

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

GIOVANNA CHRISTINA COSTA DA SILVA MAZZEO

AVALIAÇÃO QUÍMICA, FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO DE
PFAFFIA GLOMERATA

SANTOS / SP

2015

GIOVANNA CHRISTINA COSTA DA SILVA MAZZEO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA, FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO DE
*PFAFFIA GLOMERATA***

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

SANTOS/SP

2015

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

MAZZEO, Giovanna Christina Costa da Silva

Avaliação química, farmacológica e toxicológica do extrato de *Pfaffia glomerata*/ Giovanna Christina Costa da Silva Mazzeo, Santos, 2015.

n° de pag. 69

Orientador: Prof. Dr. Walber Toma.

Coorientador: Prof. Fabiano Pereira do Amaral.

,

Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação). Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos (ECOMAR), Santos, São Paulo, 2015

1. Ginseng; 2. *Pfaffia glomerata*; 3. Atividade Antiulcerogênica; 4. Avaliação Ecotoxicológica; 5. Avaliação Fitoquímica. I. Toma, Walber, orient. II. Amaral, Fabiano Pereira, coorient. III. Avaliação química, farmacológica e toxicológica do extrato de folhas de *Pfaffia glomerata*.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais André e Carla, à minha avó Miriam e à minha tia Regina

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Walber Toma, pela orientação, confiança, paciência e em especial por toda a compreensão dedicada a mim durante todo o curso.

Ao meu coorientador, Prof. Fabiano Pereira do Amaral, por todo o auxílio e apoio no decorrer dos experimentos.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ecologia da Universidade Santa Cecília, em especial o Prof. Dr. Fábio Giordano, Profa. Dra. Mariana Clauzet, Profa. Dra. Milena Ramires de Souza e Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, por grande participação na minha formação como mestre e crescimento pessoal.

A todo o Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecilia, sempre muito solícitos em todas as etapas do meu aprendizado para a realização dos ensaios. Em especial os Prof. Me. Fernando Sanzi Cortez e Prof. Me. Fábio Hermes Pusceddu, que muito contribuíram à todo o conhecimento referente a área e experiência que tenho hoje.

À Sandra H. A. de Araújo e Imaculada Scorza, da Secretaria da Pós-Graduação *stricto sensu* por estarem sempre presentes e dispostas a ajudar no que for preciso.

Agradeço de igual forma aos meus colegas de curso, por todas as experiências que passamos juntos e por todo o incentivo e auxílio que dedicávamos uns aos outros durante o decorrer desses 2 anos.

RESUMO

Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), conhecida popularmente como "Ginseng Brasileiro" tem suas raízes e folhas amplamente utilizadas pela medicina tradicional para tratar distúrbios gástricos. O extrato etanólico 70% (EtOH 70) obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* quando administrado na dose de 500 mg.Kg⁻¹ apresentou significativa atividade antiulcerogênica (**p<0.01) no modelo de úlcera gástrica induzida pela administração de HCl-Etanol em camundongos e no modelo de indução de úlcera gástrica pela administração de etanol absoluto em ratos (***p<0.001). Amostras de conteúdo gástrico sob ação de EtOH 70 de *Pfaffia glomerata* promovem significativo aumento dos níveis de muco gástrico (p<0.0001) demonstrando mecanismo antiulcerogênico citoprotetor. Além disso, os dados apontam atividade antioxidante através do método de seqüestro de radicais livres utilizando protocolo DPPH e a presença de compostos fenólicos através do método de Folin-Ciocalteu. A realização do ensaio de toxicidade aguda em roedores mediante overdose (5 g.Kg⁻¹, administrado pela via oral) de EtOH 70 de *Pfaffia glomerata* não demonstra respostas de intoxicação. Além disso, após ensaio realizado com organismos vivos de água doce *Daphnia similis* demonstram CE50 de 180 mg.L⁻¹, enquadrando a amostra como não tóxica ao ambiente com base na diretiva 93/67/EEC da União Européia. Já em ensaio agudo realizado com *Lytechinus variegatus* (Ouriço-do-mar) demonstra CE50=93,75 mg.L⁻¹ (Nocivo ao meio ambiente), ao passo que em ensaio crônico foi obtida CE50=9,63 mg.L⁻¹ (Tóxico ao meio ambiente). Pode-se concluir que EtOH 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* apresenta atividade antiulcerogênica com proposta citoprotetora e antioxidante. As atividades são atribuídas à β-eclisona e ao Kaempferol. Foi observada ausência de toxicidade aguda em roedores e diferentes níveis de classificação ecotoxicológica.

Palavras-chave: Ginseg. *Pfaffia glomerata*. Atividade antiulcerogênica. Avaliação ecotoxicológica. Avaliação fitoquímica.

ABSTRACT

Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), popularly known as "Brazilian Ginseng" has its roots and leaves widely used in traditional medicine to treat gastric disorders. The 70% ethanol extract (EtOH 70) obtained from the *Pfaffia* leaves glomerata when administered at a dose of 500 mg.Kg⁻¹ showed significant anti-ulcer activity (** p <0.01) in gastric ulcer model induced by administration of HCl- Ethanol in mice and gastric ulcer model induced by administration of absolute ethanol to rats (***) p <0.001). Gastric content samples under the action of EtOH 70 glomerata *Pfaffia* promote significant increase in gastric mucus levels (p <0.0001), demonstrating antiulcerogenic cytoprotective mechanism. Moreover, the data show antioxidant activity through sequestration of free radicals method using DPPH protocol and the presence of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method. The completion of the acute toxicity test in rodents by overdose (5 g.Kg⁻¹, administered orally) EtOH 70 *P. glomerata* shows no poisoning of answers. Also, after trial with live fresh water organisms *Daphnia similis* show EC50 180 mg L⁻¹, framing the sample as non-toxic to the environment based on Directive 93/67 / EEC of the European Union. Already in acute trial with variegatus *Lytechinus* (sea urchin) shows EC50 = 93.75 mg L⁻¹ (harmful to the environment), whereas in chronic assay was obtained EC50 = 9.63 mg.L⁻¹ (toxic to the environment). It can be concluded that 70% EtOH obtained from the leaves of *P. glomerata* presents antiulcerogenic activity with cytoprotective and antioxidant proposal. Activities are assigned to the β -ecdysone and Kaempferol. It was observed absence of acute toxicity in rodents and different levels of ecotoxicological classification.

Keywords: Ginseg. *Pfaffia glomerata*. Antiulcerogenic activity. Ecotoxicological assessment. Phytochemical evaluation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Coordenadas geográficas do local da coleta	18
FIGURA 2	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pedersen e excicata	19
FIGURA 3	Partes aéreas de <i>Pfaffia glomerata</i> na estufa	19
FIGURA 4	Processo extrativo	19
FIGURA 5	Soluções de NaCl e lansoprazol e concentrações do extrato nas dosagens de (I) 125, (II) 250, (III) 500 e (IV) 1000 mg.kg ⁻¹	21
FIGURA 6	Indução de úlcera com HCl/ etanol nos camundongos	21
FIGURA 7	Pesagem dos camundongos	23
FIGURA 8	Diluições do extrato em água de diluição e soluções controle nas concentrações de 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039 g.L ⁻¹ respectivamente	26
FIGURA 9	Estímulo para identificação e liberação de espermatozoides de <i>Lytechinus variegatus</i>	27
FIGURA 10	Fêmea de <i>Lytechinus variegatus</i> liberando os óvulos	28
FIGURA 11	Coleta de espermatozoides de <i>Lytechinus variegatus</i>	28
FIGURA 12	Espermatozoides de <i>Lytechinus variegatus</i> acondicionados em um bquer envolto com gelo	29
FIGURA 13	Ovos de <i>Lytechinus variegatus</i> (400X)	30
	Os resultados apresentados demonstram o índice de Lesões Ullcerogênicas (ILU – mm ²) expressos na forma de média +/- dp sendo **p<0.01 conforme Análise de Variância (ANOVA) com teste posterior de Dunnett	35
FIGURA 15	Mucosa gástrica de Camundongos Swiss submetidos á Úlcera Gástrica após administração de HCl/ Etanol	35
FIGURA 16	Efeitos de EtOH 70% a partir de folhas de <i>P. glomerata</i> e grupos controle quando submetidos à indução da úlcera gástrica por etanol absoluto em roedores. Os dados são expressos em média ± S.D. ANOVA seguido pelo teste Dunnet's com *** p <0,001	36
FIGURA 17	Resultados da adição de solução salina 0,9% Carbenoxolona e EtOH 70% das folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> na mucosa gástrica em roedores. Os dados são expressos em média ± S.D. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. *** p <0,001 em comparação com o grupo controle de solução salina a 0,9%	37
FIGURA 18	Perfil de HPLC do extrato das folhas de <i>Pfaffia glomerata</i> registado a 250 nm. Espectro de absorção de UV para os picos 1 e 15 (identificado como β-ecdisona e kaempferol, respectivamente) é mostrado em detalhes (RT 2,5933 e 16,3833 min).	40
FIGURA 19	Análise de TI-MS ² para o composto identificado como Kaempferol (MW 286) no modo de íon negativo [M-H] – (Felipe et al, 2014).	41
FIGURA 20	MS ² e MS ³ análise, respectivamente, para o composto identificado como β-ecdisona em modo de íon negativo. β-ecdisona exibiu íons de [M + HCOO] - para m / z 525 no modo negativo, devido à adição de ácido fórmico a 0,1% na	42

fase móvel (Felipe et al, 2014).

FIGURA 21 Análise de MS² para o composto identificado como o ácido glucônico (MW 196) [M-H] – (Felipe et al, 2014). 42

FIGURA 22 EtOH 70% a partir de folhas de *P. glomerata* (esquerda) e ácido gálico com controle positivo (direita) separados por uma placa de TLC e revelados com DPPH. 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Condições para realização dos ensaios de toxicidade com <i>L. variegatus</i> (Efeito Agudo/Fertilização)	31
TABELA 2	Condições para realização dos ensaios de toxicidade com <i>L. variegatus</i> (Efeito Crônico / Embriolarval)	32
TABELA 3	Substâncias identificadas no EtOH 70% obtidos a partir das folhas de <i>P. glomerata</i> em LC-MS / MS no modo negativo.	43
TABELA 4	Determinação de fenóis totais por Folin-Ciocalteu Método em EtOH 70% a partir de folhas de <i>P. glomerata</i>	44
TABELA 5	Classificação do risco ecotoxicológico após exposição aguda de <i>Daphnia similis</i> ao extrato obtido a partir da tintura de <i>Pfaffia glomerata</i> baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo.	46
TABELA 6	Classificação do risco ecotoxicológico após exposição aguda de <i>Lytechinus variegatus</i> ao extrato obtido a partir do extrato de <i>Pfaffia glomerata</i> baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo.	47
TABELA 7	Classificação do risco ecotoxicológico após exposição crônica de <i>Lytechinus variegatus</i> ao extrato obtido a partir do extrato de <i>Pfaffia glomerata</i> baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENO	Concentração de Efeito não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CE50	Concentração Efetiva a 50%
CI50	Concentração de Inibição a 50%
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
cm	Centímetro
EAG	Equivalente de ácido gálico
ETA	Estação de Abastecimento de Água
ETE	Estações de Tratamento de Esgoto
EtOH	Extrato hidroalcoólico 70%
FT	Fenóis totais
G	Gramma
HCl/ etoH	Ácido clorídrico/ etanol
CLAE – MS/MS	Cromatografia Líquida se Alta Eficiência
HPTLC	Cromatografia em Camada Delgada de Alta resolução (High performance thin layer chromatography)
i.d.	Intraduodenal
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
Rf	Fator de Retenção
TFA	Ácido trifluoracético
UV	Ultravioleta
v	Volume
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Coleta, Identificação e Processo de extração.....	18
3.2. Avaliação Farmacológica	20
3.2.1. Úlcera gástrica induzida após administração de HCl/etoH	20
3.2.2. Úlcera gástrica induzida pela administração de etanol absoluto.....	21
3.2.3. Determinação de muco no conteúdo gástrico	22
3.3. Avaliação Toxicológica... ..	22
3.4. Análise Fitoquímica.....	23
3.4.1. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Resolução (HPTLC).....	23
3.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD).....	23
3.4.3. Espectrometria de Massas (LC-IT-MS/MS).....	24
3.4.4. Análise qualitativa da atividade antioxidante <i>in vitro</i> (Método DPPH).....	24
3.4.5. Determinação de fenóis totais.....	25
3.5. Avaliação Ecotoxicológica	25
3.5.1. Ensaio agudo com <i>Daphnia similis</i>	25
3.5.2. Ensaio agudo com <i>Lytechinus variegatus</i>	26
3.5.3. Ensaio crônico com <i>Lytechinus variegatus</i>	29
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Avaliação Farmacológica	34
5.2. Avaliação Toxicológica.....	37
5.3. Avaliação Fitoquímica	38
5.4. Avaliação Ecotoxicológica.....	45
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ANEXO.....	54
------------	----

