilização adequada, sem perda da efetividade dos princípios ativos localizados nas plantas e sem riscos de intoxicações por uso inadequado é fundamental (BRUNING *et al.*, 2012).

Em meio de muitas espécies disponíveis no Brasil e com potencial atividade farmacológica, este trabalho destaca a espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link. (Caesalpinioideae). Sendo que ela corresponde a uma, das cerca de 300 espécies do gênero *Bauhinia*, também sendo conhecida popularmente como Pata-de-Vaca, devido ao formato de suas folhas e bastante conhecida no litoral santista (LORENZI, 2002).

A infusão das folhas de *B. forficata* é utilizada na medicina tradicional brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (MARTINS *et al.*, 1998). E podemos ressaltar ainda que, *Bauhinia forficata*, trata-se de uma das diversas espécies vegetais de interesse por parte do Ministério da Saúde para futura inclusão da mesma na lista da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do Sistema Único de Saúde (RENAME SUS) com indicação para o tratamento do diabetes mellitus (BRASIL, 2006).

No entanto, apesar de diversas informações etnofarmacológicas e aumento expressivo de estudos científicos demonstrando potencial atividade farmacológica de extratos obtidos a partir das folhas de *Bauhinia forficata* para o tratamento do Diabetes Mellitus, poucos ainda são os estudos envolvendo potencial atividade antiulcerogênica a partir de extratos obtidos da referida planta medicinal.

2.4 FITOTERÁPICOS E A ÚLCERA GÁSTRICA

As plantas são capazes de produzir diversos tipos de metabólitos que são os responsáveis pela ação terapêutica e são considerados como marcadores, os marcadores químicos podem ser definidos como um composto ou classe de compostos químicos presentes na matéria-prima vegetal que tenham, preferencialmente, correlação com o efeito terapêutico, e é utilizado como referência no controle de qualidade. Podem ser classificados em grupos de acordo com sua composição química, como exemplos existem os óleos essenciais, saponinas, carotenos, alcalóides, taninos, flavonóides, entre outros (NEMITZ et al., 2016).

Estudos em modelos de úlcera gástrica comprovam atividades citoprotetoras de extratos e princípios ativos fitoterápicos, onde estas substâncias exercem efeitos antiulcerogênicos (CARVALHO, 2006). E essas plantas que conseguem realizar o processo antiulceroso e anti-inflamatório apresentam, entre elas, um marcador em comum, que seriam os flavonóides (VILEGAS et al., 1999; LEITE et al. 2001).

Os flavonóides são capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, exercendo vários efeitos benéficos no organismo (FLAMBÓ, 2013). Este composto químico é considerado bom marcador quimiotaxonômico, pois sua presença é abundante em quase todo o reino vegetal, com especificidade em algumas espécies, tendo relativa facilidade de identificação e estabilidade (PEIXOTO & TAVARES, 2011). E, segundo Gonzalez e Di Stasi, 2002, os flavonóides podem ser reconhecidos como compostos ativos contra lesões gástricas, devido o aumento de fatores de proteção ou atividade antioxidante.

Alguns flavonóides atuam na proteção das células contra o estresse oxidativo, provocado, por exemplo, pela peroxidação de lipídios (de SOUZA et al., 2004), e estudos comprovam que a atividade antioxidante atribuída aos flavonóides provém principalmente da sua capacidade de doar elétrons aos radicais livres, causando a redução destes (SILVA et al., 2005).

2.5 BAUHINIA FORFICATA E SEUS COMPOSTOS QUÍMICOS

Mazzeo *et al.* (2015), realizou uma triagem fitoquímica com o extrato aquoso das folhas da *B. forficata*, que demonstrou a presença de flavonóides em quatro diferentes análises. Já Pizzolatti e colaboradores (2003), conseguiram isolar os compostos fenólicos presentes nos extratos das folhas de *B. forficata* e Arigony (2005) encontrou: [1] β -sitosterol, canferol; [2] canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo; [3] quercetina 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo; [4] canferol 3-O-[β -D-glucopiranosídeo-(1 \rightarrow 6) - α -L-ramnopiranosídeo]-7- O- α -L-ramnopiranosídeo; [5] quercetina 3-O-[β -D-glucopiranosídeo-(1 \rightarrow 6) - α -L-ramnopiranosídeo]-7- O- α -L-ramnopiranosídeo (Figura 1).

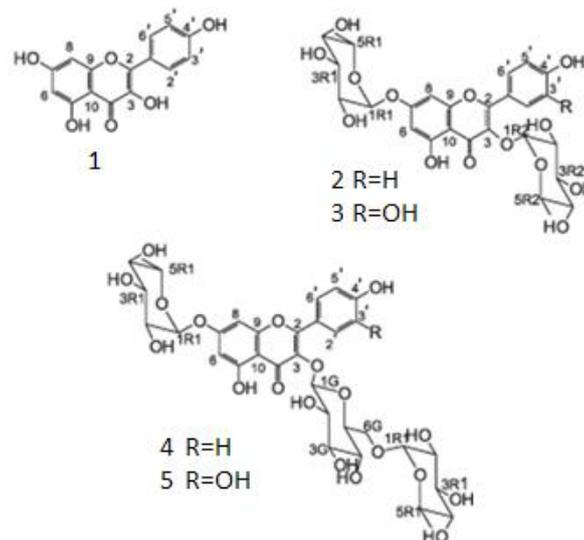


Figura 1. Flavonóides presentes em *B. forficata*.

Fonte: ARIGONY, 2005.

Registros atuais de estudos afirmam que, entre estes compostos encontrados neste fitoterápico, no extrato butanólico das folhas de *B. forficata*, o maior composto flavonóide presente é a Kaempferitrina (kaemferol-3,7-O-(α)-L-diramnosídeo) (HORST, 2005; ENGEL *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2004). E dados publicados demonstram que o extrato obtido a partir das folhas de *Bauhinia forficata* possui significativa atividade antiulcerogênica em modelos realizados em roedores, sendo tal atividade farmacológica atribuída aos flavonóides, novamente com destaque para a Kaempferitrina (Figura 2).

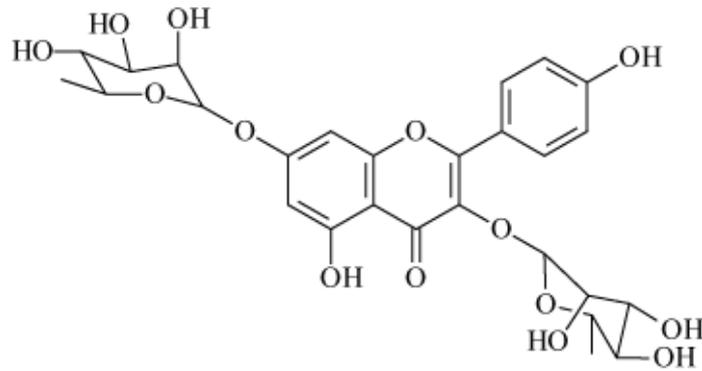


Figura 2. Estrutura Química da Kaempferitrina.

Fonte: ENGEL et al., 2008.

Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente (Tabela 1).

Assim, levando-se em consideração os fatores envolvidos no processo extrativo, pode-se escolher o melhor método e os solventes que serão empregados, sendo neste estudo, a fração n-butanólica, para um maior rendimento extrativo dos flavonóides presentes nas folhas da *B. forficata*.

Tabela 1. Exemplos de solventes, em ordem crescente de polaridade e os respectivos grupos de metabolitos majoritariamente encontrados nos diferentes extratos.

Solventes	Tipos de Substâncias Extraídas
Éter de petróleo, hexano	Lipídios, ceras, pigmentos, furanocumarinas
Tolueno, diclorometano, clorofórmio	Bases livres de alcalóides, antraquinonas Livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos
Acetato de etila, n-butanol	Flavonóides, cumarinas
Etanol, metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas, água	Saponinas, taninos
Água acidificada	Alcalóides
Água alcalinizada	Saponinas

Fonte: KLEIN, 2014.

2.6 FÁRMACOS E SEUS METABÓLITOS

A farmacocinética de um fármaco pode ser explicada pelos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. No processo de absorção, dependendo das substâncias absorvidas, podem causar a redução ou aumento da quantidade de fármaco absorvido, ou da velocidade de absorção, resultando na diminuição ou aumento da intensidade do efeito farmacológico obtido. Os compostos fitoquímicos também podem interagir com transportadores de proteínas ATP dependentes como a glicoproteína-P intestinal e outras proteínas que facilitam o efluxo do fármaco, alterando sua biodisponibilidade. Na metabolização do fármaco, são acionadas as enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo pertencentes ao citocromo P450 (CYP), principal sistema utilizado para eliminação de fármacos do organismo (OLIVEIRA & COSTA, 2004). O metabolismo de fármacos compreende, portanto, o conjunto de reações enzimáticas que biotransformam estes fármacos em metabólitos de polaridade crescente, para que sejam excretados pela urina. Desempenhando, portanto, um importante papel na eliminação de fármacos, e impedindo que estes compostos permaneçam por tempo indefinido no nosso organismo (RANG *et al.*, 2012).

As reações metabólicas são divididas em duas fases: fase 1 - oxidação, redução e hidrólise; e fase 2 - conjugação. Os produtos de degradação, chamados de metabólitos, podem, por sua vez, serem inativos ou ativos. Em relação ao fármaco de origem, os metabólitos ativos podem agir por mecanismos de ação similares ou diferentes, ou até mesmo por antagonismo. Este conhecimento da cinética da formação dos metabólitos ativos possui grande importância para previsão do resultado terapêutico, para explicar a toxicidade de um dado fármaco e, ainda, para sua atuação pós-eliminação (PEREIRA, 2007).

Dados indicam que cerca de 1 a 4% da dose ingerida de um fármaco é excretada ao meio ambiente na sua forma inalterada e os demais 96 a 99% correspondem aos metabólitos gerados a partir da molécula de origem (GOODMAN & GILMAN, 2012). Estes metabólitos são eliminados para o meio ambiente e, atualmente, vem gerando certa preocupação com seus possíveis efeitos, pois vários estudos têm confirmado, com análises físico-químicas, a presença de drogas resistentes e seus metabólitos em ambientes aquáticos, além de demonstrarem efeitos adversos no ambiente aquático, principalmente pela longa exposição, mesmo que em baixas concentrações (GARCÍA *et al.*, 2013).

2.7 ECOTOXICIDADE DOS FÁRMACOS

A grande quantidade de substâncias farmacologicamente ativas no ambiente provém do uso amplo e acentuado no tratamento de doenças em seres humanos e animais, sendo excretadas e introduzidas, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais e industriais nos corpos hídricos receptores das águas servidas (CHAMPAN, 2006). E a maior preocupação da presença destes fármacos residuais na água, são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos (BILA, 1990).

Em todo o mundo são descritos valores elevados de contaminação em diversos tipos de amostras, para várias classes de fármacos, levando a efeitos agudos e crônicos sobre os organismos, tais como os hormônios - ação de estrogênios causando efeitos sobre os peixes-, antibióticos, anestésicos, antiinflamatórios, antiepilépticos, entre outros (VETHAAK *et al.*, 2002; NOGUEIRA, 2013). Podemos salientar que, alguns compostos, na presença de outros, podem causar efeito tóxico sinérgico (CLEUVERS, 2003).

Deste modo, tem se utilizado nessas últimas décadas, para identificar os efeitos dessas substâncias sobre a biota aquática, testes de toxicidade aguda e crônica com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo com as diferentes classes de fármacos e com distintos organismos-teste (COCCARO, 2014).

Estes estudos ecotoxicológicos são utilizados para determinar efeitos biológicos em diferentes níveis de organização biológica, desde moleculares e bioquímicos até comunidades e ecossistemas (WALKER *et al.*, 1996), eles têm sido empregados a fim de se avaliar os efeitos da introdução de xenobióticos no ambiente aquático e são utilizados para uma variedade de aplicações, dentre elas a avaliação do risco ambiental (RAND *et al.*, 1995).

Os ensaios para avaliação de toxicidade aguda avaliam os efeitos severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo. Usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. A partir de seus resultados, podem-se empregar os métodos estatísticos, com o propósito de calcular a concentração mediana que causa efeito adverso em 50% dos organismos expostos durante o período de ensaio CE₅₀.

E os ensaios para avaliação de toxicidade crônica avaliam os efeitos de substâncias químicas que ocorrem durante uma parte significativa do ciclo de vida

do organismo, tais como embrionária e larval. Os resultados destes ensaios podem ser utilizados para estimar a maior concentração que não causa efeitos aos organismos-teste (CENO) e a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo aos organismos-teste (CEO) (COCCARO, 2014), além de estimar um valor pontual para determinar a concentração do agente tóxico que causa uma determinada porcentagem de redução no desenvolvimento dos organismos exposto, a concentração de inibição CI_{50} (ABNT, 2006).

Ambos os tipos de testes fornecem dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios para melhoria da qualidade ambiental. Além de permitir o estabelecimento de limites permissíveis para várias substâncias químicas e, também, avaliar o possível impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos receptores (BEAUSSE, 1994). Vários são os estudos com as substâncias sintetizadas, porém estudos sobre a ecotoxicidade de plantas medicinais ainda são escassos.

Perante, portanto, a necessidade da busca de novas propostas terapêuticas com baixa probabilidade de efeitos adversos para a patologia da úlcera gástrica, somada às preocupações no que tange às questões ambientais, quanto ao uso de compostos com propriedades terapêuticas, pode-se supor que os resultados mediante avaliação do extrato butanólico, obtido a partir das folhas de *Bauhinia forficata* Link, em ensaios farmacológicos, fitoquímicos e ecotoxicológicos, poderão servir como apoio para futuros estudos com o intuito de inserir tal composto como possibilidade de terapia farmacológica a pacientes portadores de úlceras gástricas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo consistiu em avaliar a atividade antiulcerogênica da fração butanólica obtida a partir dos extratos das folhas de *Bauhinia forficata* Link e realizar análises fitoquímicas e ecotoxicológicas desta fração.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a avaliação da atividade antiulcerogênica da fração butanólica (FrBut) de *Bauhinia forficata* em ratos Wistar, pelo modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão;
- Investigar os mecanismos de ação de atividade antiulcerogênica de FrBut através dos ensaios de atividade antioxidante “*in vivo*” e “*in vitro*”;
- Realizar análises fitoquímicas de FrBut por espectrometria de massas (ESI-MS);
- Realizar as análises ecotoxicológicas de FrBut por meio de ensaios de toxicidade para avaliação dos efeitos agudos (Fertilização) e crônicos (Embriolarval) em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PROCESSO EXTRATIVO

As folhas de *Bauhinia forficata* Link foram coletadas na cidade de Peruíbe, São Paulo (-24,267948, -46,959276 (latitude/longitude). Estas foram comparadas à exsicata já elaborada pelo Prof. Paulo Salles Penteado tendo voucher número 4651 depositado no Herbário da Universidade Santa Cecília (HUSC) (Figura 3).



Figura 3. Exsicata da *Bauhinia forficata* (HUSC 4651).

Fonte: Arquivo pessoal.

Em seguida as folhas foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 50°C por 06 dias consecutivos. Após secagem, as mesmas foram trituradas em moinho de facas (Figura 4). Foi realizado o processo extrativo conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira, 2010 (Figura 5) sendo então por maceração com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e n-butanol – 1 semana cada) na proporção de 20 g de pó triturados de *Bauhinia forficata* para cada 200 mL de solvente. Ao final de cada extração as soluções foram submetidas à concentração sob pressão reduzida em evaporador rotatório a temperatura de 45°C, obtendo-se deste modo a fração butanólica (FrBut).



Figura 4. Folhas de *Bauhinia forficata* secas e moídas.

Fonte: Arquivo pessoal.

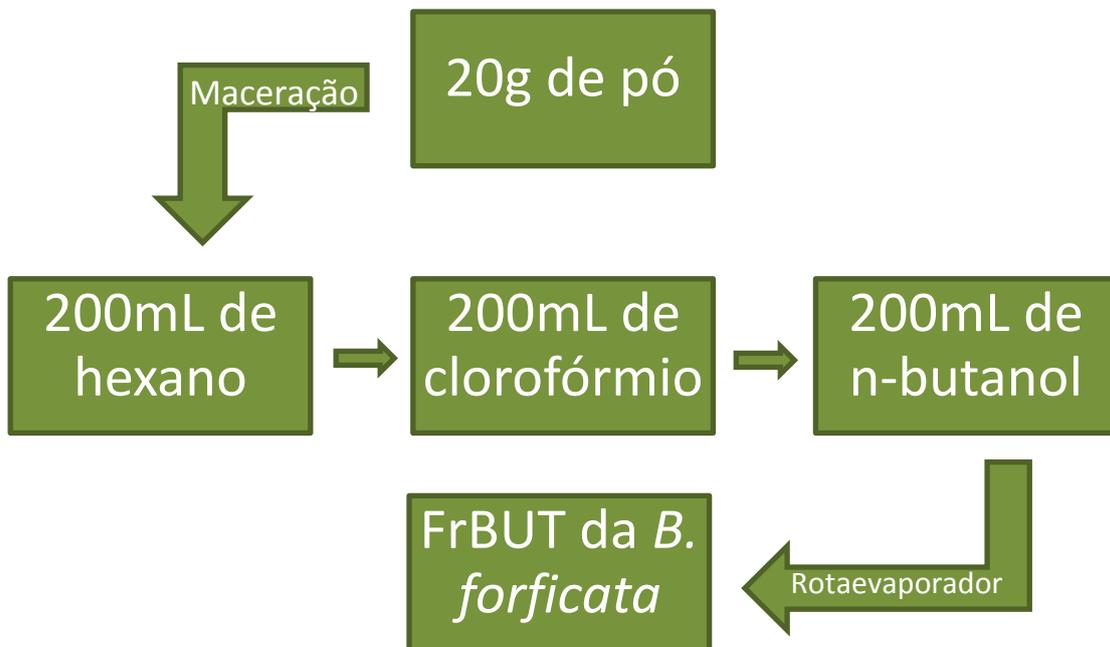


Figura 5. Fluxograma de obtenção da fração butanólica da *Bauhinia forficata* pelo processo de maceração.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (180-220 g) provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e do Biotério Central da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Botucatu-SP. Os animais permaneceram sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado e alimentados com ração Guabiá[®] e água *ad libitum*. Todos os

experimentos obedeceram a protocolos experimentais e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unisanta (CEUA - UNISANTA) sob protocolo número 53/07.

4.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

4.3.1 ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Ratos Wistar (180-220 g) foram mantidos em jejum por 24 horas com livre acesso à água. Foram realizados tratamentos com FrBut (6.25 mg.Kg⁻¹) (n=08), Lansoprazol (30 mg.Kg⁻¹) (n=08) e NaCl 0.9% (10 mL.Kg⁻¹) (n=08) todos pela via oral 30 min antes de anestésiar os animais. Um grupo Sham (sem qualquer tratamento) foi também utilizado apenas para manipulação dos animais. Os animais foram em seguida anestesiados pela administração pela via intramuscular (IM) utilizando solução de Ketamina (40 mg.Kg⁻¹) associada à Xilazina (5 mg.Kg⁻¹). Após anestesia os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para colocação de um “clamp” na artéria celíaca. Decorrida meia hora de isquemia o “clamp” foi retirado e, então, os ratos foram submetidos à uma hora de reperfusão e, em seguida, sacrificados por overdose de anestésicos (Ketamina, 120 mg.Kg⁻¹, IM) + Xilazina, 15 mg.Kg⁻¹, IM) (UEDA, *et al.*,1989). Foram então removidos os estômagos para posterior raspagem do conteúdo gástrico. As amostras de tecido gástrico foram então submetidas a protocolos para dosagem de enzimas antioxidantes.

4.3.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “IN VIVO”

Para a determinação dos mecanismos antioxidantes, os estômagos obtidos tiveram suas porções glandulares raspadas exaustivamente com lâminas de vidro e homogeneizada em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) e congeladas a -70°C até a realização dos ensaios bioquímicos. As atividades enzimáticas, ou níveis de compostos antioxidantes, foram determinados espectrofotometricamente em leitores de ELISA. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina do soro bovino para estabelecimento da curva padrão.

4.3.2.1 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

O homogenato da porção glandular gástrica foi diluído em KCl 0,15 M (1:10). Em seguida, foram separados 0,5 mL do homogenato e adicionados 0,2 mL de

dodecil sulfato (8,1%); 1,5 mL de ácido acético (20%, pH 3.5); 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e 0,3 mL de água destilada. As amostras foram encaminhadas a banho-maria, com temperatura de 95°C, por período de 1 hora. Após este período, as amostras foram resfriadas e acrescidas de 1 mL de água destilada e 5 mL de n-butanol + piridina (15:1, v/v), agitadas por 1 min em vórtex e centrifugadas a 1400 G, por período de 10 minutos. A absorbância da amostra foi determinada, a 532 nm tendo como padrão tetraetoxipropano (TEPP), diluído em etanol. Os resultados foram expressos como picomoles de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de proteínas (pmol TBARS/ mg de proteínas) (OHKAWA *et al.*, 1979).

4.3.2.2 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da MPO na mucosa gástrica foi avaliada segundo protocolo elaborado por Krawisz *et al.*, (1984). Alíquotas (6,7 mL) do sobrenadante foram adicionadas a tampão fosfato 0.05M, pH 6.8 contendo 0,0005% de peróxido de hidrogênio e 1.25 mg/mL de dihidroclorato de o-dianisidina. Na sequência foi realizada leitura a 460 nm de absorbância por 10 minutos em intervalos de 1 minuto. Os resultados foram expressos em U/mg.

4.3.2.3 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Neste ensaio foi empregado o método descrito por Winterbourn *et al.* (1975), onde as amostras foram centrifugadas e diluídas em tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,4), na proporção 1:20. A 100 µL do homogenato foram adicionados 150 µL da solução de hipoxantina (0,1mM), xantina oxidase (0,07 U) e nitrobluetetrazolium (NBT - 0,6 mM). As absorbâncias foram lidas a 560 nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.3.2.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

As amostras de conteúdo gástrico foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C, por 15 min e o sobrenadante diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) na proporção 1:10. A uma alíquota de 100 µL do raspado, foram adicionados 150 µL de solução de glutathione reduzida (10 mM), NADPH (4 mM) e glutathione redutase (1U) e 20 µL de H₂O₂ (25 mM), de acordo com método de Yoshikawa *et al.*, (1993). A

absorbância foi determinada a 365 nm, entre 1 e 10 min. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

4.3.2.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

Para avaliar atividade da enzima Glutathione Redutase (GR), a reação enzimática foi elaborada utilizando 100 µL da amostra (centrifugada e diluída em tampão fosfato pH = 7,4; 1:10) e 150 µL do cocktail formado por EDTA (0,20 mM), glutathione oxidada (1 mM) e NADPH (0,1 mM). A absorbância foi lida a 365 nm, entre 1 e 10 min (CARLBERG & MANNERVIK, 1985). Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

4.3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “IN VITRO” (MÉTODO DPPH)

Foram obtidos 100 µg da fração butanólica da *Bauhinia forficata*, que foi solubilizada em etanol e posteriormente aplicada em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) de alta resolução (sílica gel 60, Merck, Alemanha). A cromatografia foi desenvolvida utilizando fase móvel compatível para flavonóides, utilizando como solventes a mistura de acetato de etila/metanol/água (40:5,4:5; v/v/v) (KOTZE & ELOFF, 2002). Em seguida, sobre a placa foi nebulizada uma solução metanólica de DPPH (0,2 %) e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A atividade antioxidante foi observada com o surgimento de bandas amarelo-esbranquiçadas sobre um fundo roxo e, desta forma, permitindo a análise do perfil das bandas que apresentam atividade antioxidante.

4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Previamente às análises por espectrometria de massas, a fração butanólica de *B. forficata* foi seca em fluxo de nitrogênio, ressuspensa em metanol 50% e purificada por uma combinação de filtrações sucessivas em filtro 0,45µm e 0,20 µm (Millipore) e centrifugação (1800 r.p.m., 10 minutos). 2µL do sobrenadante das amostras foram secos e ressuspensas em 1 mL de uma mistura de metanol/formiato de amônio 100mM/H₂O (1,6: 0,1: 0,3; v/v/v) sendo então analisadas por espectrometria de massa em equipamento Varian 310-MS. As análises das amostras por espectrometria de massa foram realizadas em modos positivo e

negativo, por infusão direta com tensão de agulha variável dependente do composto de interesse. O intervalo de varredura para aquisição das massas totais variou de 50-2000 m/z. Cada fragmentação de íons em MS2 foi otimizada em relação à energia do capilar e de colisão para minimizar as variações na abundância relativa de íons devido a diferenças nas taxas de dissociação, todos os experimentos de dissociação foram realizados usando 2mTorr de Argônio. Diferentes componentes da fração butanólica foram identificados de acordo com os seus respectivos espectros de massas, através da identificação do íon precursor e íons provenientes da fragmentação por comparação com dados de espectrometria de massas da literatura de moléculas previamente descritas para *B. forficata* Link (FERRERES *et al.*, 2012; FARIAS & MENDEZ, 2014).

4.5 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

4.5.1 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO AGUDO (FERTILIZAÇÃO) COM *LYTECHINUS VARIEGATUS*

Os organismos da espécie *Lytechinus variegatus* podem ser encontrados desde a zona entre-marés até cerca de 20 metros de profundidade. É bastante comum na região do Caribe e na costa atlântica da América do Sul, ocorrendo desde a Carolina do norte, EUA, até a costa sudeste do Brasil. Pertencentes à família Toxopneustidae, possuem carapaça esverdeada e achatada inferiormente e espinhos de cor variando desde verde até púrpura. Esta espécie alimenta-se de macroalgas, vive em locais onde estas são abundantes e possui o hábito de se recobrir com detritos vegetais e pequenas conchas (CORTEZ, 2010). Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados de acordo com o protocolo da USEPA (1991) no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília – UNISANTA. O ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo com *Lytechinus variegatus* consiste na coleta dos gametas, coleta esta que se realiza pela indução da liberação dos mesmos através de uma injeção de KCl 0,5 mol e, sequencialmente, à estimulação elétrica. A identificação dos óvulos e espermatozoides é feita pela coloração, apresentam uma coloração amarelo-alaranjados e uma coloração esbranquiçada, respectivamente. Os espermatozoides foram coletados com auxílio de uma micropipeta e acondicionados em um béquer envolto com gelo, sem que entrem em contato com água de diluição até início dos experimentos. As fêmeas foram apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo em um recipiente menor que o

seu diâmetro. Na fecundação foi preparada uma solução de 0,5 mL de espermatozoide para 25 mL de água de diluição e exposta a diferentes concentrações do extrato em 4 réplicas por um período de 1h. As concentrações foram de 12,5 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, tendo como o controle, réplicas de água do mar reconstituída. Após este período, foi adicionada uma solução contendo aproximadamente 2000 ovócitos a cada frasco-teste. A solução foi homogeneizada com leve agitação por 10 minutos e retornadas à câmara. Após 40 minutos, amostras de 10 µL da solução foram colocadas em câmara de Sedwick-Rafter para contagem e cálculo da porcentagem de fecundação (mínimo de 80% de óvulos fecundados para utilização do ensaio). E logo após confirmada a fecundação, o ensaio foi finalizado com adição de 0,5 mL de formol tamponado e todas as amostras foram para contagem, a fim de se avaliar o efeito agudo de inibição da fertilização.