1 - INTRODUÇÃO

As plantas e os produtos naturais delas derivados são utilizados ao longo da História e no mundo com variados fins. A terapia com base em plantas desempenhou um papel fundamental na sobrevivência de várias civilizações. Em algumas, como é o caso da medicina chinesa ou da tradicional indiana ayurvédica, o seu papel primordial como agente curativo permaneceu até aos nossos dias. Já no ocidente, cerca de 25% dos produtos farmacêuticos contêm na sua composição substâncias provenientes ou derivadas de moléculas vegetais (PINTÃO *et al.* 2008).

Tradicionalmente empregadas por populações de todos os continentes, as plantas são muito utilizadas no controle de diversas doenças e pragas. Segundo Guerra *et al.*, 2003, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento da indústria farmacêutica brasileira, registrado em 1996, advêm de medicamentos derivados de plantas. De acordo com estudo realizado por Soares (2007), o qual avaliou a viabilidade econômica da produção comercial de *Pfaffia glomerata*, os resultados apresentaram condições favoráveis à planta, sendo, portanto, viável economicamente. Verificou-se que o cultivo comercial da *Pfaffia* consiste em uma importante ferramenta para viabilizar rendas aos produtores, sendo viável principalmente para a agricultura familiar e/ou comunitária e, também, como forma de eliminar o extrativismo predatório da espécie.

O potencial das plantas como fonte de novas drogas ainda oferece grande campo para a pesquisa científica. Apesar do grande número de plantas conhecidas, somente pequena porcentagem delas já foi fitoquimicamente investigada e apenas uma fração avaliada para determinar seu potencial farmacológico (VOMERO, 2014).

Tradicionalmente, para o estudo de produtos naturais de origem vegetal, utiliza-se técnicas espectrométricas e espectroscópicas de identificação de substâncias orgânicas, como a espectrometria de massas (MS), a ressonância magnética nuclear (RMN), Ultravioleta (UV) e o infravermelho (IV) (ROBARDS, 2003; SIMÕES, 2003).

A utilização de determinadas técnicas cromatográficas como, HPLC e a espectrometria de massas em tandem (MS/MSN), por sua vez, permitem uma rápida tipificação da composição da matriz vegetal estudada através dos tempos de retenção e/ou propriedades espectroscópicas e espectrométricas, todas associados às características intrínsecas de cada substância, como polaridade, massa

molecular, entre outros (SNYDER, 1997; ARDREY, 2003).

Huck *et al.* (2002) propuseram a avaliação de uma nova fase-reversa hidrofílica em análises rápidas para a determinação de inúmeros flavonóides encontrados nos mais diversos extratos de plantas, usando as técnicas de CLAE/UV/DAD e LC-IT-MS/MS.

Geralmente essas técnicas são associadas a uma etapa prévia de *clean-up*, que é fundamental para eliminar compostos indesejáveis e que fazem parte da constituição da matriz, principalmente aqueles presentes em extratos vegetais e matrizes biológicas, como por exemplo clorofila e proteínas, as quais podem interferir drasticamente no método analítico a ser executado (WELLUM & KIRBY, 1981; RODRIGUES, 2007).

Inúmeros trabalhos descritos na literatura mostram que a espectrometria de massas (MS), na maioria das vezes acoplada a um sistema HPLC, tem se destacado como uma poderosa ferramenta em estudos de biodiversidade (ZEEB, 2000).

Dentre as mais diversas espécies presentes em nosso país, dá-se destaque no presente trabalho à planta *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Da família (Amaranthaceae), pertence a uma das várias espécies do gênero *Pfaffia*, sendo utilizada em substituição ao Ginseng. Popularmente conhecida como “Paratudo” e “Ginseng Brasileiro”, erva de porte alto, encontrada em todo território brasileiro, Guiana, Bolívia, Equador, Panamá e Argentina (SMITH & DOWNS, 1972; FLORES, 2006). A família Amaranthaceae é formada atualmente por 170 gêneros com cerca de 2000 espécies, ocorrendo nos trópicos, subtrópicos e regiões temperadas da América e da África. No Brasil ocorrem vinte gêneros e aproximadamente 100 espécies da família (SOUZA e LORENZI, 2005).

Pfaffia é uma espécie seletiva higrófita e heliófita bastante rara, ocorre principalmente à beira de rios e nas orlas das matas de galerias, onde pode receber bastante luz, cujo principal habitat são as matas ciliares da região centro oeste do Brasil e bacia do rio Paraná (SMITH & DOWNS, 1972; FLORES, 2006). Ela apresenta melhor desenvolvimento em regiões com temperaturas mais elevadas, mostrando-se sensível às geadas (MAGALHÃES, 2000).

Essa espécie, cujas raízes são utilizadas há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, obteve nos últimos anos diversas propriedades medicinais comprovadas cientificamente. As raízes de espécies do gênero *Pfaffia*

são usadas na medicina popular brasileira, especialmente como tônico, afrodisíaco e no controle do diabetes. Com base em dados etnobotânicos, as raízes e folhas da planta são utilizadas ancestralmente como estimulantes gerais, tranqüilizantes, anti-reumáticas, antidiarréicas, antiinflamatórias, antidiabéticas, febrífugas, cicatrizantes internas e externas, anti-hemorroidicas, melhoria da visão e da memória e para o tratamento de distúrbios gástricos, artrite, artrose, anemia, astenia, dores e disfunção erétil. Indicações terapêuticas fizeram com que *Pfaffia glomerata* esteja entre os maiores volumes de venda na indústria nacional de fitoterápicos (NISHMOTO et al., 1984; SILVA JÚNIOR e OSAIDA, 2005). Atualmente, medicamentos fitoterápicos vem sendo produzidos à base de extratos secos de raízes de *Pfaffia glomerata*, os quais são comercializados na forma de cápsulas (BRASIL, 2004).

No entanto, apesar da ampla utilização terapêutica de produtos obtidos a partir das raízes de *Pfaffia glomerata* ainda não existem trabalhos que relacionem a provável atividade farmacológica para o tratamento das úlceras gástricas bem como não existem dados relacionados à atividade toxicológica e ecotoxicológica das folhas. Foi realizado processo de extração a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* para posterior avaliação de provável atividade antiulcerogênica.

As úlceras pépticas resultam de diferentes mecanismos patogênicos e, independente de sua etiologia, são provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, óxido nítrico e prostaglandinas) e lesivos (pepsina, ácido clorídrico, espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre outros). Essa doença também pode ser desencadeada e/ou agravada por fatores exógenos predisponentes relacionados às condições de vida, como: estresse, tabagismo, uso de bebidas alcoólicas e de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES), ingestão de determinados alimentos, a presença do agente infeccioso *Helicobacter pylori* e predisposição genética (POSSENTI, 2011). Estes agentes são implicados na patogênese das lesões gástricas, por promoverem aumento na secreção do ácido gástrico e pepsina, diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, por suprimirem a produção endógena de Prostaglandinas, inibirem a proliferação celular e o crescimento da mucosa, e promoverem a alteração da motilidade gástrica (WALLACE, 2001; BRUNTON, 2006).

Nas últimas décadas, a identificação do *Helicobacter pylori* e a associação da úlcera com a utilização crônica de drogas anti-inflamatórias, contribuíram para melhor

compreensão dos eventos associados à ulcerogênese.

Diversos são os tratamentos farmacológicos para acometimento da úlcera gástrica. Dentre as classes terapêuticas encontram-se os fármacos neutralizadores do ácido gástrico (ex: hidróxido de alumínio e magnésio), os antagonistas de receptores H_2 , ex: ranitidina, famotidina, nizatidina, e os inibidores da bomba protônica, ex: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol. No entanto, apesar desta ampla gama terapêutica para a úlcera gástrica a recidiva consiste como um dos maiores problemas relativos à farmacoterapia desta patologia (SZABO & VINCZE, 2000; VOMERO, 2014).

Outra atividade farmacológica bastante encontradas em estudos com as raízes de *P. glomerata*, é o potencial antioxidante, que consiste na capacidade de determinadas substâncias, como compostos fenólicos, que em baixas concentrações, impedir, retardar e prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável.

Diversas são as técnicas utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre elas, destaca-se o método de seqüestro de radicais livres, como 2,2-dife-nil-1picrilhidrazila (DPPH). Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (NEVES, 2009)

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímicas/ fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos. Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT)

e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno. Os compostos fenólicos também são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (NEVES, 2009)

Mediante a grande utilização do ginseng por parte da população, o desenvolvimento da indústria farmacêutica, que hoje disponibiliza para o mercado milhões de substâncias com propósito terapêutico, acarretou colateralmente um grave problema ambiental que vem crescendo em atenção e preocupação nas agências controladoras do ambiente em várias nações (GARRIC, 2003). O aporte de substâncias farmacologicamente ativas no ambiente advém do uso intenso e extensivo no tratamento de doenças em seres humanos e animais sendo excretadas na forma metabólitos ou não e introduzidas, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais e industriais nos corpos hídricos receptores das águas servidas (PETROVIC, 2005; CHAMPAN, 2006; CALAMARI, 2003).

O monitoramento de substâncias farmacêuticas residuais em matrizes ambientais é abordado em vários trabalhos de pesquisas desde o final da década de 90, tornando-se um tema bastante discutido devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em estações de tratamento de esgoto (ETE's) e abastecimento de água (ETA's), bem como em outras matrizes ambientais tais como solo, sedimento e águas naturais em concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} . A grande preocupação da presença destes fármacos residuais na água são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos (BILA, 1990; PONEZI, 2006).

Segundo Beausse, 1994, a ecotoxicologia vem estudando o comportamento e as transformações de agentes químicos no ambiente, assim como seus efeitos sobre os organismos vivos. Sendo assim para identificar os efeitos dessas substâncias sobre a biota aquática, tem se utilizado nessas últimas décadas, testes de toxicidade aguda e crônica com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo. Estes testes têm permitido estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas e, ainda se avaliar o possível impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos receptores. As principais aplicações para os testes de toxicidade são as avaliações dos riscos potenciais de substâncias químicas ao meio ambiente, o monitoramento da qualidade

das águas superficiais e subterrâneas, a fiscalização de efluentes, a identificação de fontes poluidoras e a investigação de sinergismos e antagonismos de substâncias.