4.5.2 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO CRÔNICO (EMBRIOLARVAL) DE CURTA DURAÇÃO COM *LYTECHINUS VARIEGATUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)

O método de ensaio seguiu a norma técnica ABNT/NBR 15350 (2006), que consiste na mesma metodologia do ensaio agudo para a avaliação do efeito crônico ocorre à exposição de ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) a diferentes concentrações da fração butanólica de *Bauhinia forficata*, que foram de 12,5 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹, durante o período de desenvolvimento embriolarval (24 h a 28 h para *Lytechinus variegatus*). Após esse período de exposição com as concentrações diferentes do extrato da FrBUT em câmara com temperatura entre 24±2° C, uma alíquota do controle foi retirada da câmara para verificar se atingiu o critério mínimo de aceitabilidade do ensaio, onde as larvas foram observadas quanto ao desenvolvimento embriolarval normal e anômalo. Respeitando o critério mínimo onde 80% das larvas devem se encontrar em estágio de pluteus, o ensaio foi encerrado e 0,5 mL de formol tamponado com bórax adicionado em todas as réplicas. A leitura do ensaio foi realizada em microscópio (100x) com câmara de Sedgwick-Rafter e o estágio de desenvolvimento, bem como a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos de cada réplica foi avaliado.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos foram expressos na forma de média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e teste posteriori de Dunnett com nível de significância de $*p < 0.05$.

Dados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos foram submetidos ao programa Toxstat 3.5[®] onde foram obtidos os valores para avaliação do risco ambiental.

No ensaio agudo foram utilizados análises de variância de uma via (ANOVA) e teste posteriori de Dunnett com nível de significância de $*p < 0.05$. No ensaio crônico também foram utilizados análises de variância de uma via (ANOVA) e teste posteriori de Dunnett com nível de significância de $*p < 0.05$, com testes de Normalidade, Homegeinedade de Variância por Chi-quadrado e Cochran, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante utilização do protocolo experimental por IR pode-se observar que o pré-tratamento com lansoprazol (30 mg.Kg^{-1}) e o pré-tratamento com a Fração Butanólica obtida a partir das folhas de *B. forficata* na dose de 6.25 mg.Kg^{-1} foram capazes de reduzir o surgimento de lesões ulcerogênicas em 52,4% e 46%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle negativo (NaCl 0,9%). Tais dados demonstram potencial atividade antiulcerogênica supostamente envolvendo mecanismos antioxidantes (Figura 6).

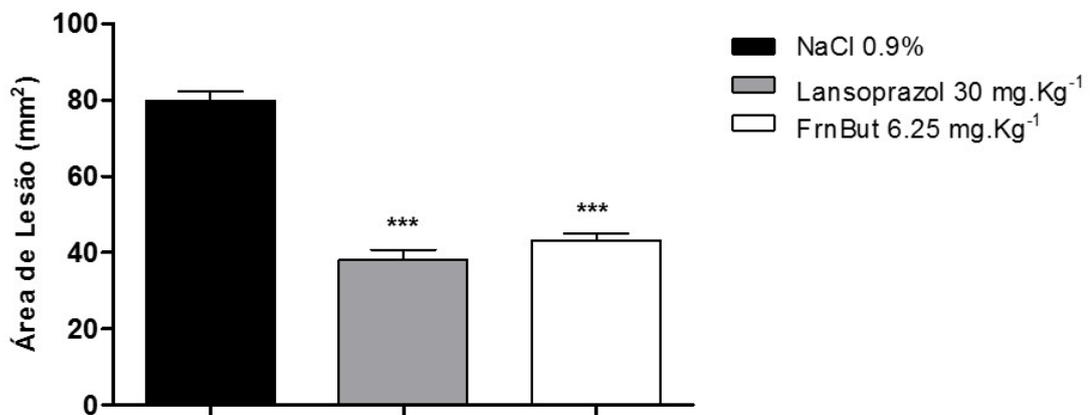


Figura 6. Avaliação do efeito gastroprotetor de FrBut de *Bauhinia forficata* no modelo de úlcera gástrica induzida por isquemia-reperfusão em ratos. ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett com os resultados expressos como média \pm dp. * $p < 0.001$ comparados ao controle NaCl 0.9%.**

Com base na significativa atividade antiulcerogênica demonstrada por FrBut obtida a partir das folhas de *Bauhinia forficata*, foram realizados ensaios farmacológicos na tentativa de elucidar eventuais mecanismos antioxidantes. Para tanto foram quantificadas enzimas envolvidas no processo de estresse oxidativo. Dentre tais enzimas, pode-se observar, quando comparadas ao grupo controle (NaCl 0.9%) elevação dos níveis da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em 41% (** $p < 0.001$) (Figura 7); elevação dos níveis da enzima Glutaciona Peroxidase (GPx) em 62.7% (** $p < 0.001$) (Figura 8); e elevação dos níveis da enzima Glutaciona Redutase (GR) em 54.5% (Figura 9). Da mesma forma o tratamento com lansoprazol (Controle Positivo) foi capaz de intervir de maneira significativa os níveis de todas as enzimas envolvidas no protocolo experimental.

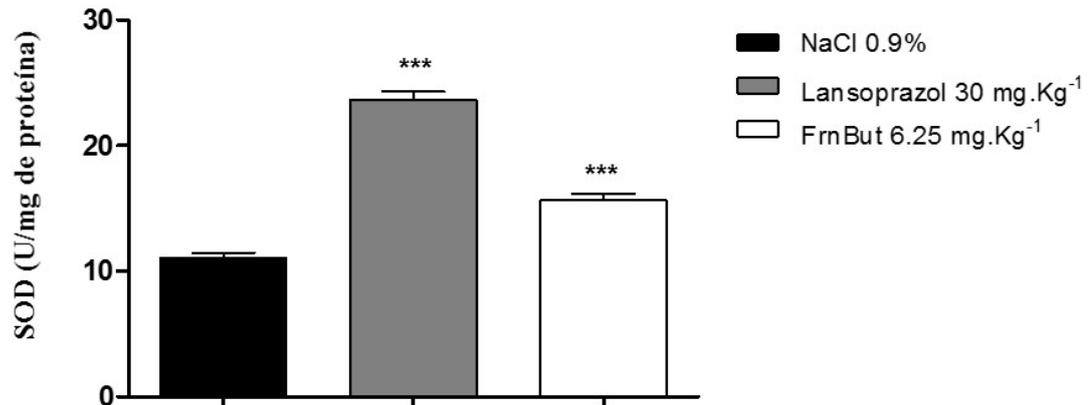


Figura 7. Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia-reperfusão. ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett com os resultados expressos como média \pm dp. *** $p < 0.001$ comparados ao controle NaCl 0.9%.

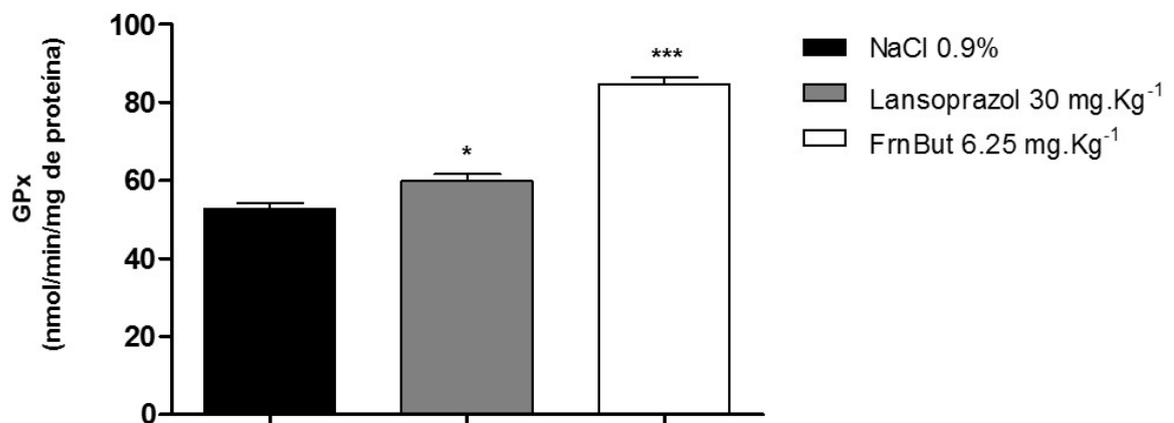


Figura 8. Atividade enzimática da Glutaciona Peroxidase (GPx) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia-reperfusão. ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett com os resultados expressos como média \pm dp. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparados ao controle NaCl 0.9%.

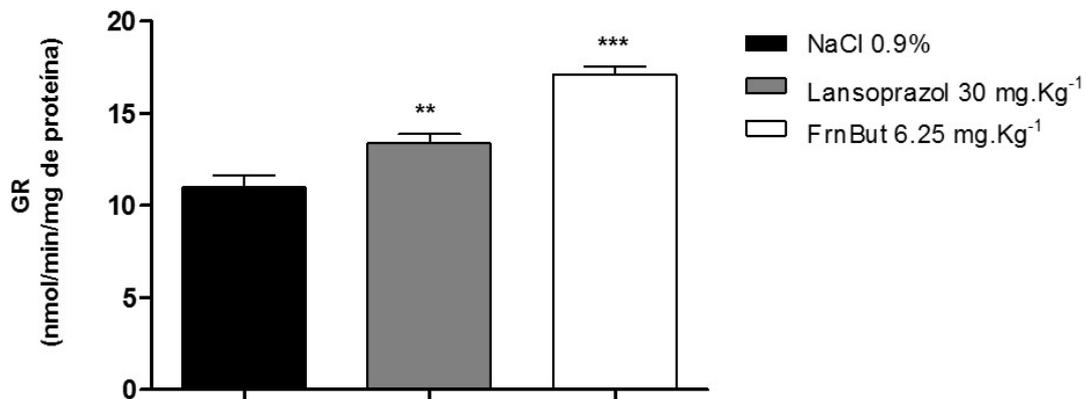


Figura 9. Atividade enzimática da Glutathione Redutase (GR) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia-reperfusão. ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett com os resultados expressos como média \pm dp. ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ comparados ao controle NaCl 0.9%.**

Durante a isquemia ocorre redução do fluxo sanguíneo no órgão levando a uma sequência de reações químicas que resultam em disfunção, necrose celular e aparecimento de metabólitos tóxicos, contribuindo para a morte celular. Já na reperfusão, “espécies reativas de oxigênio” - EROs - são geradas, especialmente no sistema xantina-oxidase e na ativação de neutrófilos, causando peroxidação lipídica no tecido; assim, a combinação de EROs com a secreção ácida da mucosa gástrica, promove danos (MAHMOUD-AWNY et al., 2015). Essas lesões gástricas ocorridas na fase de reperfusão são consideradas mais severas do que aquelas que ocorrem durante a isquemia, já que há participação de EROs (incluindo biomoléculas como O_2 , OH^- e H_2O_2 que atacam lipídeos de membrana, ácidos nucleicos, enzimas e receptores), ocasionam alterações na atividade celular, na estrutura e no transporte de proteínas, além de modificações, por exemplo, no influxo de cálcio nas células (BRITO *et al.*, 2015).

De acordo com Lushchak (2015), a enzima Superóxido Dismutase (SOD) trata-se da primeira enzima antioxidante da mucosa gástrica sendo capaz de catalizar a dismutação de O_2 , fato que torna esta espécie extremamente reativa em peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), que é menos agressivo à mucosa gástrica. O segundo passo do metabolismo do H_2O_2 depende da atividade da GPx. A redução do H_2O_2 em água pela GPx é acompanhada pela conversão da glutathione na forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG), que depois é convertida em GSH pela GR. Sendo assim, a elevação dos níveis das enzimas SOD, GPx e GR após

administração de FrBut em ratos submetidos ao processo de IR podem justificar mecanismos antioxidantes clássicos por parte da fração utilizada e, deste modo, fortalecer proposta antioxidante como mecanismo central da atividade antiulcerogênica.

Também pode-se observar, quando comparadas ao grupo controle (NaCl 0.9%) a redução dos níveis da enzima Mieloperoxidase (MPO) em 37% (** $p < 0.001$) (Figura 10).