A ecotoxicologia não serve somente para proteger os seres vivos e o ambiente dos efeitos deletérios causados pelas substâncias tóxicas, mas também para facilitar o desenvolvimento de agentes químicos nocivos mais seletivos, tais como drogas clínicas e pesticidas (COSTA, 2008).

A atual legislação brasileira exige que, para o registro de um fitoterápico se faça a padronização dos extratos, procedendo simultaneamente com as análises quali e quantitativa do material vegetal e que seja especificado o teor de uma substância ou de um grupo de substâncias denominadas de marcadores (Anvisa, RDC nº48, 2004). Recentemente, critérios ainda mais rígidos foram estabelecidos pela Anvisa, e estes preconizam a adequação de testes referentes ao controle de qualidade, estando todo o processo de acordo com as normas de Boas Práticas de Laboratório e Boas Práticas de Fabricação e Controle, as quais são muito próximas à NBR 17025 do Inmetro, que recomenda a harmonização de normas e procedimentos. Essa uniformidade surge como um critério importantíssimo, uma vez que ela reforça a necessidade de verificar a autenticidade da amostra, evitando colocar em risco a saúde da população brasileira com medicamentos fitoterápicos de origem duvidosa e cuja dose pode estar longe de ser a terapêutica, mas próxima à dose tóxica (RODRIGUES, 2007)

Tendo em vista a necessidade da busca de novas propostas terapêuticas com baixa probabilidade de efeitos toxicológicos 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 obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* em ensaios fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e ecotoxicológicos poderão servir como base para futuros estudos com o intuito de inserir tal composto como possibilidade de terapia farmacológica a pacientes portadores de úlceras gástricas.

2 - OBJETIVOS

- a) Avaliação da atividade antiulcerogênica de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* em camundongos Swiss, machos;
- b) Avaliação toxicológica do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* em camundongos Swiss, machos;
- c) Avaliação do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* por meio de cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC); avaliação da ação antioxidante com DPPH e avaliação qualitativa de fenóis totais com reagente de Folin-Ciocalteu; espectrometria de massas (CLAE-UV-DAD e LC-IT-MS/MS).
- d) Avaliação ecotoxicológica do Extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* através de ensaios agudos e crônicos com *Daphnia similis* e *Lytechinus variegatus*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta, identificação e processo extrativo

A planta foi coletada na cidade de Santos-SP, Rua Dr. Cunha Moreira – Encruzilhada (Figura 1) e encaminhada ao herbário da Universidade Santa Cecília (HUSC), local em que foi realizada a identificação da espécie pelo Prof. Ms Paulo de Salles Penteado Sampaio do HUSC, e depositada a exsicata sob o número 6131 (Figura 2). As folhas da planta foram secas em estufa a 40°C por 48 h (Figura 3) e posteriormente submetidas a processo de trituração. Em seguida foi realizado o processo de maceração por período de 2h seguido por percolação. Em ambos os métodos de extração foi utilizado como solvente etanol 70% na proporção de 20 g da planta seca para cada 100 mL de solvente. A droga foi mantida em repouso no percolador por 24h (Figura 4) obtendo deste modo a Tintura de *Pfaffia glomerata* ao qual foi submetida à avaliação do perfil fitoquímicos, farmacológicos e ecotoxicológicos (BRASIL, 2011).

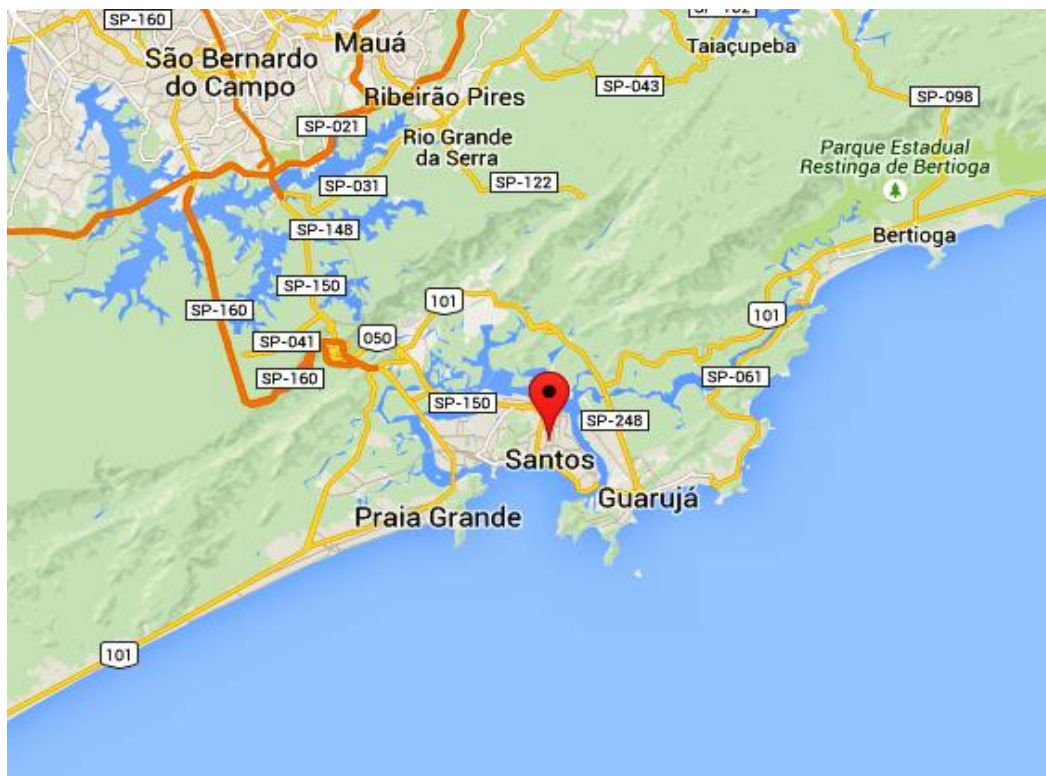


Figura 1: Coordenadas geográficas do local da coleta.



http://www.biodiversidade.rs.gov.br/porta/index.php?acao=especies_ameacadas&id=319&tipo=2. Acesso em 31/10/2012



Excisada parte aérea de *Pfaffia glomerata* HUSC 6131.

Figura 2: *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen e excisada.



Figura 3: Partes aéreas de *P. glomerata* na estufa.



Figura 4: Processo extrativo.

3.2. Avaliação Farmacológica

Para os ensaios farmacológicos e toxicológicos foram utilizados 50 camundongos Swiss albinos machos com peso médio entre 30-45 g. Os mesmos foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus São Paulo e permaneceram aclimatados às condições do biotério da Universidade Santa Cecília sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclo claro-escuro (12 horas) controlados, alimentados com ração Nuvital e água “ad libitum”. Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas que envolvem cuidados com os animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; 1986 e PORTER, 1992). Ao final dos protocolos experimentais os animais foram sacrificados por overdose de Ketamina associada a Xilazina (<http://www.unifesp.br/centros/cedeme/normas.htm> acesso em setembro/2012). Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do núcleo de pesquisas (CEP) da Universidade Santa Cecília (UNISANTA) sob protocolo número 002/2012.

3.2.1. Úlcera gástrica induzida após administração de HCl/etoH

A metodologia utilizada neste experimento foi descrita por Oyagi *et al*, 2010. Após 12 horas de jejum os diferentes grupos de camundongos foram tratados pela via oral com NaCl 0,9% (10 mL.Kg^{-1} , v.o.) (Controle Negativo) (n=5); lansoprazol 30 mg.Kg^{-1} (10 mL.Kg^{-1} , v.o.) (Controle Positivo) (n=5) e extrato obtido a partir da Tintura das folhas de *Pfaffia glomerata* nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg (Figura 5) (10 mL.Kg^{-1} , v.o.) (n=5 por dose de tratamento). Uma hora após a administração dos tratamentos a lesão gástrica foi induzida nos animais pela administração por via oral de ($0,1 \text{ mL.20 g}^{-1}$ de peso Corpóreo) de uma solução de HCl 150 MM em etanol 98% (Figura 6). Após uma hora os animais foram sacrificados e os estômagos retirados, para posterior contagem das lesões de acordo com Szelenyi *et al*. 1978, onde há: lesões nível 1 ($< 1 \text{ mm}$), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas, $\geq 3 \text{ mm}$ de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um Índice de Lesões Ulcerativas (ILU) de acordo com a seguinte equação:

$$ILU = (\Sigma \text{ lesões nível 1}) + (\Sigma \text{ lesões nível 2}) \times 2 + (\Sigma \text{ lesões nível 3}) \times 3$$



Figura 5: Soluções de NaCl, lansoprazol e concentrações do extrato nas dosagens de (I) 125, (II) 250, (III) 500 e (IV) 1000 mg.kg⁻¹.



Figura 6: Indução de úlcera com HCl/etanol nos camundongos.

3.2.2. Úlcera gástrica induzida pela administração de etanol absoluto

Ratos Wistar foram divididos em 5 grupos de tratamentos (n=08) e foram submetidos a jejum de 12 horas com água *Ad Libitum*. Em seguida os animais receberam os tratamentos pela via oral com NaCl 0,9% (10 ml.Kg⁻¹) (Grupo controle negativo); carbenoxolona (100 mg.kg⁻¹) (Grupo controle positivo) e EtOH 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* (62.5, 125, 250, 500 mg/kg). Após 60 minutos todos os animais receberam 1 mL de etanol absoluto pela via oral para a indução das úlceras gástricas. Após 1 hora, os animais foram sacrificados e o estômago retirado para contagem das lesões utilizando o programa AVSoft BioView Spectras[®]

(Morimoto *et al.*, 1991).

3.2.3. Determinação de muco no conteúdo gástrico

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Sun *et al.*, (1991). Após jejum de 24 horas, camundongos Swiss foram submetidos à anestesia, e realizado cirurgia para ligadura do piloro. O extrato de *Pfaffia glomerata* (EtOH 70) (500 mg.Kg⁻¹) (10 mL.kg⁻¹, v.o.) (n=6); carbenoxolona 100 mg.kg⁻¹ (10 mL.kg⁻¹, v.o.) (n=6) (Grupo controle positivo) e NaCl 0.9% (10 mL.kg⁻¹,v.o.) (controle negativo) (n=6) foram então administrados pela via intraduodenal (i.d.). Após 4 horas os animais foram sacrificados, os estômagos removidos e o conteúdo imerso em 10 mL de alcian blue 0.02%. O conteúdo foi centrifugado a 2000 g por 10 minutos e o sobrenadante submetido à leitura em espectrofotômetro U/2000 (Hitachi, Japan) a 615 nm. A quantidade de muco na mucosa gástrica foi calculada de acordo com a quantidade de alcian blue ligada (mg/wet tissue [g]).

3.3. Avaliação Toxicológica

No ensaio de toxicidade aguda por dose única, os animais foram divididos em 2 grupos com n=10 para cada grupo. O grupo controle negativo recebeu administração de NaCl 0,9% (10mg.kg⁻¹, v.o.) e o grupo teste recebeu administração do extrato obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* na dose de 5000 mg.kg⁻¹, v.o. diluídos em NaCl 0,9% (10 mL.kg⁻¹). O consumo de água, ração, e a massa dos excrementos (fezes e urina), bem como a massa corpórea dos animais (Figura 7), foram avaliados diariamente durante 7 dias. Ao final do protocolo experimental os animais foram sacrificados sendo realizada a análise macroscópica dos órgãos, especificamente os estômagos, dos camundongos e verificada sua massa (BRITO, 1994).