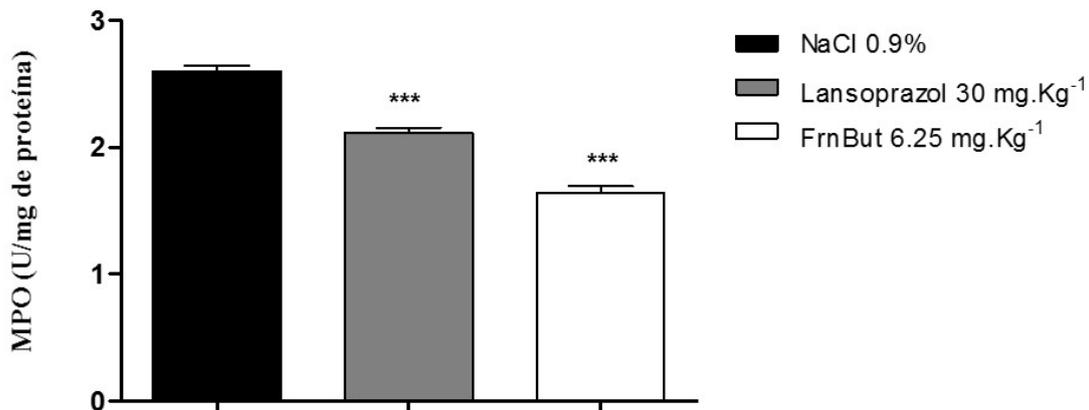


Figura 10. Atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia-reperfusão. ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett com os resultados expressos como média \pm dp. * $p < 0.001$ comparados ao controle NaCl 0.9%.**

A enzima Mieloperoxidase (MPO) é citada na literatura como um marcador de processo de infiltração de neutrófilos, tendo seus níveis comumente elevados nos processos de indução de úlceras gástricas. Como consequência a enzima NADPH oxidase, presente nos neutrófilos, acaba contribuindo para a síntese de EROS. Além disso, neutrófilos são capazes de promover aumento da permeabilidade vascular induzida pela reperfusão, contribuindo para o desenvolvimento de lesões ulcerogênicas (DE-FARIA *et al.*, 2012). Sendo assim, a redução dos níveis de MPO observados na Figura 10, após tratamento com FrBut em ratos submetidos ao processo de IR, complementa mecanismo antioxidante na mucosa gástrica.

Dados científicos apontam que, no processo de úlcera gástrica induzida por IR, após o processo de reperfusão, as espécies reativas de oxigênio (EROS) são geradas a partir da enzima Xantina Oxidase e ativação de neutrófilos, levando a mucosa gástrica ao processo de peroxidação lipídica (LPO) que, em combinação

com o processo de secreção ácida-gástrica resulta em lesões ulcerogênicas extremamente danosas e morte celular (MAHMOUD-AWNY *et al.*, 2015). Deste modo, torna-se fundamental avaliação da peroxidação lipídica (LPO) no protocolo experimental de úlcera gástrica induzida por IR.

A Figura 11 demonstra o índice de peroxidação lipídica (LPO) na mucosa gástrica de ratos submetidos ao processo de úlcera gástrica por IR e tratados previamente com FrBut obtidas a partir das folhas de *Bauhinia forficata*. Tais dados apontam redução no índice de peroxidação lipídica em torno de 35% (** $p < 0.001$) quando comparado ao controle negativo (NaCl 0,9%), fortalecendo novamente proposta de mecanismo antioxidante por parte da amostra vegetal analisada.

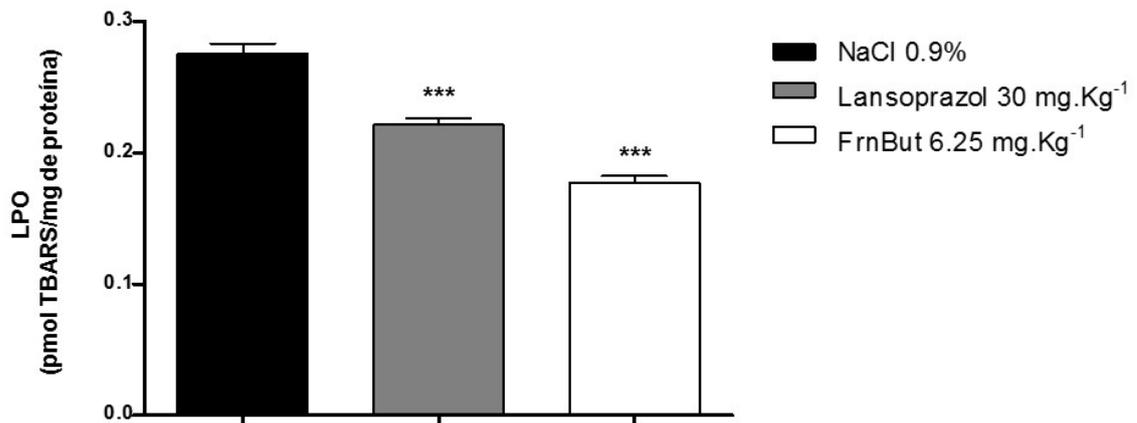


Figura 11. Determinação do índice da Peroxidação Lipídica (LPO) na mucosa gástrica de ratos submetidos à úlcera induzida por isquemia-reperfusão. ANOVA seguida de teste a posteriori de Dunnett com os resultados expressos como média \pm dp. * $p < 0.001$ comparados ao controle NaCl 0.9%.**

Atualmente, diversas são as possibilidades farmacológicas objetivando o tratamento da patologia da úlcera gástrica. Dentre tais classes terapêuticas destacam-se os antagonistas de receptores H₂ e os inibidores da bomba protônica. No entanto, trabalhos apontam que, após 6 meses da retirada do uso de fármacos pertencentes a estas classes terapêuticas, cerca de 50% dos pacientes apresentam recorrência das lesões ulcerogênicas. Deste modo, a alta taxa de recorrência após a cicatrização da úlcera gástrica é ainda um grande problema a ser abordado dentro do contexto clínico (JIANG *et al.*, 2016). Além disso, diversos são os trabalhos que tem demonstrado que o uso crônico de fármacos pertencentes às classes dos

inibidores de bomba protônica e os antagonistas de receptor H_2 têm desencadeado problemas à saúde humana, tais como aumento da incidência de infecções gastrointestinais, redução na qualidade do processo digestivo, desencadeamento de quadros anêmicos, aumento da incidência do desenvolvimento de osteoporose e demência (VAN DER HOORN et al., 2015; GOMM et al., 2016; WISE, 2016). Estes dados reforçam a necessidade de estudos contínuos no que tangem ao desenvolvimento de novas moléculas que possam promover melhora no quadro de pacientes portadores da úlcera gástrica, tendo destaque, no presente trabalho, aspectos relacionados a essas novas propostas de mecanismos de ação.

Com intuito de correlacionar atividade antiulcerogênica via mecanismos antioxidantes observados após administração de FrBut, foi realizada a avaliação antioxidante “*in vitro*” sobre o radical DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhydrazil). Os resultados demonstram a doação de elétrons (Figura 12) e o que pode ser atribuído o potencial antioxidante da espécie da *Bauhinia* seria o alto teor de compostos fenólicos apresentados na estrutura da Kaempferitrina.



Figura 12. Análise da atividade antioxidante *in vitro* (PAINEL A) da fração butanólica de *B. forficata*.

Também com intuito de correlacionar atividade antiulcerogênica via mecanismos antioxidantes observados após administração de FrBut, foi realizada análise fitoquímica da referida fração. Após análises por espectrometria de massas pode-se observar a presença de flavonoides na amostra vegetal analisada, tendo como destaque a presença de Kaempferitrina. As figuras 13, 14, 15 e 16 apresentam

as moléculas identificadas na fração butanólica, analisadas por ESI-MS (modo positivo).

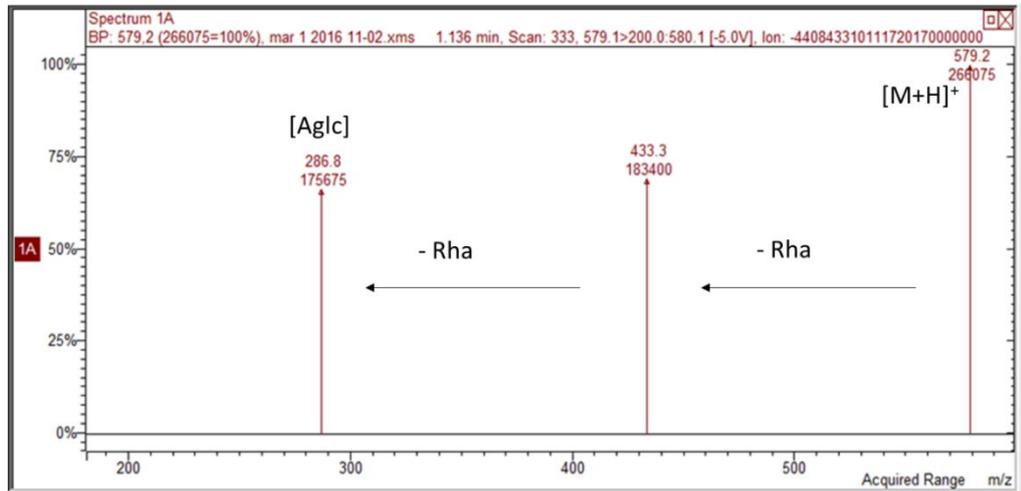


Figura 13. Molécula identificada como Kaempferitrina (Kaempferol -3,7- di-O-rhamnoside) apresentando o íon pseudo-molecular de $[M+H]^+$ em 579 m/z. Os fragmentos de m/z 433 e 286 indicam as perdas dos resíduos rhamnosyl (146 u.m.a), conforme previamente descrito por Ferreres et al. (2012). Aglc, aglicona kaempferol; Rha, resíduo rhamnosyl.

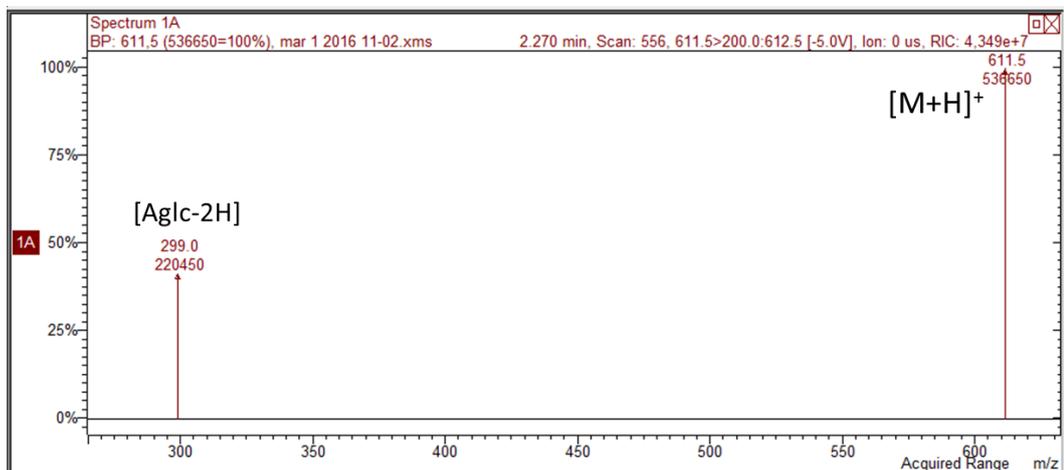


Figura 14. Molécula identificada como Rutina (Quercetina-3-O rutinosídeo) apresentando o íon pseudo-molecular de $[M+H]^+$ em 611 m/z. O fragmento de m/z 299 indica a presença de quercetina como núcleo flavonóide (aglicona), conforme previamente descrito por Ferreres et al. (2012).

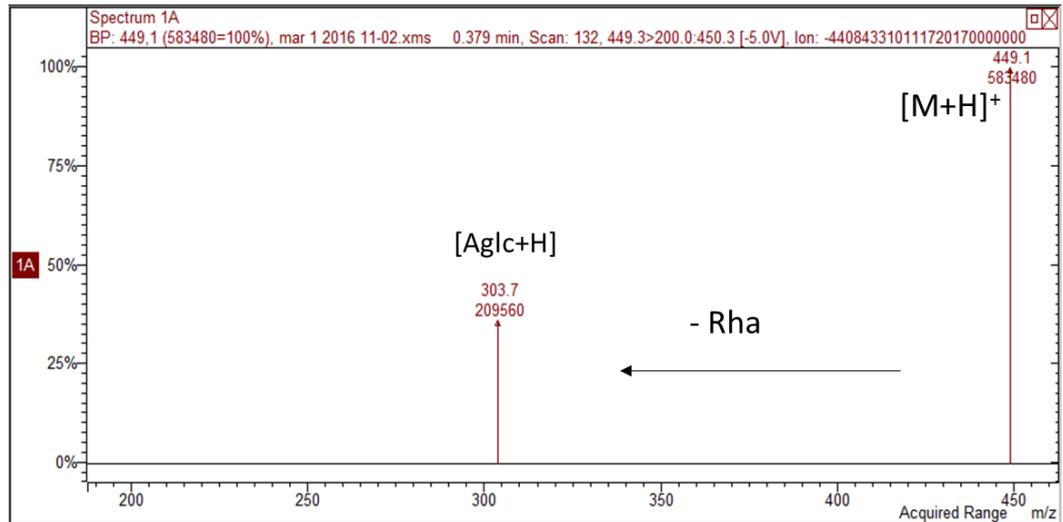


Figura 15. Molécula identificada como Quercetina-3-rhaminoside apresentando o íon pseudo-molecular de $[M+H]^+$ em 449 m/z. O fragmento de m/z 303 indica a perda de um grupo rhaminosyl (146 u.m.a; $C_6H_{11}O_4$), apresentando a aglicona quercetina como núcleo flavonoide, conforme previamente descrito por Ferreres et al. (2012). Aglc, aglicona quercetina; Rha, resíduo rhamnosyl.