Figura 7: Pesagem dos camundongos.

3.4. Análise Fitoquímica

3.4.1. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Resolução (HPTLC)

O protocolo experimental foi realizado conforme demonstrado por Corthout, 1999. Foram pesados 1 g da Tintura obtida a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* e dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto. A solução obtida foi submetida à centrifugação sendo o sobrenadante utilizado no processo cromatográfico. Foi utilizada como fase estacionária placas de HPTLC sílica gel 60 F254 (Merck, Alemanha). Como fase móvel foi utilizada solução de Clorofórmio: Acetato de Etila: Metanol: Água (15:40:22:9; v/v/v/v). A amostra teste e o padrão foram aplicados em volume de 20 µL. Após o desenvolvimento da cromatografia as placas foram nebulizadas com uma solução de ácido sulfúrico 5% (v/v), como revelador, em metanol seguido de aquecimento em estufa a 100°C por 5 minutos. As bandas foram visualizadas como manchas marrons.

3.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD)

O extrato hidroalcoólico das folhas de *P. glomerata* foi inicialmente centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos e posteriormente rotaevaporado à 45°C. Foi realizado *clean up* com cartucho C18, retirado 10mg do extrato e solubilizado em

Acetonitrila: Água (1:9; v/v) para LC/UV com posterior banho de ultrassom.

Sep-Pak em C18 foi passado três vezes o volume morto de água para ativar a C18, com fase estacionária: sílica. O volume morto de Acetonitrila 0,05%: Água (1:9; v/v) também foi passado três vezes para acondicionar a amostra que em seguida foi adicionada à coluna (10mg.mL⁻¹). Primeiramente foi purgado o sistema para retirar as bolhas de ar da coluna Hydro-RP 250 x 4,6mm; 4mm 80^a; Synergi (Phenomenex).

Método exploratório utilizado: Partiu de 10% de acetonitrila até 100% em 30 minutos. Injeção de 15mL no fluxo de 1mL.min⁻¹ pela coluna. Fase móvel: TFA (ácido trifluoacético) 0,05% em água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B).

O HPLC foi realizada num cromatógrafo analítica (gradiente quaternário, modelo PU 2089 Jasco) acoplado a um detector de diodearray (DAD) (modelo de MD-2010, Jasco).

3.4.3. – Espectrometria de Massas (LC-IT-MS/MS)

Para separações por CLAE foi utilizada coluna Sinergia Hidro (250 x 10 mm ID; 4 mm) e dois sistemas de solvente. O solvente A consistiu de água com ácido fórmico 0,01% e solvente B, metanol 0,01%. Análise de fragmentação por MS foi realizada em LCQ Deca MS (ESI-TI-MS) (Thermo Finnigan) equipado com uma fonte de ESI e um analisador de massa de captador de íons, que foi controlado por um software LCQ. O MS foi operado no modo de íons positivos e negativos na gama de m/z 200-2000. Xcalibur (version1.3, Thermo Finingan) que foi utilizado durante a obtenção dos dados e análise de MS.

3.4.4. Análise qualitativa da atividade antioxidante *in vitro* (Método DPPH)

Foram obtidos 100 µL de EtOH 70 de *Pfaffia glomerata* às quais foram solubilizadas em etanol e posteriormente serão aplicados em placa de cromatografia em camada delgada de alta resolução (HPTLC), (sílica gel 60, Merck, Alemanha). A cromatografia foi desenvolvida utilizando fase móvel utilizando como solventes, clorofórmio: acetato de etila: metanol: água (15:40:22:9; v/v/v/v) (Kotze *et al.* 2002).

Em seguida, sobre as placas foi nebulizada 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.

3.4.5. Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes em EtOH 70 de *Pfaffia glomerata* foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações (BONOLI *et al.*, 2004). O extrato (EtOH 70) (100 mg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 μ L desta última solução foi agitada com 500 μ L do reagente de Folin–Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 minuto; 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos. Por fim, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 e 0,781 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5. Avaliação Ecotoxicológica

3.5.1. Ensaio agudo com *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* para avaliação dos efeitos agudos do extrato de ginseng foram realizados de acordo com a ABNT NBR 12713 (ABNT, 2009). Foram avaliadas 10 concentrações diferentes do extrato obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* juntamente com água de diluição partindo de 0,019 g.L⁻¹ até 10 g.L⁻¹, assim como o controle. Foram adicionados 20 organismos distribuídos em 4 réplicas, para cada concentração (Figura 8) e observados os efeitos após um período de 48h de exposição. Os ensaios foram mantidos sob condições controladas de temperatura (20° C ± 1° C) e fotoperíodo (16 horas luz/ 8 horas escuro).



Figura 8: Diluições do extrato em água de diluição e soluções controle nas concentrações de 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039 g.L⁻¹ respectivamente.

3.5.2. Ensaio agudo com *Lytechinus variegatus*

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 que foram induzidos a liberação através de uma injeção de KCl 0,5 mol.L⁻¹ (Figura 9). A identificação é feita pela coloração, os óvulos apresentam uma coloração amarelo-alaranjados enquanto que os espermatozoides apresentam uma coloração esbranquiçada. As fêmeas foram apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo em um recipiente menor que o seu diâmetro (Figura 10). E os machos permaneceram em recipiente apropriado e os

espermatozoides foram coletados com auxílio de uma micropipeta (Figura 11) e acondicionados em um béquer envolto com gelo, sem que entrem em contato com água de diluição (Figura 12) até início dos experimentos.

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 partiram de $7,8125 \text{ g.L}^{-1}$ até 1000 g.L^{-1} , assim como os controles de água do mar e etanol. 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. Em seguida, três sub-amstras de $10 \mu\text{L}$ da solução foram colocadas em câmara de Sedwick-Rafter para contagem e cálculo da porcentagem de fecundação (mínimo de 70% de óvulos fecundados para utilização do ensaio). Após 20 minutos, o ensaio foi finalizado com adição de 0,5 mL de formol tamponado. Análises físicas e químicas iniciais e finais (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) também foram realizadas.



Figura 9: Estímulo para identificação e liberação de espermatozoides de *Lytechinus variegatus*. (Coccaro, 2013)

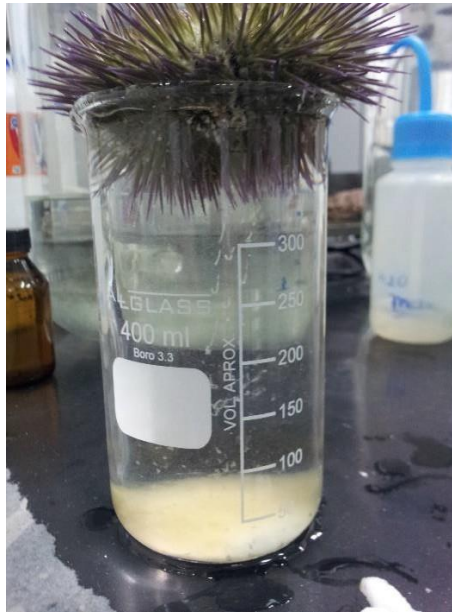


Figura 10: Fêmea de *Lytechinus variegatus* liberando os óvulos. (Coccaro, 2013)



Figura 11: Coleta de espermatozoides de *Lytechinus variegatus*. (Coccaro, 2013)

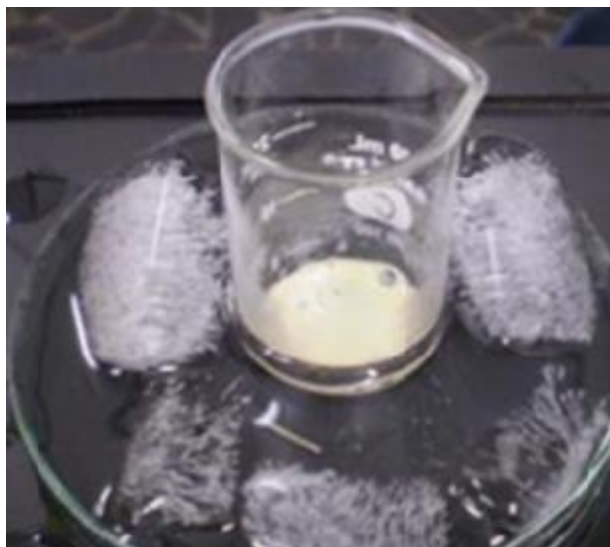


Figura 12: Espermatozoides de *Lytechinus variegatus* acondicionados em um béquer envolto com gelo. (Coccaro, 2013)

Os organismos teste *Daphnia similis* e *Lytechinus variegatus* utilizados nos ensaios, foram escolhidos mediante protocolo de avaliação da toxicidade de compostos excretados no ambiente. Ambos os organismos são considerados os mais sensíveis de água doce e água do mar respectivamente.

3.5.3. Ensaio crônico com *Lytechinus variegatus*

A mesma metodologia do ensaio agudo foi utilizada para a avaliação do efeito crônico, seguindo a norma técnica ABNT/NBR 15350/2012, que consistiu na exposição de ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) a diferentes concentrações do extrato etanólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* por um período de 24h a 28h de exposição. Após esse período de exposição com as substâncias teste em câmara com temperatura entre $24 \pm 2^\circ \text{C}$, 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*. Após atingida a porcentagem mínima, o ensaio foi encerrado e 0,5 mL de formol tamponado com bórax adicionando em todas as réplicas. A leitura do ensaio foi realizada em câmara

de Sedgwick-Rafter (Figura 13) e o estágio de desenvolvimento, bem como a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos de cada réplica foram tabulados. Análises físicas e químicas iniciais e finais (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) também foram realizadas.

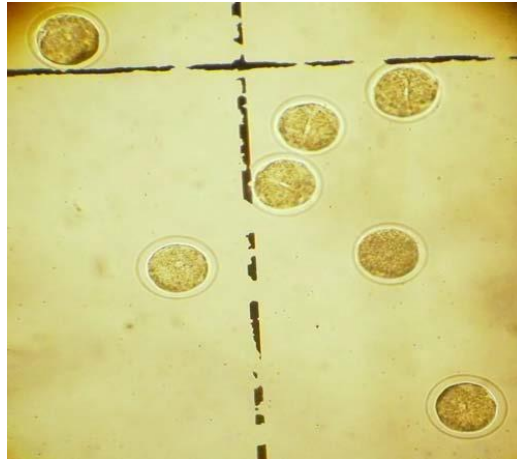


Figura 13: Ovos de *Lytechinus variegatus*. (400X) – (CORTEZ, 2010)

Tabela 1: Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* (Fertilização).

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±2° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	-
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	1 h e 20 minutos
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 mL
Volume das soluções-teste	10 mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	Aproximadamente 5×10^7 células e espermáticas e 2.000 óvulos por frasco-teste.
Idade do organismo-teste	Gametas de ouriço-do-mar recém liberados
Efeito observado	Taxa de fertilização
Validade do ensaio	De 70% a 90% de fertilização no controle
Alimentação	Sem

(CORTEZ, 2010)

Tabela 2: Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* (Embriolarval).

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±2° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	24 a 28 h
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 mL
Volume das soluções-teste	10 mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplica	30 organismos por mililitro
Idade do organismo-teste	Gametas de indivíduos adultos
Efeito observado	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento
Validade do ensaio	Mínimo de 80% de larvas pluteus normais nos controles
Alimentação	Sem

(CORTEZ, 2010)

4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade realizados para o extrato após a exposição de *Daphnia similis* e *Lytechinus variegatus* foram calculados através do Trimmed Spearman Karber[®]. E para os resultados dos testes farmacológico e toxicológico foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação Farmacológica

Atualmente, diversas são as possibilidades farmacológicas objetivando o tratamento da patologia da úlcera gástrica. Dentre tais classes terapêuticas encontram-se os fármacos neutralizadores do ácido gástrico (ex: hidróxido de alumínio e magnésio), os antagonistas de receptores H_2 (ex: ranitidina, famotidina, nizatidina) e os inibidores da bomba protônica (ex: omeprazol, lansoprazol, pantoprazol). No entanto, apesar desta ampla gama terapêutica para o tratamento da patologia da úlcera gástrica a recorrência das lesões consiste como um dos maiores problemas relativos à farmacoterapia desta patologia (SZABO & VINCZE, 2000). 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 tem desencadeado problemas à saúde humana, tais como aumento da incidência de infecções gastrointestinais, redução na qualidade do processo digestivo, desencadeamento de quadros anêmicos e aumento da incidência do desenvolvimento de câncer gástrico. Tais dados reforçam a necessidade de estudos contínuos no que tange ao desenvolvimento de novas moléculas que possam promover melhora no quadro de pacientes portadores da úlcera gástrica (TOMA, 2004).

Tendo em vista necessidade da busca de novas substâncias que promovam atividade antiulcerogênica com eficácia, segurança, baixa incidência de efeitos colaterais e preços acessíveis à população de menor renda, surgem então as plantas medicinais como grande fonte de estudos que possam em futuro próximo contribuir para o preenchimento dessa lacuna clínica.

O modelo de indução de úlcera gástrica pela administração de solução de HCl-EtoH em camundongos trata-se de método clássico de indução de lesões ulcerogênicas sendo frequentemente utilizada como fonte inicial para o estudo de prováveis substâncias com propriedades protetoras da mucosa gástrica. Sabe-se que o protocolo experimental é capaz de promover redução dos fatores de citoproteção da mucosa gástrica, tendo como destaque a redução na concentração das Prostaglandinas (PGE_2). Isto acaba favorecendo o ataque do ácido clorídrico à

mucosa gástrica promovendo deste modo as lesões ulcerogênicas. Ficando evidente que o protocolo experimental hora utilizado tem como princípio avaliação de substâncias com provável atividade antiulcerogênica com mecanismos associados à capacidade de citoproteção da mucosa gástrica (TOMA, 2005).

Os resultados obtidos após administração do extrato obtido a partir da tintura das folhas de *Pfaffia glomerata* nas doses de 125, 250, 500 e 1000 mg/Kg) pela via oral (v.o.) no modelo de indução de lesões ulcerogênicas após administração de HCl-Etanol demonstram redução do Índice de Lesões Ulcerogênicas (ILU) (** $p < 0,01$) apenas do extrato na dose de 500 mg.Kg⁻¹ (Figura 14) quando comparado ao grupo controle negativo (NaCl 0,9%). Ressalta-se que o nível de significância demonstrado pelo extrato é similar àquele obtido a partir do Lansoprazol (controle positivo) demonstrando deste modo grande eficácia terapêutica por parte do composto (Figura 15).

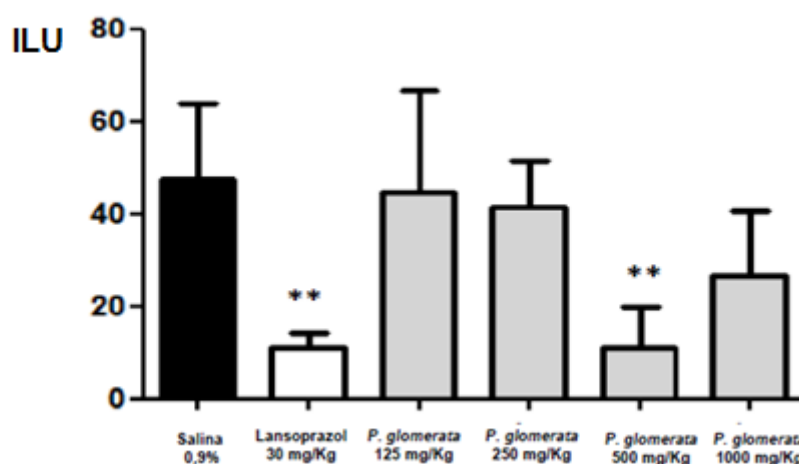


Figura 14: Os resultados apresentados demonstram o índice de Lesões Ulcerogênicas (ILU – mm²) expressos na forma de média +/- dp sendo ** $p < 0.01$ conforme Análise de Variância (ANOVA) com teste posterior de Dunnett.

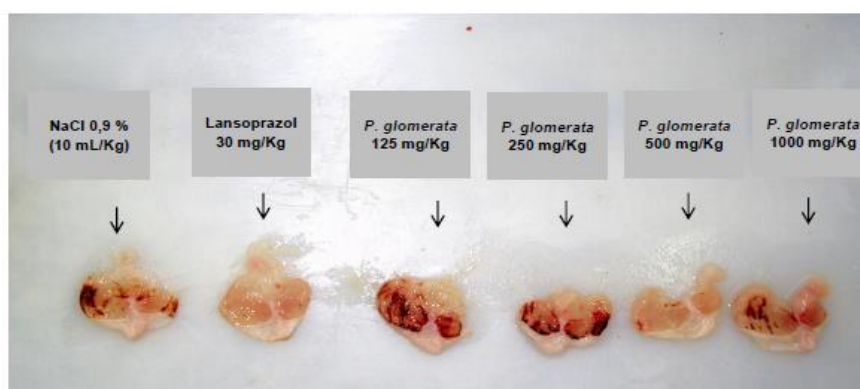


Figura 15: Mucosa gástrica de Camundongos Swiss submetidos á Úlcera Gástrica após administração de HCl/ Etanol.

Freitas (2003) constatou por meio de testes que extratos hidroalcoólicos da raiz de *Pfaffia* protegeram a mucosa gástrica de cobaias, confirmando o uso popular da planta bem como o resultado constatado no ensaio farmacológico.

Os Flavonóides, tais como kaempferol estão entre os compostos de maior eficácia comprovada para atividade citoprotetora e antiulcerogênica. O mecanismo de ação citoprotetor ocorre mediante a proteção da mucosa gástrica contra uma série de agentes ulcerosos, que a partir de sua ação antioxidante, elimina os radicais livres e consequentemente aumenta a produção de muco, ação antissecretora, inibindo o crescimento de *Helicobacter pylori* (Sumbul *et al.*, 2011). Dessa forma, a atividade citoprotetora, antiulcerogênica e antioxidante observada nos resultados (Figuras 16, 17, 22 e Tabela 3) pode ser atribuída ao kaempferol apresentado no EtOH 70% a partir de folhas de *P. glomerata*.

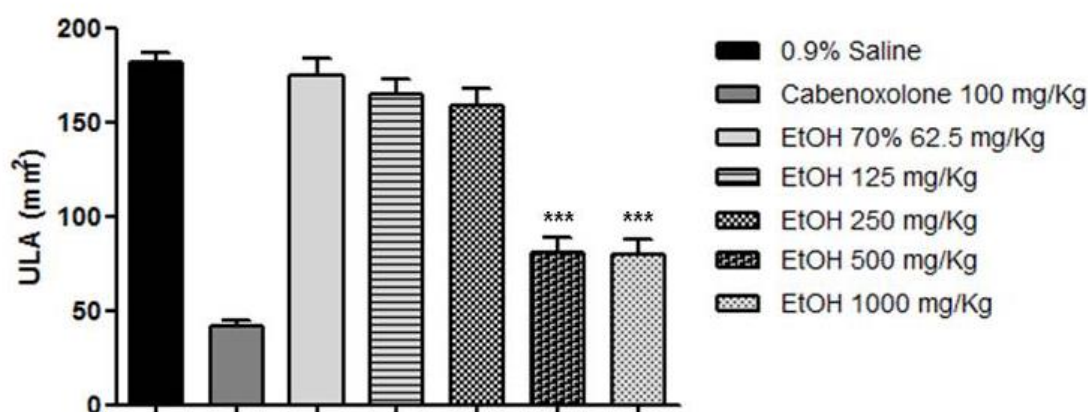


Figura 16: Efeitos de EtOH 70% a partir de folhas de *P. glomerata* e grupos controle quando submetidos à indução da úlcera gástrica por etanol absoluto em roedores. Os dados são expressos em média $\pm$ S.D. ANOVA seguido pelo teste Dunnet's com * $p < 0,001$**

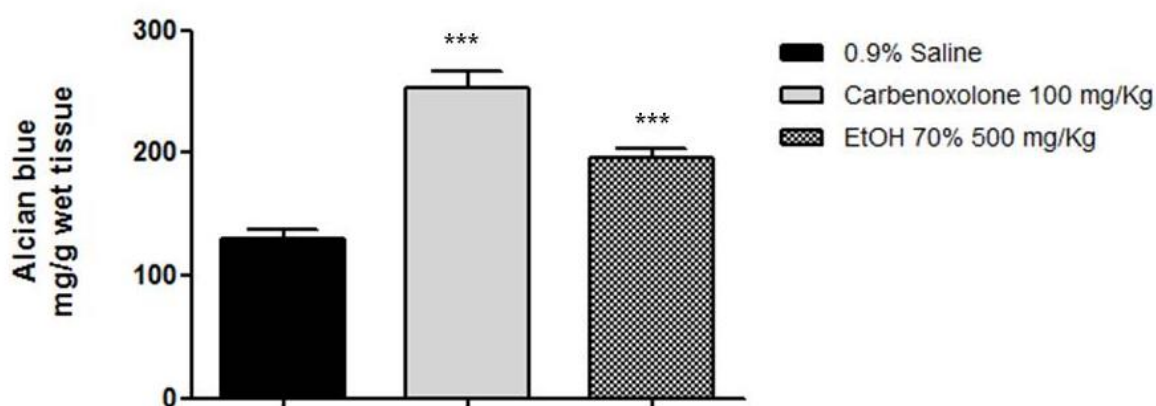


Figura 17: Resultados da adição de solução salina 0,9% Carbenoxolona e EtOH 70% das folhas de *Pfaffia glomerata* na mucosa gástrica em roedores. Os dados são expressos em média $\pm$ S.D. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

*** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle de solução salina a 0,9%

5.2. Avaliação Toxicológica

Tão importantes quanto as avaliações farmacológicas encontram-se as avaliações das propriedades toxicológicas das plantas medicinais, seus extratos e compostos. Tendo em vista os resultados positivos obtidos após a utilização do extrato obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* no protocolo experimental de indução de lesões ulcerogênicas, foi realizado ensaio propondo determinação de provável atividade toxicológica da substância teste em questão. Para tal propósito foi realizado o estudo de Toxicidade Aguda (Dose Simples). Este trata-se de estudo que propõem avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância-teste, fornecendo informações a cerca dos riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida. A toxicidade aguda serve de base ainda para o fornecimento de informações iniciais sobre o modo de ação tóxico da substância-teste (BRITO, 1994).

No ensaio de toxicidade aguda, após administração do extrato obtido a partir de *Pfaffia glomerata* na dose de 5000mg.Kg^{-1} pela via oral (v.o.) não foram evidenciadas mortes ou alterações quanto ao consumo de água, ração e volume de excretas quando comparados ao grupo controle (NaCl 0,9%), que possam evidenciar

danos toxicológicos aos animais utilizados.

5.3. Avaliação Fitoquímica

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos químicos, denominados de metabólitos secundários, que têm função, principalmente, de defesa contra predadores e patógenos. Existem três principais grupos de metabólitos secundários, de acordo com sua biossíntese: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos contendo nitrogênio (TAIZ *et al.*, 2004).