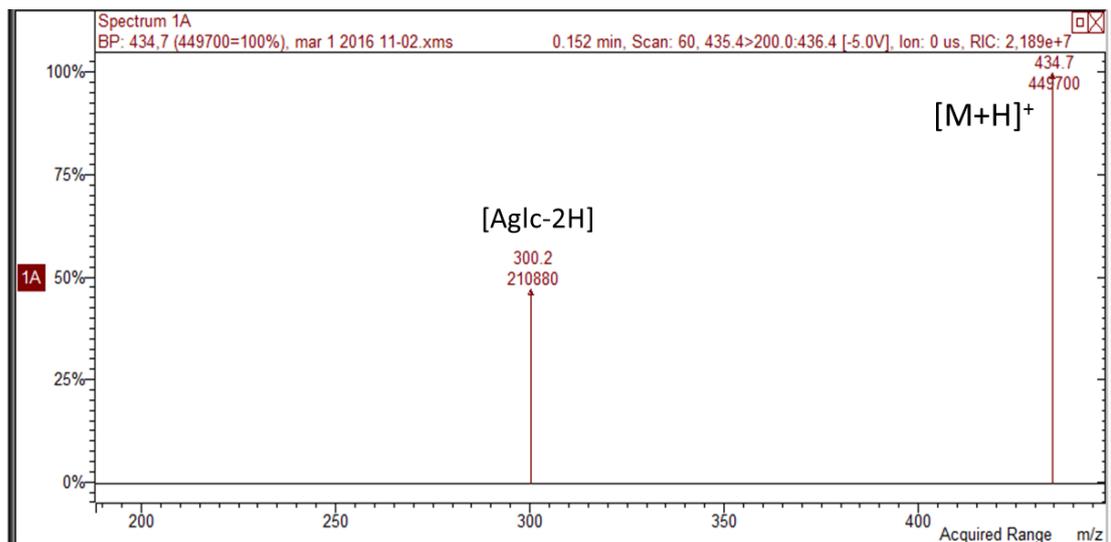


Figura 16. Molécula identificada como Quercetina-3-pentose apresentando o íon pseudo-molecular de $[M+H]^+$ em 435 m/z. O fragmento de m/z 300 indica a perda de um resíduo pentosil apresentando a aglicona quercetina como núcleo flavonoide, conforme previamente descrito por Ferreres et al. (2012). Aglc, aglicona quercetina.

Plantas contendo flavonóides são amplamente conhecidas por suas propriedades antioxidantes. Em virtude do amplo estudo de plantas contendo esta classe de metabólitos secundários vegetais, muitos são os flavonóides já identificados. Estima-se que sejam conhecidos mais de 8000 diferentes flavonoides, sendo que, muitos destes têm estudos avaliando suas propriedades antioxidantes

(PIETTA, 2000). Dentre estes milhares de flavonóides, destaca-se no presente trabalho a Kaempferitrina.

De acordo com VELLOSA *et al.* (2015), demonstram em seus trabalhos que a Kaempferitrina apresenta importantes propriedades antioxidantes. Além disso, comprova-se que a Kaempferitrina está entre os compostos de maior eficácia antiulcerogênica, sendo tal mecanismo associado às propriedades antioxidantes (KWIECIEN *et al.*, 2002). Considerando as atividades antiulcerogênica e antioxidante observadas após administração de FrBut e, levando-se em conta a presença de Kaempferitrina na fração vegetal analisada, pode-se atribuir tal atividade farmacológica a este composto fitoquímico.

A despeito dos dados farmacológicos obtidos, chama também atenção o fato de que o Lansoprazol (fármaco utilizado como controle positivo), faz parte da classe dos inibidores de bomba protônica e tem destaque mundial no que diz respeito ao consumo. Tal fato deve-se à sua potente capacidade em promover redução da secreção de ácido-gástrico e conseqüentemente tratar de maneira efetiva a patologia da úlcera gástrica. No entanto, vale ressaltar que, diversos são os trabalhos que tem atribuído a esta classe terapêutica a capacidade de contribuir para o desenvolvimento de demência (GOMM *et al.*, 2016) e osteoporose (HOORN *et al.*, 2015), fatos que tem demasiadamente preocupado a comunidade científica. Considerando que compostos com propriedades antioxidantes têm como uma de suas virtudes o tratamento e/ou prevenção dos mais variados processos patológicos, pode-se associar que FrBut contendo Kaempferitrina obtida a partir das folhas poderia não apenas tratar as úlceras gástricas, mas também reduzir a incidência do desenvolvimento de demência e osteoporose induzidos pelo uso abusivo de fármacos pertencentes à classe dos inibidores de bomba protônica.

Produtos químicos são amplamente utilizados na sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. No entanto, uma das desvantagens da produção e utilização destes está nos resíduos que são gerados, que podem impactar de forma negativa o meio ambiente (SILVA & COLLINS, 2011).

A constatação da presença de fármacos no meio aquático e seus possíveis impactos ambientais têm se tornado uma questão de grande importância, não só pelo motivo de serem moléculas extremamente ativas biologicamente, mas também pelo fato de sua produção ocorrer em grande volume (SUCHARA, 2007). Apesar da

evolução acerca dos estudos ecotoxicológicos, não foram encontrados dados que correlacionem estudos em laboratório com propósito de avaliar risco ambiental por parte das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos.

Com a presença de compostos químicos nas plantas, com propriedades farmacológicas e toxicológicas, pode-se pressupor que possam trazer danos ambientais assim como os sintéticos, porém vale ressaltar que produtos oriundos de plantas medicinais podem apresentar eficácia farmacológica similar ou melhor, quando comparados aos medicamentos sintéticos disponíveis e, ao mesmo tempo, menor risco ao meio ambiente (TOMA *et al.*, 2014).

Levando-se em conta tais informações, foram realizadas análises ecotoxicológicas utilizando-se de ensaios de fertilização em modelo agudo com *Lytechinus variegatus*, tendo como propósito avaliar o risco ecotoxicológico de FrBut de *Bauhinia forficata* (Figura 17).

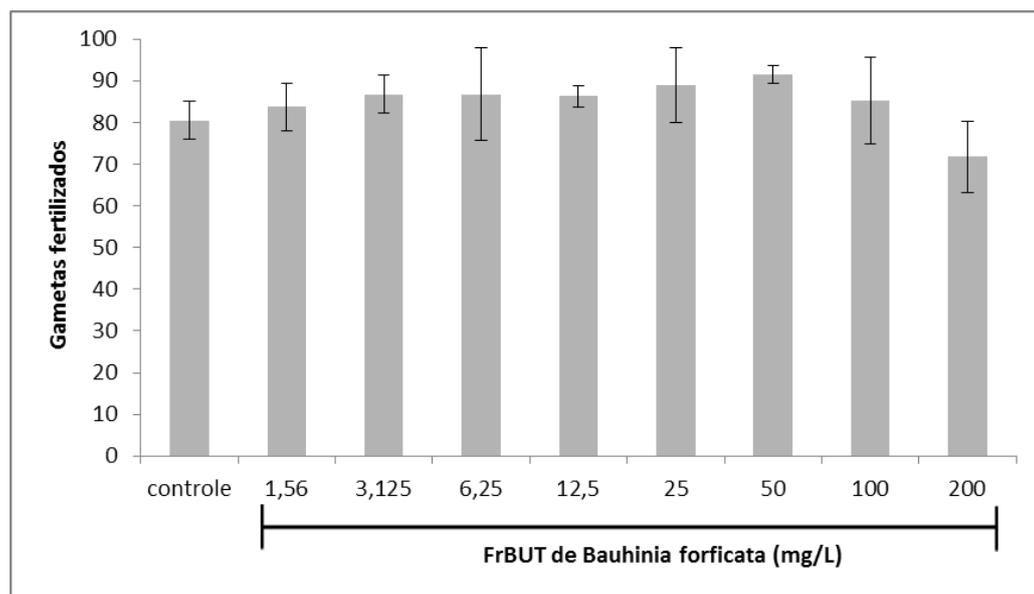


Figura 17. Valores médios de toxicidade aguda (fertilização) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de FrBUT de *Bauhinia forficata*. Os valores expressos representam a média ± desvio padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

A diretiva europeia 93/67 é amplamente utilizada pelo mundo para notificação e classificação de substância de risco ambiental. Tal diretiva é capaz de promover, de acordo com os resultados de toxicidade obtidos em laboratório, a classificação do perfil ecotoxicológico da substância em questão. Esta classificação é determinada

através de ensaios que demonstrem a chamada Concentração Efetiva 50% (CE_{50}), que expressa à concentração da amostra que é capaz de causar um efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste. Com base destes dados é possível classificar estas substâncias como: extremamente tóxicos (compostos com $CE_{50} < 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$); muito tóxicos (CE_{50} entre 0,1 e 1 mg.L^{-1}); tóxicas (CE_{50} entre 1 e 10 mg.L^{-1}); nocivas (CE_{50} entre 10 e 100 mg.L^{-1}) e não tóxicas (CE_{50} maior que 100 mg.L^{-1}) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1996).

Os dados obtidos no referido ensaio não demonstram influência sobre a fertilização de gametas dos mesmos, apresentando uma CE_{50} maior que 200 mg.L^{-1} . Portanto, segundo a diretiva 93/67/EEC (CEC, 1996), a FrBut de *Bauhinia forficata* pode ser considerada como não tóxica ao meio ambiente (Tabela 2). Além disso, dados obtidos nos ensaios de teste embriolarval em modelo crônico utilizando *L. variegatus* com exposição à FrBUT de *B. forficata* demonstram valores de CEO = 25 mg.L^{-1} e CENO = $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 18). Sendo que, estatisticamente, foi encontrado um valor de $CE_{50} = 35,24 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo, então, que o tempo de exposição demonstra afetar o desenvolvimento embriolarval dos organismos e pela classificação da diretiva pode ser classificada como nociva.

Tabela 2. Classificação de FrBUT de *Bauhinia forficata* baseada na diretiva 93/67/EEC da União Europeia.

	Não tóxico $CE_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$	Nocivo CE_{50} entre 10 e 100 mg.L^{-1}	Tóxico CE_{50} entre 1,0 e 10 mg.L^{-1}	Muito tóxico CE_{50} entre 0,1 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$	Extremamente tóxico $CE_{50} < 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$
Ensaio agudo					
Ensaio crônico					

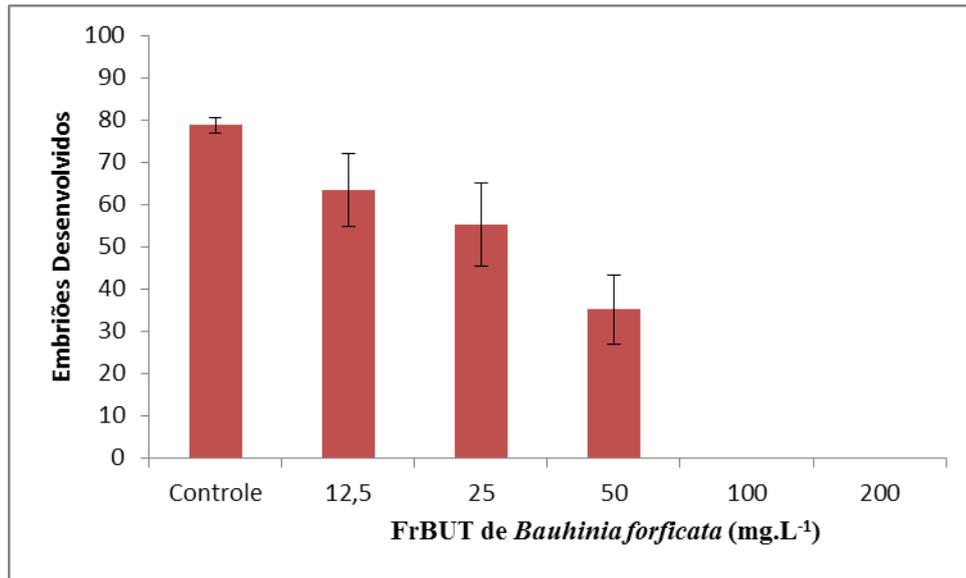


Figura 18. Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de FrBUT de *Bauhinia forficata*. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

Dados relacionados à farmacocinética são de fundamental importância para a avaliação do risco ambiental dos fármacos. Dentre os conceitos associados a esta linha farmacológica encontram-se os valores de constante entre octanol e água (K_{ow}). Sabe-se que, a partir destes valores, é possível correlacionar os parâmetros farmacocinéticos de uma molécula, tais como absorção, distribuição, metabolização e excreção no organismo humano, bem como a propriedade de bioacumulação em organismos aquáticos, contribuindo deste modo para análises ecotoxicológicas. De acordo com esta visão, fármacos que apresentam maiores valores de K_{ow} possuem maior efeito bioacumulativo, aumentando deste modo, a possibilidade da geração de danos ecotoxicológicos. Levando-se em conta tais informações, cabe analisar dados de K_{ow} de fármacos antiulcerogênicos da classe dos inibidores da bomba de prótons – IBPs (Tabela 3).

Tabela 3. Kow de fármacos antiulcerogênicos da classe dos inibidores da bomba de prótons

Inibidores da bomba de prótons	K _{ow}
Pantoprazol	2.22
Omeprazol	2.23
Esomeprazol	2.46
Tenatoprazol	2.83
Rabeprazol	2.99
Lanzoprazol	3.68

Fonte: EPI Suite

Tendo como suporte os valores de Kow dos fármacos antiulcerogênicos da classe dos IBPs, a tabela acima apresenta fármacos em ordem crescente de risco ecotoxicológico (Pantoprazol: menor valor de Kow – menor risco ecotoxicológico, e Lanzoprazol: maior valor de Kow – maior risco ecotoxicológico).

Os IBPs constituem hoje, uma das classes de medicamentos mais usados mundialmente para o tratamento das doenças ácido-pépticas. O primeiro IBP foi lançado na Europa e no ano seguinte nos Estados Unidos. Uma década após, verificou-se a expansão das indicações terapêuticas. A decisão de prescrever um ou outro IBP deve-se levar em conta a sua eficácia, segurança e custo. Apesar de apresentarem estruturas químicas e mecanismo de ação semelhantes, existem diferenças farmacológicas significativas entre os IBPs (FREITAS *et al*, 2002), sendo o omeprazol o IBP de tratamento de primeira escolha (RIBEIRO *et al*, 2010).