Shiobara (1993) analisando a composição química das raízes de *P. glomerata* detectou a presença de substâncias com atividade adaptógena (característica farmacológica de promover aumento da resistência), como ácido glomérico (triterpenóide), ácido pfamérico (nortriterpenóide), ecdisterona, rubrosterona, ácido oleanólico e β - glicopiranosil oleanolato.

Felipe (2014) relata a identificação de flavonóides e hormônios nas raízes e inflorescências de *P. glomerata*, dentre eles foram encontrados respectivamente, kempferol e fitoecdisteróides.

Os fitoecdisteróides são hormônios produzidos pelas plantas, cuja função ainda não foi completamente esclarecida, porém parece exercer importante papel em seu desenvolvimento e ação protetora contra predadores, como insetos e parasitas (FLORES, 2006). Esses hormônios se tornaram alvos de estudos farmacológicos, que apesar de pouco conduzidos ao isolamento de compostos, sua presença nos vegetais parece ser benéfica à saúde. Em geral, os ecdisteróides estão presentes em vários órgãos das plantas, contudo a distribuição desses metabólitos, em geral, não é uniforme (DINAN, 2001). Pesquisas apontam quantidades consideráveis de ecdisteróides em várias espécies de Amaranthaceae (SAVCHENKO, 1998), sendo mais estudado nas raízes de *P. glomerata* (SHIOBARA, 1986).

Semelhante à outras espécies do gênero, estudos químicos revelaram a presença de saponinas e ecdisteróides nas raízes de *P. tuberosa*, destacando-se o ácido oleanólico e a ecdisterona respectivamente (FLORES, 2006).

Nishimoto (1986) também encontrou ecdisterona nas raízes de *Pfaffia* Spreng, substância empregada usualmente no processamento de fitoterápicos. O fitoeecdisteróide 20-hidroxiecdisona (20E) também é citado como ecdisterona e β -ecdisona, sendo este o mais utilizado na literatura quando em referência à *Pfaffia glomerata*.

A β -ecdisona é um tipo de ecdisteróide utilizado como marcador químico da qualidade das raízes de *P. glomerata*. Segundo Gil (2005), o uso de marcadores químicos é muito comum quando os princípios ativos da planta não estão determinados ou disponíveis na forma de padrões, como é o caso da *P. glomerata*. De forma que a utilização da HPLC tem se tornado uma das técnicas mais importantes e mais empregadas na realização de análises de cunho qualitativo e quantitativo em várias espécies de interesse medicinal (FLORES, 2006)

Análises feitas em raízes de diferentes acessos de *P. glomerata* mostraram teores de β -ecdisona variando de 0,15 a 0,75%, mostrando que a espécie apresenta uma grande variabilidade em relação ao acúmulo deste metabólito (MONTANARI, 1999; FIGUEIREDO, 2004; FREITAS, 2004; ZIMMER, 2006). Segundo Figueiredo (2004), estas variações no conteúdo de Beta-ecdisona podem ser devido a diferenças na metodologia de análise ou nas condições ambientais de cultivo. A análise do extrato de *P. glomerata* mostrou que tanto a raiz como as partes aéreas acumularam β -ecdisona. As partes aéreas apresentaram cerca de duas vezes mais β -ecdisona quando comparada às raízes (FLORES, 2006)

As raízes de várias espécies de *Pfaffia* são comercializadas como “ginseng brasileiro”, o que pode levar a adulterações. Estudos realizados visaram à definição e validação de métodos de controle de qualidade, como por exemplo, a quantificação das saponinas de *Pfaffia glomerata* por espectrofotometria (VIGO, 2003). Em outro trabalho Vigo (2004) caracterizou comparativamente *P. glomerata* e *Hebanthe paniculata* sob o aspecto da farmacognosia e os resultados obtidos permitiram diferenciar as duas espécies com base nos dados botânicos, físico-químicos, qualitativos e quantitativos. Espécies do gênero *Pfaffia* também são utilizadas em substituição ao “ginseng” coreano (*Panax spp*, Araliaceae). Considerando a deficiência de critérios de qualidade para estas matérias-primas vegetais, foi estabelecido método químico por Cromatografia em Camada Delgada

(CCD) para a diferenciação entre as espécies mencionadas (ZIMMER, 2005). A mesma autora também validou, uma metodologia simples e rápida para quantificação de ecdisterona em extratos de *P. glomerata*, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ZIMMER, 2006).

A análise fitoquímica de EtOH a 70% a partir de folhas de *P. glomerata* indicou a presença de flavonóides e os fitosteróis, e a análise de HPLC confirmou a presença de kaempferol (flavonóide) e β -ecdisona (fitosterol) como os principais metabólitos secundários (Figuras 18, 19, 20, 21 e Tabela 3). As características estruturais de cada pico foi determinada por comparação do seu espectro de LC-UV correspondente, com os espectros de LC-UV disponível na base de dados para HPLC (Carmona *et al.*, 2007; Rostagno *et al.*, 2014; www.massbank.jp).

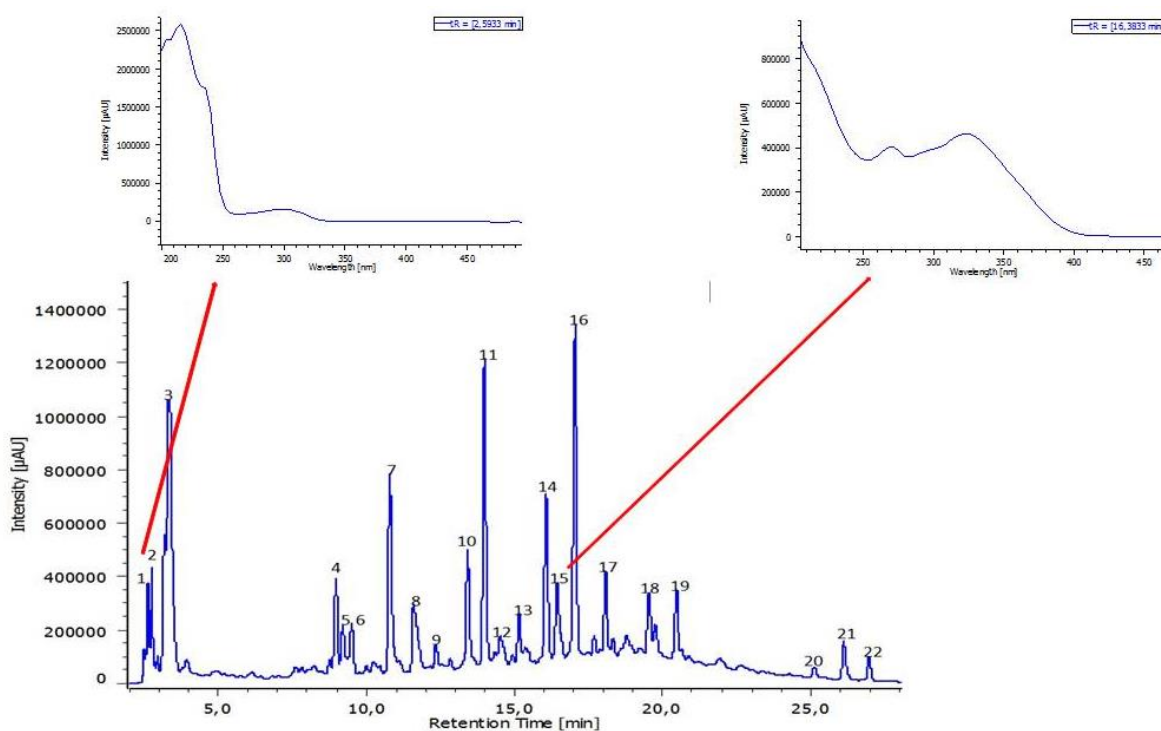


Figura 18: Perfil de HPLC do extrato das folhas de *Pfaffia glomerata* registado a 250 nm. Espectro de absorção de UV para os picos 1 e 15 (identificado como β -ecdisona e kaempferol, respectivamente) é mostrado em detalhes (RT 2,5933 e 16,3833 min).

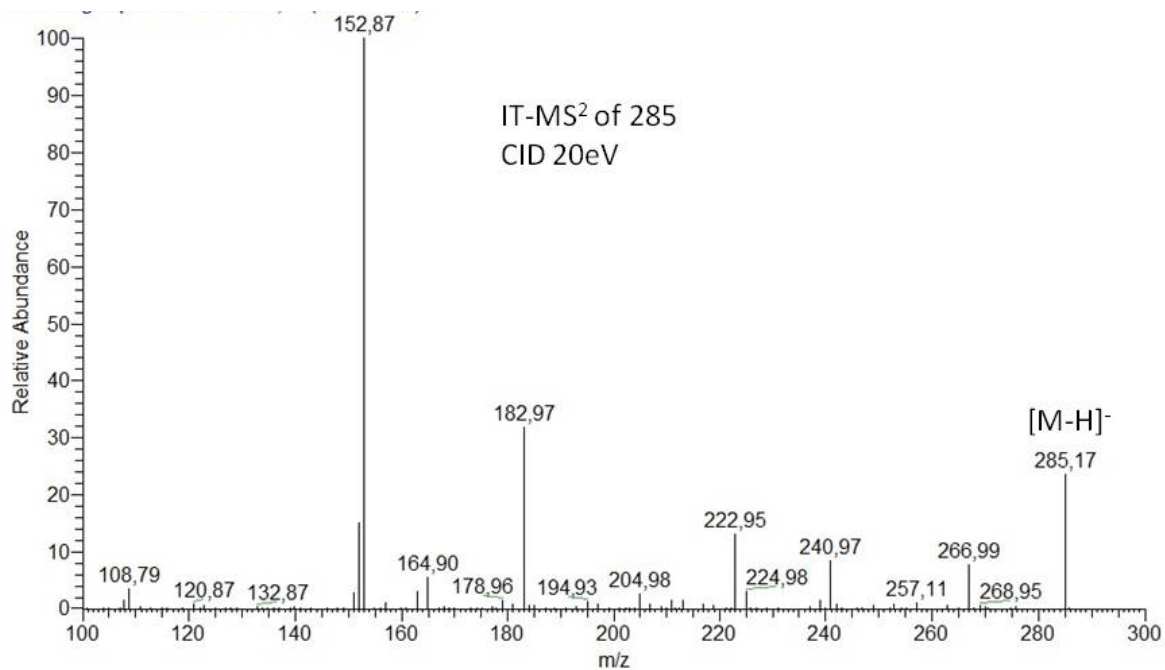
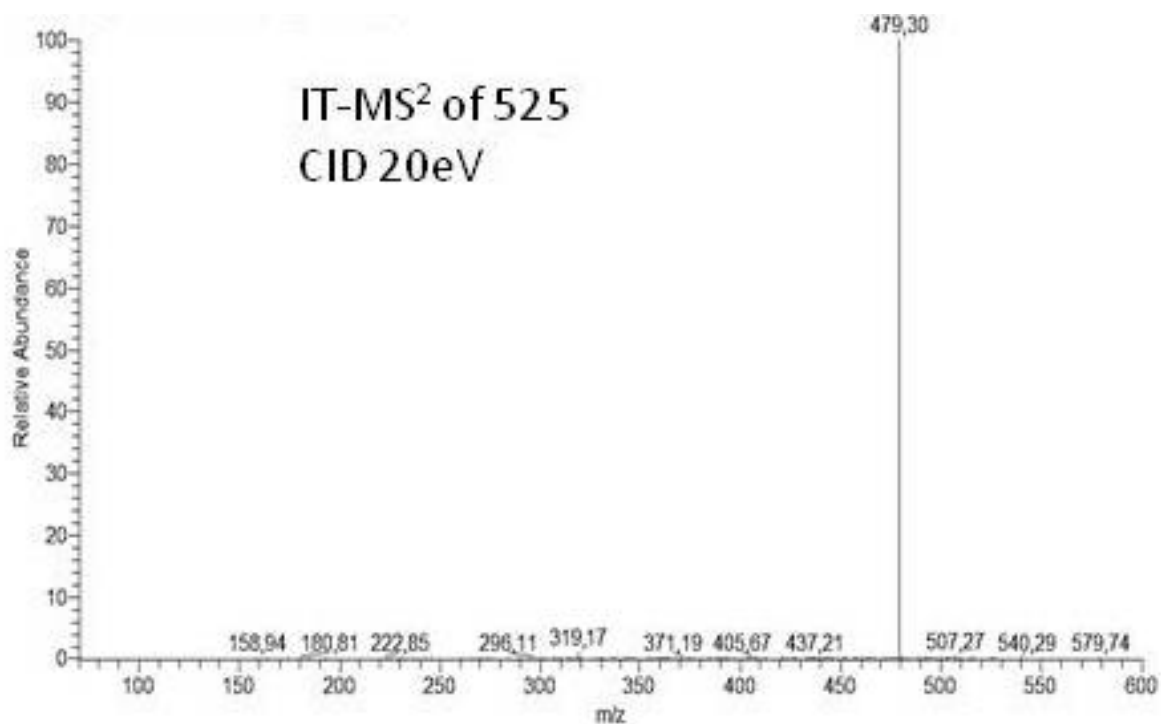