Por conta dos custos e efeitos colaterais, existe um aumento crescente do uso dos demais IBPs, que apresentam valores maiores de Kow quando comparados ao omeprazol. Ao mesmo tempo, levando-se em consideração aspectos relacionados aos valores de Kow, tais fármacos quando excretados nas estações de tratamento de esgoto tendem a ser mais agressivos ao meio ambiente trazendo, portanto maior risco ambiental. Neste sentido, ganha destaque a FrBUT de *Bauhinia forficata*, uma vez que a kaempferitrina, marcador químico referência encontrado na fração em estudo, apresenta Kow = -1,10. Deste modo, apesar de FrBUT ser classificada como nociva ao meio ambiente conforme diretiva 93/67/EEC, quando comparada aos valores de Kow dos antiulcerogênicos da classe dos IBPs, esta poderia ser considerada como de menor risco ecotoxicológico, sendo supostamente menos agressiva ao meio ambiente.

Notando esta grande diferença de K_{OW} , realizamos os testes embriolarval em modelo crônico utilizando *L. variegatus* com exposição à omeprazol, sendo o este o IBP de tratamento de primeira escolha (RIBEIRO *et al*, 2010), e à lanzoprazol, o medicamento que apresenta o maior valor de K_{OW} (EPI Suite).

Os dados obtidos no ensaio com omeprazol demonstram influência sobre a fertilização de gametas dos mesmos, sendo os valores de CEO = 0,78 mg/L e CENO = 0,39 mg/L (Figura 19).

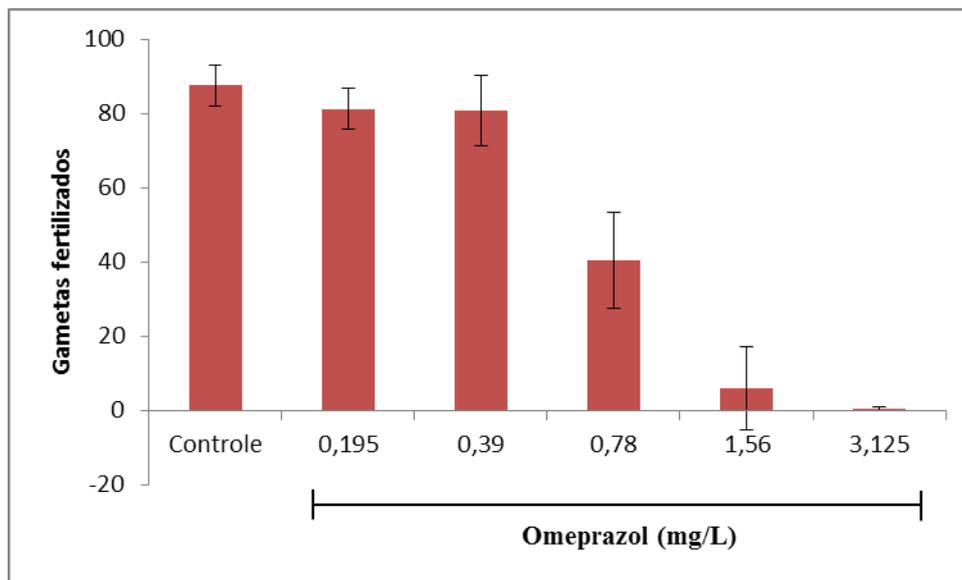


Figura 19. Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Omeprazol. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

Assim como os dados do Omeprazol demonstram efeito, os dados obtidos no ensaio com Lanzoprazol demonstram uma influência maior ainda sobre a fertilização de gametas dos ouriços, sendo os valores de CEO = 0,39 mg.L⁻¹ e CENO = 0,195 mg.L⁻¹ (Figura 20).

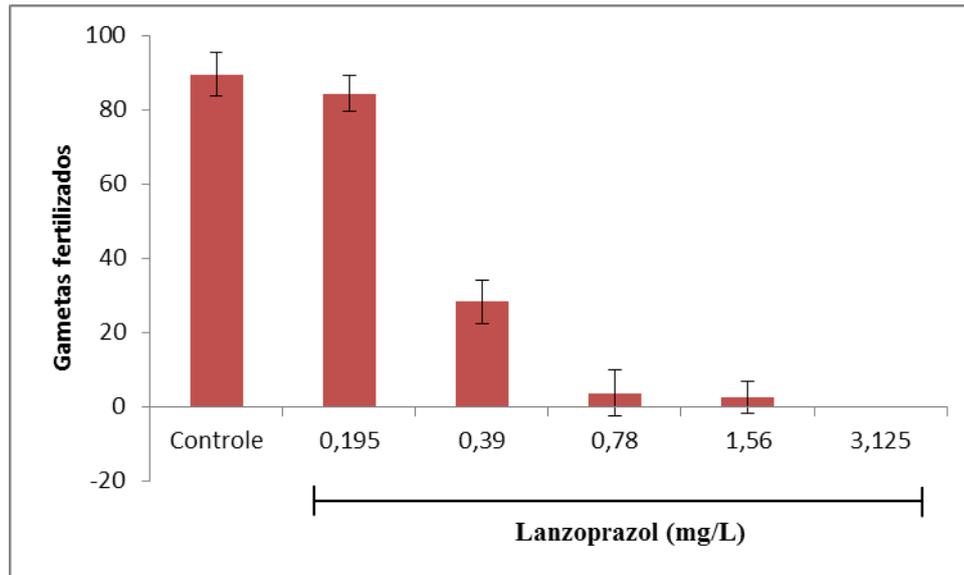


Figura 20. Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Lansoprazol. Os valores expressos representam a média \pm desvio padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

Perante tais resultados, podemos notar que a tabela de K_{OW} nos fornece dados compatíveis com os experimentos. E, em comparação de seus valores de Concentração Inibitória Média (CI50), podemos perceber o quanto existe de diferença de concentração necessária entre os medicamentos sintéticos com o medicamento fitoterápico em estudo (Tabela 4), podendo sugerir que, por conta do mecanismo de ação dos IBP's, o extrato pode não afetar a integridade da membrana celular dos organismos não-alvo.

Tabela 4. CI50 dos fármacos sintéticos omeprazol e lansoprazol e de FrBut *Bauhinia forficata*.

Medicamentos Sintéticos	CI50 (mg.L ⁻¹)
Omeprazol	0,74
Lansoprazol	0,33
Fitoterápico	
<i>Bauhinia forficata</i> L.	43,12

Os dados gerados em estudos de toxicidade baseados em respostas tais como mortalidade, reprodução, desenvolvimento e crescimento, muitas vezes não detectam os mecanismos de ação de substâncias bioativas como os fármacos e este fato pode mascarar uma avaliação do risco potencial para biota aquática

(CORTEZ, 2010). Caracciolo *et al.* (2014), afirma que o omeprazol pode ser raramente encontrado como contaminador do ambiente aquático, pois sua excreção ocorre principalmente pelos seus metabólitos. Mas sabemos que há em curso uma grande quantidade de pesquisas sobre mecanismos de degradação, cinética, o isolamento e a toxicidade dos produtos de degradação, sendo este último aspecto de especial interesse, uma vez que os metabólitos podem ser ainda mais tóxicos do que a molécula de origem (DELLAGRECA *et al.*, 2006). Vale ressaltar que não há registro de estudos quando o fármaco sintético é comparado ao seu equivalente terapêutico fitoterápico.

Seria de se esperar que, produtos oriundos de plantas medicinais, tal como a FrBut de *Bauhinia forficata*, não apresentasse riscos ao meio ambiente pelo fato de se tratar de substâncias de origem natural, que apesar de no ensaio agudo apresentar uma classificação de não tóxica, no ensaio crônico apresenta uma Concentração Inibitória Média de 43,12 mg.L⁻¹, podendo causar portanto efeitos nocivos, dependendo da concentração e do tempo de exposição. Podemos, então, reforçar a presença de compostos químicos nas plantas medicinais que, por sua vez, interagem com alvos moleculares nos organismos alvo apresentando suas propostas terapêuticas, bem como os não-alvos, trazendo como consequência riscos ao meio ambiente (PIETRO, 2015). Além disso, pode ser de grande relevância a discussão pelo fato de que a diretiva 93/67/EEC da União Europeia foi elaborada para classificação de compostos químicos isolados e considerando que a FrBut, além da kaempferitrina, possui outros compostos químicos de constituição desconhecida, pode-se ressaltar a hipótese da criação de uma nova diretiva mais específica para medicamentos fitoterápicos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que FrBut obtido a partir das folhas de *Bauhinia forficata* apresenta significativa atividade antiulcerogênica e antioxidante quando administrado na dosagem de 6,25 mg.kg⁻¹. A administração de FrBut de *Bauhinia forficata* aumentou de maneira significativa os níveis das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GR ao passo que o índice de peroxidação lipídica e os níveis da enzima MPO (ambos envolvidos no processo de ulceração gástrica) foram reduzidos com a administração prévia de FrBut. Tal atividade farmacológica após análise fitoquímica pode ser atribuída aos flavonoides tendo como destaque a kaempferitrina. Quanto à avaliação ecotoxicológica, FrBut apresentou efeito tóxico relativamente baixo em exposição crônica ao *Lytechinus variegatus* quando comparado aos inibidores de bomba protônica Omeprazol e Lansoprazol. Dados apontam CI50 de 43.13 mg.L⁻¹ para FrBUT; CI50 de 0.74 mg.L⁻¹ para Omeprazol e CI50 de 0.33 mg.L⁻¹ para o lansoprazol. Nota-se que, do ponto de vista comparativo FrBut apresenta valores que são considerados menos nocivos ao meio ambiente quando comparada aos inibidores de bomba protônica.

Tais dados são relevantes à medida que poderão servir como base para futuras análises farmacológicas, fitoquímicas e ecotoxicológicas por parte do extrato obtido a partir das folhas de *Bauhinia forficata*, a fim de que possam vir a fazer parte da lista de fitoterápicos do SUS como outra alternativa de tratamento a base de plantas ou até mesmo utilizando a molécula como protótipo para síntese e manipulação de medicamentos antiulcerogênicos com mecanismos antioxidantes, bem como base para futuros estudos ecotoxicológicos, comparando o extrato com outros fitoterápicos de mesma classe ou utilizando outros biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-domar (Echinodermata: Echinoidea)**. Rio de Janeiro. NBR 15350, 2006.

ARAKAWA T., WATANABE T., TANIGAWA T., et al. **Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance**. World J. Gastroenterol., 18 (2012), pp. 4811–4822.

ARIGONY, A. L. V. **Determinação química e biológica de *Bauhinia forficata* Link**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.

BARRETT, K. E. **Fisiologia gastrintestinal**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 336p.

BEAUSSE, J. Pharmaceuticals - horizontal – 26 July 2004.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; et al. **Oxidative Stress: An Essential Factor In The Pathogenesis Of Gastrointestinal Mucosal Diseases**. Physiol Rev 94: 329–354, 2014.

BIGHETT et al., 2002. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. Rev. Ciênc. Méd., Campinas, 11(1): 55-60, jan/abr., 2002.

BILA, D.M; DEZOTTI, **Fármacos no Meio Ambiente**. Química Nova vol.26 nº.4 São Paulo July/Aug. 2003.

BONIFÁCIO B.V.; da SILVA P.B.; RAMOS M.A.S. et al. **Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review**. Internat. J. Nanomed., 9: 1–15, 2014.

BRADFORD, M. M.; Anal. Biochem. 1976, 72, 248.

BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensm-Wiss Technol* 28: 25-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos /** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 148 p., 2006.

BRITO A. R. M. S., FARIA F. M., SILVA M. A. et al. **Composições farmacêuticas contendo fração obtida do extrato *Rhizophora mangle* e seu uso.** Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, 2015.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 17(10):2675-2685, 2012.

BRZOZOWSKA I.; TARGOSZ A.; SLIWOWSKI Z. et al. **Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor.** *J. Physiol Pharmacol.*, 55: 773-790, 2004.

CABEZA, R., LOCANTORE, J. K., AND ANDERSON, N. D. 2001. **Lateralization of prefrontal cortex activity during episodic memory retrieval: Evidence for the production-monitoring hypothesis.** *J. Cognit. Neurosci.*, in press.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. **Glutathione reductase.** *Methods in Enzymology* Volume 113, 1985, Pages 484–490.

CARVALHO, A. S. T. **Úlcera Péptica.** *J Pediatr (Rio J)* 2000;76(Supl.2):s127-s34.

CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment.** Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 1996.

CHAPMAN, P.M.. **Emerging substances** – Emerging Problems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n.6, p. 1445-1447, 2006.

CLEUVERS, M., (2003). **Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects.** *Toxicology Letters*, Vol. 142, pp. 185–194.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards-** 6th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

COCCARO, P. **Análise Fitoquímica e Avaliação das Atividades Antifúngica *in vitro* da Fração Acetato de Etila Obtida a Partir das Folhas de *Terminalia Catappa L. (Combretaceae)*.** Santos: UNISANTA, 2014. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Costeiros e Marinhos, 2014.

COELHO, L.G. V. **Úlcera Péptica.** Federação Brasileira de Gastroenterologia. Janeiro-2003.

CORDEIRO, C. W. **Atividade da casca da croton urucurana na prevenção e cura de úlcera gástrica induzida em ratos.** Universidade Federal da Grande Dourados – MS, 2012.

CORRÊA, J. B., SCHNEIDER, A., CAVINATTO, A., et al. **Rendimento do Óleo Essencial das Folhas e Frutos de uma Espécie da Família Anacardiaceae.** XXI Seminário de Iniciação Científica, 2013.

CORTEZ, F.S.; **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear, 2010.

DA SILVA C. G. A.; COLLINS C. H.. **Aplicações De Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Para O Estudo De Poluentes Orgânicos Emergentes.** Quim. Nova, Vol. 34, No. 4, 665-676, 2011.

DAL-PAZ, K.; NAVARRO-RODRIGUEZ, T.; MORAES-FILHO, J. P. **Inibidores da bomba protônica.** Grupo Editorial Moreira Jr, Setembro, 2008, págs. 46-51.

DAUGHTON, C. G. **Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis.** Science of the Total Environment 562 (2016) 391–426.

DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; LUIZ-FERREIRA, A. et al. **Antioxidant Action of Mangrove Polyphenols against Gastric Damage Induced by Absolute Ethanol and Ischemia-Reperfusion in the Rat.** Scientific World Journal. 2012; 2012: 327071.

DELELLA F.K.; JUSTULIN L.A.J.; FELISBINO S.L. **Finasteride treatment alters MMP-2 and -9 gene expression and activity in the rat ventral prostate.** Inter. J. Andrology, 33:114-122, 2010.

DINH T.; TECILAZICH F.; KAFANAS A. et al. **Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration.** Diabetes, Nov;61(11):2937-47, 2012.

DRIVER V.R.; YAO M.; KANTARCI A. et al. **A prospective, randomized clinical study evaluating the effect of transdermal continuous oxygen therapy on biological processes and foot ulcer healing in persons with diabetes mellitus.** Ostomy Wound Manage. 2013 Nov;59(11):19-26.

EI-HABIT OH, SAADA HN, AZAB KS. et al. **The modifying effect of β -carotene on gamma radiation: induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats.** Mutat Res. 2000;25:551-560.

ENGEL I. C.; FERREIRA R. A.; CECHINEL-FILHO V.. et al. **Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae).** Rev. bras. farmacogn. vol.18 no.2 João Pessoa Apr./June 2008.

FARIAS L.S.; MENDEZ A. S. L. **LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. pruinosa.** Quim. Nova, Vol. 37, No. 3, 483-486, 2014.

Farmacopéia Brasileira 2000. 4^a. Ed., Parte II. São Paulo: Atheneu, 2000.

FERREIRA, A. L. **Atividade antiulcerogênica da espécie *anacardium humile* St. Hil. (anacardiaceae).** Dissertação de mestrado – UNICAMP, Campinas-SP, 2005.

FERRERES F, GIL-IZQUIERDO A, VINHOLES J, et al. ***Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties.** Food Chem. 2012 Sep 15;134(2):894-904.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades Biológicas dos Flavonóides.** Dissertações de Mestrado. Repositório institucional da Universidade Fernando Pessoa. 2013.

FREITAS J. A.; LIMA L. M. P.; RANIERI J. L. et al. **Avaliação da eficácia, segurança e tolerabilidade de rabeprazol no tratamento de doenças ácido-pépticas.** Arq. Gastroenterol. vol.39 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2002.

GANGULY K.; KUNDU P.; BANERJEE A. et al. **Hydrogen peroxide-mediated downregulation of matrix metalloprotease-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants.** Free Radic. Biol. Med., 41(6):911-25, 2006.

GARCÍA S. O.; PINTO G. P.; ENCINA P. G. et al. **Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain.** Science of the Total Environment 444 (2013) 451–465.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 12 Ed. Editora McGrawHill, 757-769, 2012.

GONZALEZ FG, DI STASI LC 2002. **Antiulcerogenic and analgesic activities of the leaves of Wilbrandia ebracteata in mice.** Phytomedicine 9: 125-134.

GUIDOBONO F.; PAGANI F.; TICOZZI C. et al. **Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats.** Br. J. Pharmacol., 120: 581-586, 1997.

GUYTON, AC; HALL, JE. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11a ed. Elsevier, 2006.

HARSCH I.A.; BRZOZOWSKI T.; BAZELA K. et al. **Impaired gastric ulcer healing in diabetic rats: role of heat shock protein, growth factors, prostaglandins and proinflammatory cytokines.** Eur. J. Pharmacol., 481: 249-260, 2003.

HORST, H. **Estudo Fitoquímico Da Espécie Vegetal *Bauhinia Forficata*.** Trabalho de Conclusão de Curso, Curso De Graduação Em Química. Univesidade Federal De Santa Catarina. 2005.

HUMPHREY P RANG; MAUREEN M. DALE; J.M. RITTER. **Farmacologia.** Ed. Campus, 2012, 808 p.

IJIMA K.; KANNO T.; KOIKE T. et al. ***Helicobacter pylori*-negative, non-steroidal anti-inflammatory drug: Negative idiopathic ulcers in Asia.** World J. Gastroenterol., 20(3): 706-713, 2014.

JAIN, P. **Secondary metabolites for antiulcer activity.** Nat Prod Res. 2016 Mar;30(6):640-56.

JIANG, G.; GE, H.; LIANG, G.; et al. **Therapeutic and recurrence-preventing effects of Qi-Replenishing and Blood-Activating Formula in rats with acetic acid-induced gastric ulcer.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2016; 9(1): 81–85.

KAWAI S., SASAKI, O., HAYASAKA, Y. et al. (1994) **Biosynthesis of avenic acid A in oat cv. Onward: studies with C or N labeled compounds.** Plant and Soil. 165, 285-289.

KLEIN, T. **Análise Fitoquímica.** Portal Educação, maio de 2014.

KONTUREK P.C.; BRZOZOWSKI T.; BURNAT G. et al. **Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats.** J. Physiol. Pharmacol., 61, 4, 429-436, 2010.

KONTUREK P.C.; SLIWOWSKI Z.; KOZIEL J. et al. **Probiotic bacteria *Escherichia coli* strain nissle attenuates acute gastric lesions induced by stress.** J. Physiol. Pharmacol., 60, Suppl 6, 41-48, 2009.

KOTZE M.; ELOFF J.N. **Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae)** S. Afr. J. Bot. 68:62-67, 2002.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. **Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model.** Gastroenterology, v. 87, p. 1344-1350, 1984.

KWIECIEŃ S., BRZOZOWSKI T., KONTUREK S.J.. **Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury.** Journal Of Physiology And Pharmacology 2002, 53, 1, 39—50.

LEE J.M.; KIM S.S.; CHO Y.S. **The Role of PPAR γ in Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinogenesis.** PPAR Res., Aug, 2012.

LEITE JPV, RASTRELLI L, ROMUSSI G, et al. 2001. **Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosids from Brazilian beverages (Maytenus ilicifolia and Maytenus aquifolium).** J Agr Food Chem 49: 3796-3801.

LIMA C.M.; LIMA A.K.; MELO M.G.D. et al. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.** Scientia Plena, vol. 10, num. 03, 2014.

LORENZI H. **Plantas medicinais no Brasil.** Editora Plantarum Ltda., Nova Odessa – SP, 2002.

MARTINS R.E.; CASTRO D.M.; CASTELLANI D.C. et al. **Plantas Mediciniais.** Ed. UFV : Viçosa, p. 155, 1998.

MAZZEO G.C.C.; SILVA M.P.O.; GUIMARÃES L.L. et al. **Evaluation of antiulcerogenic activity in an Aqueous Extract obtained from *Bauhinia forficata* leaves.** Rev. de Cien. Farmac. Básica e Aplic. (Artigo *in press*), 2015.

McCORD J. M. **The evolution of free radicals and oxidative stress.** The American Journal of Medicine Volume 108, Issue 8, June 2000, Pages 652–659.

MENSOR L.L.; MENEZES F.S.; LEITÃO G.G. et al. **Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.** Phytother Res., 15: 127-130, 2001.

MESQUITA, P. G. **Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* : busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes.** Dissertação de mestrado — Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.** Brasília, 2006.

MINOTTI G., AUST S. D.. **The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation.** Chemico-Biological Interactions Volume 71, Issue 1, 1989, Pages 1-19.

MIZUI T.; DOTEUCHI M. **Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats.** Jpn. J. Pharmacol., 33: 939-945, 1983.

MORAES-FILHO J. P. P.; CHINZON D.; DOMINGUES G. **Doença do refluxo gastroesofágico na gravidez.** RBM, Jun,V 7 0 N 6 págs.: 212-216, 2013.

NAKAJIMA A, WADA K, MIKI H. et al. **Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury.** Gastroenterol., 120: 460–469, 2001.

NEGRI, G. **Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 41, n. 2, abr./jun., 2005.

NEMITZ, M. C.; PICK MALLMANN, L. F.; STEPPE, M. **Evolução dos Métodos Quantitativos Empregados Para Plantas Medicinais ao Longo das Edições da Farmacopeia Brasileira.** Eletronic Journal of Pharmacy, vol. XIII, n. 1, p. 18-27, 2016.

NOGUEIRA L. A. M. **Análise dos efeitos de fármacos no meio ambiente aquático – uso de biomarcadores.** Universidade Fernando Pessoa – Porto, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** Analytical Biochemistry, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, A. E.; COSTA, T. D. **Interações Farmacocinéticas entre as Plantas Medicinais Hypericum perforatum, Gingko biloba e Panax gingseng e Fármacos Tradicionais.** Acta Farm. Bonaerense 23 (4): 567-78 (2004).

OYEBODE, O.; KANDALA, N.; CHILTON, P. J.; et al. **Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study.** Health Policy and Planning, 2016, 1–8.

PEIXOTO, V. C. S., TAVARES, M. I. B. **Caracterização estrutural da espécie *Bauhinia forficata*.** Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Sao Paulo, SP (Brazil). 2011.

PEREIRA D. G. **Importância do metabolismo no planejamento de fármacos.** Quim. Nova, Vol. 30, No. 1, 171-177, 2007.

PIRES A.M.; ARAÚJO P.S. **Risk perception and concepts about medicinal plants, herbal and allopathic medicines among pregnant women.** RBSP; 35(2): 320–333, 2011.

PIZZOLATTI M.G.; CUNHA JR. A.; SZPOGANICZ B. et al. **Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata*.** Quím. Nova, 26(4), 2003.

POIAN, A. T.; FOGUEL, D.; PETRETSKI, M. D.; MACHADO, O. L. T. **Bioqímica II.** Vol. 2. 2ª ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2007. 270p.

RAMACHANDRAN L., ARYAN M.K., SHANMUGAM M.K. et al. **Isorhamnetin Inhibits Proliferation and Invasion and Induces Apoptosis through the Modulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Activation Pathway in Gastric Cancer.** The J. Biol. Chem., Vol. 287, N. 45, pp. 38028–38040, November, 2012.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to Aquatic Ecotoxicology. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment.** Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.

RIBEIRO, S. O.; OLIVEIRA, T. T.; ZATTI, R. A.; et al. **Avaliação do efeito da Alcachofra (*Cynara scolymus*) na úlcera gástrica.** V SIMPAC, v. 2, n. 1, 2010.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas.** Tese de Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SANTIN J.R.; DAUFENBACK M.I.; RODRIGUES S.F. 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. Oct 4;8(10):e76894, 2013.

SILVA, K. L. & FILHO, V. C. **Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico.** Quim. Nova, Vol. 25, No. 3, 449-454, 2002.

SILVERTHORN, D. **Fisiologia Humana – Uma Abordagem Integrada.** 2ª ed. Manole, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, p. 232 - 235, 263 - 288, 289 – 319, 2001.

SOUSA E.; ZANATTA L.; SEIFRIZ I. et al. **Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves.** J. Nat. Prod., 2004, 67 (5), pp 829–832.

SOUZA J. T. **Ecofarmacovigilância e remediação ambiental: uso de nanopartículas para redução da ecotoxicidade de fármacos psicoativos presentes em ecossistemas aquáticos.** Universidade de Brasília – DF, 2015.

SUCHARA E. A. **Desenvolvimento De Metodologias Analíticas Para Determinação De Fármacos Em Fluidos Biológicos E Amostras Ambientais Por Cromatografia Líquida E Gasosa.** Tese De Doutorado, Programa De Pós-Graduação Em Química, Departamento De Química Da Universidade Federal De Santa Catarina. 2007.

SWARNAKAR S.; GANGULY K.; KUNDU P. et al. **Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer.** J. Biol. Chem., 280(10):9409-9415, 2005.

SZABO, S.; VINCZE, A.; **Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies.** J. of Physiol., 94: 77-81, 2000.

SZELENYI I.; THIEMER K. **Distention Ulcer As A Model for Testing of Drugs for Ulcerogenic Side-Effects.** Arch. Toxicol., 41: 99-105, 1978.

TAKAGI K.; OKABE S.; SAZIKI R. **A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing.** Jap. J. Pharmacol., 19: 418–426, 1969.

TAKASHIMA K.; FUJITA A.; TAKEUCHI K. **Aggravation of ischemia/reperfusion-induced gastric lesions in streptozotocin-diabetic rats.** Life Sci., 67: 1707-1718, 2000.

TAKEUCHI K.; TAKEHARA K.; TAJIMA K. et al. **Impaired healing of gastric lesions in streptozotocin-induced diabetic rats: impaired effect of basic fibroblast growth factor.** J. Pharmacol. Exp. Ther., 281: 200-207, 1997.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica.** Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/4.

TOMA W.; GUIMARÃES L.L.; BRITO A.R.M.; et al. **Safflower oil: an integrated assessment of phytochemistry, antiulcerogenic activity, and rodent and environmental toxicity.** Rev.Bras. Farmacogn, 2014.

TOMA W., TRIGO J.R.; BENSUASKI A.C.; et al. **Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from Senecio**

brasiliensis in acute and chronic induced gastric ulcers. Can J Physiol Pharmacol. 2004 May;82(5):319-25.