Figura 19: Análise de TI-MS² para o composto identificado como Kaempferol (MW 286) no modo de íon negativo [M-H]⁻ - (Felipe *et al.*, 2014).



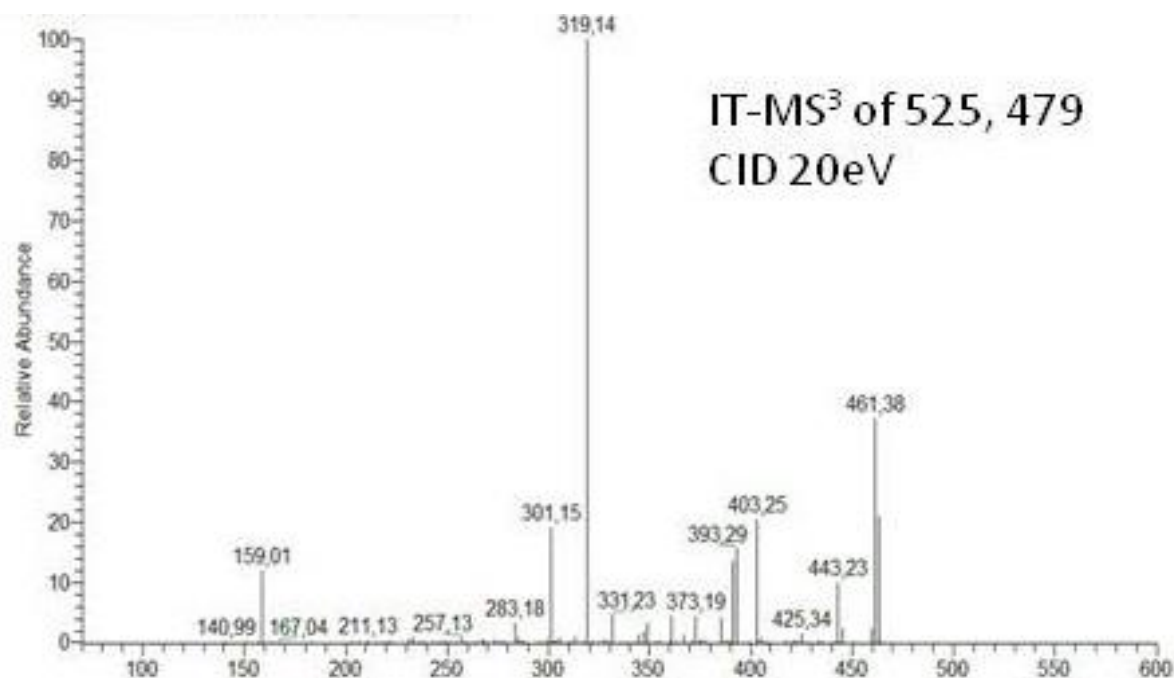


Figura 20: MS² e MS³ análise, respectivamente, para o composto identificado como β -ecdisona em modo de íon negativo. β -ecdisona exibiu íons de $[M + HCOO]^-$ para m/z 525 no modo negativo, devido à adição de ácido fórmico a 0,1% na fase móvel (Felipe *et al.*, 2014).

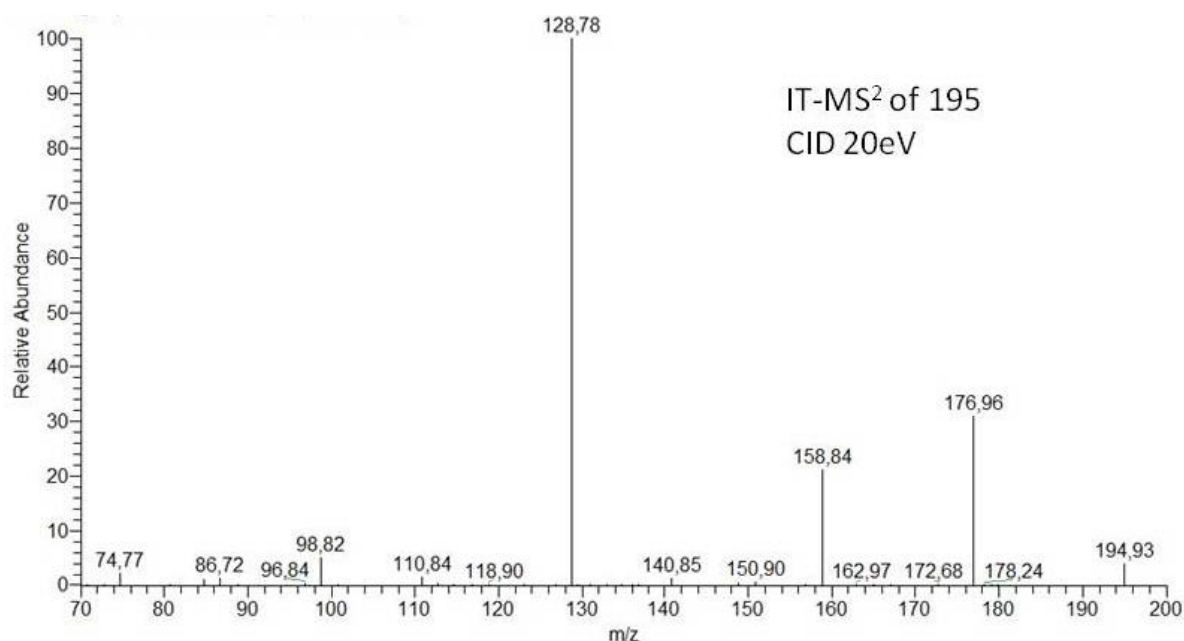


Figura 21: Análise de MS² para o composto identificado como o ácido glucônico (MW 196) $[M-H]^-$ – (Felipe *et al.*, 2014).

Tabela 3: Substâncias identificadas no EtOH 70% obtidos a partir das folhas de *P. glomerata* em LC-MS / MS no modo negativo.

[M-H] ⁻	MS ⁿ ions	Identification	Reference
195	176,96; 158,84; 128,78; 98,82; 74,77	Gluconic acid	Felipe et al., 2014
285	266,69; 240,97; 222,95; 182,97; 152,87; 108,79	kaempferol	Mass Bank, 2015
525 [M+HCOO] ⁻	479,00; 461,38,; 319,14; 301,15; 159,01	β-ecdysone	Felipe et al., 2014

O método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis, DPPH, de cor violeta quando há adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Esse método consiste na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (NEVES, 2009).

Como mecanismo complementar avaliado, foi realizada a análise qualitativa da atividade antioxidante do EtOH 70% a partir de folhas de fáfia ,utilizando o ensaio de 2,2, difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) no TLC. Como controle positivo foi utilizado ácido gálico. O método de triagem por TLC DPPH sugeriu a presença de substâncias antioxidantes, indicadas por manchas amarelas com fundo roxo na placa cromatográfica (valores de R_f de 0,37 e 0,81) apontando assim a redução do radical DPPH (Figura 22)

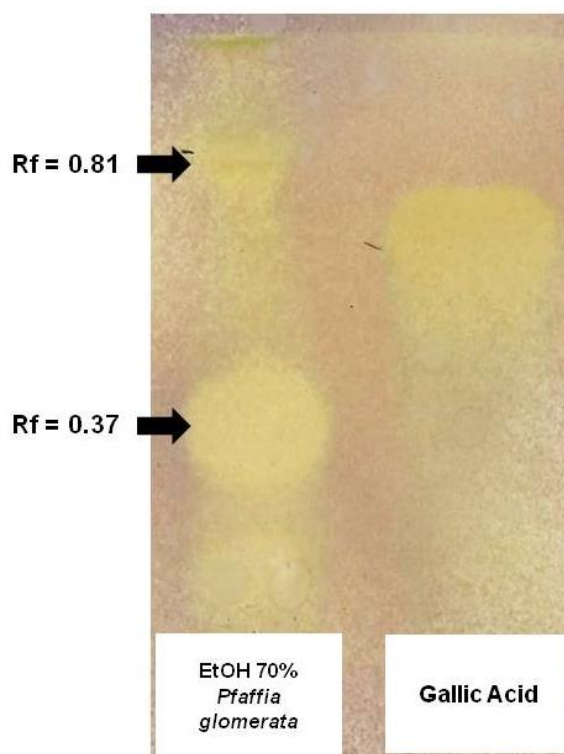


Figura 22: EtOH 70% a partir de folhas de *P. glomerata* (esquerda) e ácido gálico com controle positivo (direita) separados por uma placa de TLC e revelados com DPPH.

Considerando a grande quantidade de metabólitos secundários naturais disponíveis na natureza a partir de plantas com atividade antioxidante, os compostos fenólicos desempenham um importante papel na saúde humana. Eles ocorrem em quantidades significativas em diversos tipos de frutas, legumes e plantas. Dessa forma, ao confirmar a atividade antioxidante das folhas de *P. glomerata*, foi avaliado o teor de fenóis totais por meio da utilização do reagente Folin-Ciocalteu, e o resultado foi positivo para fenól, expresso como equivalente ao ácido gálico por g de extrato (Tabela 4).

Tabela 4: Determinação de fenóis totais por Folin-Ciocalteu Método em EtOH 70% a partir de folhas de *P. glomerata*.

Amostra	Folin-Ciocalteu^{a,b} (mg de GAE.g⁻¹)
EtOH 70% folhas de <i>Pfaffia glomerata</i>	152.3 ± 7.6

A. Média ± desvio padrão de ensaios em triplicata.

B. Dados fenólicos totais expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama (mg de GAE.g⁻¹).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoli- ácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos à um complexo azul (NEVES, 2009).