UEDA, S. et al. **Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats.** Scand. J. Gastroenterol., 162: 55-58, 1989.

VETHAAK, A.D., RIJS, G.B.J., SCHRAP, S.M. et al. (2002) **Estrogens and xenoestrogens in the aquatic environment of the Netherlands, Occurrence, potency and biological effects.** RIZA/RIKZ-report no. 20002.001, 266 p.

VILEGAS W, SANOMMIYA M, RASTRELLI L, et al. 1999. **Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of Maytenus aquifolium leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion.** J Agr Food Chem 47: 403-406.

WADA K., KAMISAKI Y., NAKAMOTO K., et al. **Effect of cystathionine as a scavenger of superoxide generated from human leukocytes or derived from xanthine oxidase in vitro.** European Journal of Pharmacology Volume 296, Issue 3, 5 February 1996, Pages 335–340.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology.** Taylor & Francis, London, UK, 321p, 1996.

WINTERBOURN, C. C.; HAWKINS, R. E.; BRIAN, M.; CARRELL, R. W. **The estimation of red cell superoxide dismutase activity.** J Lab Clin Med. 1975;85(2):337-41.

YAN L.; ZHANG J.D.; WANG B.; et al. **Quercetin Inhibits Left Ventricular Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats and Inhibits Angiotensin II-Induced H9C2 Cells Hypertrophy by Enhancing PPAR-c Expression and Suppressing AP-1 Activity.** Plos One. September, vol. 8, 2013.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; et al. **Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats.** *Gut*, 34 (6), 732-737, 1993.

ANEXO I – DADOS BRUTOS DO ENSAIO AGUDO DA *B. FORFICATA*.

Title: TBaA
File: TBaA Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	8	1048.0556	131.0069	2.5042
within (Error)	27	1412.5000	52.3148	
Total	35	2460.5556		

(p-value = 0.0354)

Critical F = 3.2558 (alpha = 0.01, df = 8,27)
= 2.3053 (alpha = 0.05, df = 8,27)

Since $F > \text{Critical } F$ REJECT H_0 : All equal (alpha = 0.05)

Title: TBaA
File: TBaA Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	80.5000	80.5000		
2	1.56	83.7500	83.7500	-0.6355	
3	3.125	86.7500	86.7500	-1.2220	
4	6.25	86.7500	86.7500	-1.2220	
5	12.5	86.2500	86.2500	-1.1243	
6	25	89.0000	89.0000	-1.6620	
7	50	91.5000	91.5000	-2.1508	
8	100	85.2500	85.2500	-0.9287	
9	200	71.7500	71.7500	1.7108	

Dunnett critical value = 2.5300 (1 Tailed, alpha = 0.05, df [used] = 8,24)
(Actual df = 8,27)

Title: TBaA
File: TBaA Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	80.5000	80.5000		
2	1.56	83.7500	83.7500	-0.6355	
3	3.125	86.7500	86.7500	-1.2220	
4	6.25	86.7500	86.7500	-1.2220	
5	12.5	86.2500	86.2500	-1.1243	
6	25	89.0000	89.0000	-1.6620	
7	50	91.5000	91.5000	-2.1508	
8	100	85.2500	85.2500	-0.9287	
9	200	71.7500	71.7500	1.7108	

Dunnett critical value = 2.5300 (1 Tailed, alpha = 0.05, df [used] = 8,24)
(Actual df = 8,27)

Title: TBaA
File: TBaA Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	1.56	4	12.9395	16.1	-3.2500
3	3.125	4	12.9395	16.1	-6.2500
4	6.25	4	12.9395	16.1	-6.2500
5	12.5	4	12.9395	16.1	-5.7500
6	25	4	12.9395	16.1	-8.5000
7	50	4	12.9395	16.1	-11.0000
8	100	4	12.9395	16.1	-4.7500
9	200	4	12.9395	16.1	8.7500

Title: TBaA
 File: TBaA Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-Square Test for Normality

Actual and Expected Frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	2.4120	8.7120	13.7520	8.7120	2.4120
OBSERVED	0	12	12	12	0

Chi-Square = 7.5291 (p-value = 0.1104)

Critical Chi-Square = 13.277 (alpha = 0.01, df = 4)
 = 9.488 (alpha = 0.05, df = 4)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: TBaA
 File: TBaA Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's Test for Homogeneity of Variance

G statistic = 0.2639

Critical value = 0.4810 (alpha = 0.01, df = 9, 3)
 = 0.4027 (alpha = 0.05, df = 9, 3)

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

NOTE: Cochran's Test is most powerful for detecting one large deviant variance.

ANEXO II – DADOS BRUTOS DO ENSAIO CRÔNICO DA *B. FORFICATA*.

Title: teste barbara c1
File: TbaC1 Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	22503.8333	4500.7667	48.7008
within (Error)	18	1663.5000	92.4167	
Total	23	24167.3333		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 4.2479 (alpha = 0.01, df = 5,18)
= 2.7729 (alpha = 0.05, df = 5,18)

Since $F > \text{Critical } F$ REJECT H_0 : All equal (alpha = 0.05)

Title: teste barbara c1
File: TbaC1 Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle	78.7500	78.7500		
2	12.5	63.5000	63.5000	2.2434	
3	25	55.2500	55.2500	3.4571	*
4	50	26.5000	26.5000	7.6865	*
5	100	0.0000	0.0000	11.5848	*
6	200	0.0000	0.0000	11.5848	*

Dunnnett critical value = 2.4100 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 5,18)

Title: teste barbara c1
File: TbaC1 Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	12.5	4	16.3824	20.8	15.2500
3	25	4	16.3824	20.8	23.5000
4	50	4	16.3824	20.8	52.2500
5	100	4	16.3824	20.8	78.7500
6	200	4	16.3824	20.8	78.7500

Title: teste barbara c1
 File: Tbac1 Transform: NO TRANSFORMATION

 Chi-Square Test for Normality

Actual and Expected Frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.6080	5.8080	9.1680	5.8080	1.6080
OBSERVED	0	4	14	6	0

 Chi-Square = 6.3319 (p-value = 0.1757)
 Critical Chi-Square = 13.277 (alpha = 0.01 , df = 4)
 = 9.488 (alpha = 0.05 , df = 4)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: teste barbara c1
 File: Tbac1 Transform: NO TRANSFORMATION

 Cochran's Test for Homogeneity of Variance

G statistic = 0.6835
 Critical value = 0.6258 (alpha = 0.01, df = 6, 3)
 = 0.5321 (alpha = 0.05, df = 6, 3)

Data FAIL homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.

NOTE: Cochran's Test is most powerful for detecting one large deviant variance.

ANEXO III – CÁLCULO DA CE50 DO ENSAIO CRÔNICO DA *B. FORFICATA*.

DATE: 22 - 12 TEST NUMBER: 1 DURATION: 24 h
 TOXICANT : Pata Uaca
 SPECIES: *Lytechinus variegatus*

RAW DATA:	Concentration (mg.L)	Number Exposed	Mortalities
	.00	400	85
	12.50	400	146
	25.00	400	179
	50.00	400	294
	100.00	400	400
	200.00	400	400

SPEARMAN-KARBER TRIM: 19.37%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:	EC50:	35.24
95% LOWER CONFIDENCE:		32.79
95% UPPER CONFIDENCE:		37.86

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.
 ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.

ANEXO IV – DADOS BRUTOS DO ENSAIO CRÔNICO DO OMEPRAZOL.

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-Square Test for Normality

Actual and Expected Frequencies					
INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.3400	4.8400	7.6400	4.8400	1.3400
OBSERVED	0	8	6	6	0

Chi-Square = 5.3732 (p-value = 0.2511)

Critical Chi-Square = 13.277 (alpha = 0.01 , df = 4)
= 9.488 (alpha = 0.05 , df = 4)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - wilk's Test for Normality

D = 1325.5000
W = 0.9209

Critical w = 0.8680 (alpha = 0.01 , N = 20)
w = 0.9050 (alpha = 0.05 , N = 20)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's Test for Homogeneity of Variance

calculated H statistic (max Var/min Var) = 5.5393

Table H statistic = 151.00 (alpha = 0.01)
50.70 (alpha = 0.05)

Used df = 3
Based on R (# groups) = 5

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

calculated B1 statistic = 3.0358 (p-value = 0.5519)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. continue analysis.

Critical B = 13.2767 (alpha = 0.01, df = 4)
= 9.4877 (alpha = 0.05, df = 4)

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	4	19725.7000	4931.4250	55.8064
within (Error)	15	1325.5000	88.3667	
Total	19	21051.2000		

(p-value = 0.0000)

critical F = 4.8932 (alpha = 0.01, df = 4,15)
= 3.0556 (alpha = 0.05, df = 4,15)

Since $F > \text{Critical F}$ REJECT H_0 : All equal (alpha = 0.05)

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle	87.5000	87.5000		
2	0.195	81.2500	81.2500	0.9403	
3	0.39	80.7500	80.7500	1.0155	
4	0.78	40.5000	40.5000	7.0708	*
5	1.56	6.0000	6.0000	12.2611	*

Dunnett critical value = 2.3600 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 4,15)

Title: barbara
File: BOMEPRAZ. Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.195	4	15.6870	17.9	6.2500
3	0.39	4	15.6870	17.9	6.7500
4	0.78	4	15.6870	17.9	47.0000
5	1.56	4	15.6870	17.9	81.5000

ANEXO V – DADOS BRUTOS DO ENSAIO CRÔNICO DO LANSOPRAZOL.

Title: Lanzoprazol
File: LANZOPRA. Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-Square Test for Normality

Actual and Expected Frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.3400	4.8400	7.6400	4.8400	1.3400
OBSERVED	0	6	8	6	0

Chi-Square = 3.2530 (p-value = 0.5164)

Critical Chi-Square = 13.277 (alpha = 0.01, df = 4)
= 9.488 (alpha = 0.05, df = 4)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: Lanzoprazol
File: LANZOPRA. Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

calculated B1 statistic = 0.4322 (p-value = 0.9798)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

Critical B = 13.2767 (alpha = 0.01, df = 4)
= 9.4877 (alpha = 0.05, df = 4)

Title: Lanzoprazol
File: LANZOPRA. Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	4	28075.3000	7018.8250	256.0058
within (Error)	15	411.2500	27.4167	
Total	19	28486.5500		

(p-value = 0.0000)

critical F = 4.8932 (alpha = 0.01, df = 4,15)
= 3.0556 (alpha = 0.05, df = 4,15)

Since $F > \text{Critical } F$ REJECT H_0 : All equal (alpha = 0.05)

Title: Lanzoprazol
File: LANZOPRA.

Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	87.0000	87.0000		
2	0.195	84.2500	84.2500	0.7427	
3	0.39	28.2500	28.2500	15.8678	*
4	0.78	3.7500	3.7500	22.4849	*
5	1.56	2.5000	2.5000	22.8226	*

Dunnett critical value = 2.3600 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 4,15)

Title: Lanzoprazol
File: LANZOPRA.

Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.195	4	8.7378	10.0	2.7500
3	0.39	4	8.7378	10.0	58.7500
4	0.78	4	8.7378	10.0	83.2500
5	1.56	4	8.7378	10.0	84.5000

ANEXO VI – CÁLCULO DA CI50 DA *B. FORFICATA*

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate *** PATA DE VACA

Toxicant/Effluent:

Test Start Date: Test Ending Date:

Test Species:

Test Duration:

DATA FILE:

Conc. ID	Number of Replicates	Concentration	Response Means	Response Dev.	Std. Response	Pooled Means
1	4	0.000	81.500	1.915	81.500	
2	4	12.500	63.500	8.583	63.500	
3	4	25.000	55.250	9.912	55.250	
4	4	50.000	35.250	8.180	35.250	
5	4	100.000	0.000	0.000	0.000	
6	4	200.000	0.000	0.000	0.000	

The Linear Interpolation Estimate: 43.1250 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 43.9246 Standard Deviation: 3.7402

Original Confidence Limits: Lower: 38.2022 Upper: 50.6173

Expanded Confidence Limits: Lower: 35.2486 Upper: 55.1127

Resampling time in Seconds: 0.00 Random Seed: -86657165

ANEXO VII - CÁLCULO DA CI50 DO OMEPRAZOL

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate *** OMEPRAZOL

Toxicant/Effluent:

Test Start Date: Test Ending Date:

Test Species:

Test Duration:

DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Means	Response Dev.	Std. Response	Pooled Means
1	4	0.000	87.500	5.447	87.500
2	4	0.195	81.250	5.560	81.250
3	4	0.390	80.750	9.394	80.750
4	4	0.780	40.500	12.819	40.500
5	4	1.560	6.000	11.343	6.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.7485 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.7746 Standard Deviation: 0.0644

Original Confidence Limits: Lower: 0.6856 Upper: 0.9006

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.6479 Upper: 0.9919

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -505869864

ANEXO VIII - CÁLCULO DA CI50 DO LANSOPRAZOL

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate *** LANZOPRAZOL

Toxicant/Effluent:

Test Start Date: Test Ending Date:

Test Species:

Test Duration:

DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Means	Response Dev.	Std. Response	Pooled Means
1	4	0.000	89.500	5.972	89.500
2	4	0.195	84.250	4.787	84.250
3	4	0.390	28.250	5.737	28.250
4	4	0.780	3.750	6.185	3.750
5	4	1.560	2.500	4.359	2.500

The Linear Interpolation Estimate: 0.3325 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.3319 Standard Deviation: 0.0076

Original Confidence Limits: Lower: 0.3187 Upper: 0.3472

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.3104 Upper: 0.3560

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -480025770