5.5. Avaliação Ecotoxicológica

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, que hoje disponibiliza para o mercado milhões de substâncias com propósito terapêutico, acarretou colateralmente um grave problema ambiental, o qual vem crescendo em atenção e preocupação nas agências controladoras do ambiente em várias nações (GARRIC, 2003). O aporte de substâncias farmacologicamente ativas no ambiente advém do uso intenso e extensivo no tratamento de doenças em seres humanos e animais sendo excretadas na forma metabólitos ou não e introduzidas, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais e industriais nos corpos hídricos receptores das águas servidas (CALAMARI, 2003; PETROVIC, 2005; CHAMPAN, 2006).

O monitoramento de substâncias farmacêuticas residuais em matrizes ambientais tem sido abordado em vários trabalhos de pesquisas desde o final da década de 90, tornando-se um tema bastante discutido devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em estações de tratamento de esgoto (ETE's) e abastecimento de água (ETA's), bem como em outras matrizes ambientais tais como solo, sedimento e águas naturais em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}^{-1}$ e ng/L^{-1} . A grande preocupação da presença destes fármacos residuais na água são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana, animal e de organismos aquáticos (BILA, 1990; PONEZI, 2006). Levando-se em conta a possibilidade de riscos ambientais do Ginseng quando em contato com o meio ambiente, foram realizados ensaios ecotoxicológicos através dos protocolos associados aos organismos aquáticos *Daphnia similis* e *Lytechinus variegatus*. Ambos os organismos foram escolhidos a partir de protocolo utilizado para avaliação de efeito tóxico. A *Daphnia similis* por ser o organismo de água doce que apresenta

maior sensibilidade, uma vez que são utilizadas neonatas para a realização dos ensaios, e o *Lytechinus variegatus* por apresentar uma maior possibilidade de coleta do material necessário para avaliação de fertilização e embriolarval.

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade realizados para o extrato de *Pfaffia glomerata* foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade dos dados através do método Chi-quadrado e do teste de Bartlett, respectivamente. Posteriormente foi aplicada análise de variância (ANOVA) com *post hoc* de Dunnett, no qual as diferenças significativas foram determinadas quando $p < 0,05$. Além disso, foi utilizado o método de interpolação linear para determinação da CI50 através do software ICp 2.0 (USEPA, 1993).

Após a exposição de *Daphnia similis* no ensaio de toxicidade aguda, os dados obtidos nos testes definitivos demonstraram que a CE50 média encontrada nas concentrações testadas foi de 180,0 mg.L⁻¹. De acordo com este resultado, o composto poderia ser classificado como uma substância “não tóxica” com base na diretiva 93/67/EEC da União Europeia (CEC, 1996) (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação do risco ecotoxicológico após exposição aguda de *Daphnia similis* ao extrato obtido a partir da tintura de *Pfaffia glomerata* baseada na diretiva 93/67/EEC da União Europeia e nos resultados do presente estudo.

Nãotóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamentetóxico
CE50 > 100	CE50 entre 10 e 100	CE50 entre 1,0 e 10	CE50 entre 0,1 e 1,0	CE50 < 0,1
mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹

Foram realizados três ensaios definitivos e calculada suas respectivas CE50, apresentando um resultado favorável também em cada ensaio avaliado individualmente.

Já os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade com *Lytechinus variegatus* apresentaram um valor de CI50 média de 93,75 mg.L⁻¹ para ensaio agudo e 9,63 mg.L⁻¹ para ensaio crônico. De acordo com estes resultados, o composto poderia ser classificado como uma substância “nociva” para ensaio agudo e como “tóxica” para ensaio crônico com base na diretiva 93/67/EEC da União Europeia

(CEC, 1996) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6: Classificação do risco ecotoxicológico após exposição aguda de *Lytechinus variegatus* ao extrato obtido a partir do extrato de *Pfaffia glomerata* baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo.

Não tóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamente tóxico
CE50 > 100	CE50 entre 10 e 100	CE50 entre 1,0 e 10	CE50 entre 0,1 e 1,0	CE50 < 0,1
mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹

Tabela 7: Classificação do risco ecotoxicológico após exposição crônica de *Lytechinus variegatus* ao extrato obtido a partir do extrato de *Pfaffia glomerata* baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo.

Não tóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamente tóxico
CE50 > 100	CE50 entre 10 e 100	CE50 entre 1,0 e 10	CE50 entre 0,1 e 1,0	CE50 < 0,1
mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹

O extrato também não apresenta toxicidade aguda quando administrado em dose única. Além disso, apresenta menor risco ambiental quando comparado à compostos sintéticos, como o omeprazol que é um fármaco que apresenta a mesma ação terapêutica que o Ginseng, uma vez que o Omeprazol é considerado “extremamente tóxico” (CI50 56,12 µg.L⁻¹) de acordo com a diretiva européia, quando avaliado efeito crônico em diferentes estágios de vida do mexilhão marinho *Perna perna* (ARTHUT, 2012).

6 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* apresenta significativa atividade antiulcerogênica, citoprotetora e antioxidante quando administrado na dosagem de 500 mg.kg⁻¹ (v.o.). Essa atividade farmacológica possivelmente pode ser atribuída à presença de kaempferol e β -ecdisona. Observou-se também que o extrato avaliado na dose de 5000mg.kg⁻¹ (v.o.) não proporcionou mortalidade aos animais, bem como não promoveu alterações nos parâmetros fisiológicos destes, tais como consumo de água, ração, volume de excretas e alterações no peso corpóreo.

Quanto a avaliação ecotoxicológica, o extrato de *Pfaffia glomerata* não demonstrou efeito toxicológico agudo sobre o organismo aquático *Daphnia similis*, e apresentou efeito tóxico relativamente baixo em exposição crônica ao *Lytechinus variegatus* quando comparado ao Omeprazol que com base na legislação européia é classificado como substância “extremamente tóxica”, sendo portanto mais danoso ao ambiente que o extrato.

Tais dados são relevantes à medida poderão servir como referência para a sequência de análise farmacológicas, toxicológicas e ambientais por parte do extrato obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata*, a fim de que no futuro as folhas de tal planta possam fazer parte da lista de compostos indicados para o tratamento de úlceras gástricas, possivelmente fazendo parte da lista de fitoterápicos do SUS como uma outra alternativa de tratamento a base de plantas ou até mesmo utilizando a molécula como protótipo para síntese e manipulação de medicamentos antiulcerogênicos, citoprotetores e antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda. Método de ensaio com *Daphnia* spp** (Crustácea – Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 21 p.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.

ARTHUR J.C. Mathias; Lorena da S. Souza; Fernando S. Cortez; Camilo D. Seabra Pereira. **Avaliação dos efeitos tóxicos do fármaco omeprazol sobre mexilhões *Perna Perna* (linnaeus, 1758)**. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. 25 a 28 de setembro de 2012. Porto de Galinhas – PE

BAKER M.E. Licorice and enzymes other than 11- β -hidroxiesteroide desidogenase: an evolution perspective. **Steroids**. Vol. 59, p. 136-141, 1994.

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

BILA, D.M; DEZOTTI, M. **Química Nova** vol.26 n°.4 São Paulo July/Aug. 2003

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011., 126p.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010, 904 p., 2v/il.

BRITO, A.R.M.S. Toxicidade Aguda (dose Simples e doses repetidas), subcrônica e chronic. **Manual de Ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. UNICAMP; São Paulo, 1994.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11a Edição. United States of America: **Mc Graw-Hill Companies**, Inc., 2006.

CALAMARI, D.; Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 1241-1248, 2003.

CHAPMAN, P.M.. Emergin substances – Emergin Problems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n.6, p. 1445-1447, 2006
COCCARO P.; GUIMARÃES L.L.; MAZZEO G.C.C.S.; SILVA M.P.O.; TOMA W. **Phytochemistry Evaluation by Thin Layer Chromatography (TLC) from *Terminalia catappa* fallen leaves**. Unisanta BioScie., 110 - 114; Vol. 2 n° 2, 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.

CORTHOUT, J.; Naessens, T.; Apers, S.; Vlietinck, A. J.: Quantitative Determination of Ginsenosides from Panax Ginseng roots and Ginseng Preparations by Thin-Layer Chromatography-Densitometry. **J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 21 (199 9) 187-192.

FELIPE, D. F.; Brambilla, L. Z. S.; Porto, C.; Pilau, E. J.; Cortez, D. A. G. (2014), **Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/MS**.

FLORES, R.; **Cultura de tecidos e produção de becdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. 2006. 168p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FLORES. R.; Cezarotto, v.; Brondani, D.; Giacomelli, S. R.; Nicoloso, F. T.; Análise de β -ecdisona em plantas in vivo e in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, através da Cromatografia em Camada Delgada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.4, p.368-371, 2009

FREITAS, C. S.; Baggio, C. H.; Araújo, S. L.; Marques, M. C. A. (2008), **Effects of *Pfaffia glomerata* (Spreng) pedersen aqueous extract on healing acetic acid-induced ulcers**.

GARRIC, J.; Tilghman, A.; Cogoluégnès, A. In: Europena Conference on Human & Veterinary Pharmaceuticais in the Environment (Envirpharma), 2003, Lyon. **Final Report: Summary of the Scientific**. Lyon [s/n], 2003.

GUERRA, P. M.; Nodari, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. cap. 1, p. 14-28.

HOOGERWERF, W. A. & PASRICHA, P. J. **Agents used for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers and gastroesophageal reflux disease**. In: HARDMAN, J. G. & LIMBIRD, L. E. Goodmans & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 11TH edition, McGraw-Hill, International edition, p.1005-1020, 2005.

HUCK, C. W.; BUCHMEISER, M. R.; BONN, G. K. Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 943, v. 1, p. 33-38, 2002.

Imagem *P. Glomerata* Disponível em:
<http://www.biodiversidade.rs.gov.br/portal/index.php?acao=especies_ameacadas&id=319&tipo=2> Acesso em: 31 out. 2012.

KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 18 set. 2001. Caderno 1, p. 6.

MARCELLI, M.P. 1998. History and current knowledge of Brazilian Lichenology. In: M.P. Marcelli & M.R.D. Seaward (eds.). **Lichenology in Latin America**. pp. 25-45. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), São Paulo.

MARIZA C. Chiaradia; Carol H. Collins; Isabel C. S. F. Jardim. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos** (Quím. Nova vol.31 no.3 São Paulo, 2008)

Massbank (www.massbank.jp)

MOURA, A.C.S.; Vilegas, W.; Santos, L.C. **Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (FABACEAE) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar.** (Quim. Nova, Vol. 34, No. 7, 1136-1140, 2011).

NEVES, L. C.; Alencar, S. M.; Carpes, S. T.; Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifer*. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, junho 2009

NISHIMOTO, N.; Nakai, S.; Takagi, N.; Hayashi, S.; Takemoto, T.; Odashima, S.; Kizu, H.; Wada, Y.; Pfaffosides and Nortriterpenoid Saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry** 23(1), 139-142, 1984.

NISHIMOTO, N. et al.; Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v.26, n.9, p.2505-7, 1987

OYAGI, A; Ogawa, K; Kakino M; Hara H. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. **BMC Complement Altern Med**. 2010 Aug 18;10:45.

PETROVIC, M.; Hernando, M.D.; Dia-Cruz, M.S.; Barceló, D. **Liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review.** **J. of Chromatography A**, v. 1067, v. 1/2, p. 1-14, 2005.

PINTÃO, A.M.; Silva, I.F. **A Verdade sobre o Açafrão. Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos.** IICT /CCCM, 29, 30 e 31 de Outubro de 2008. Instituto Superior de Saúde Egas Moniz. Caparica - Portugal.

PONEZI, A.N.; Duarte, M.C.T.; Claudino, M.C. **Fármacos em Matrizes Ambientais - Resumos – CPQBAUNICAMP – 2006.** Resumos – CPQBAUNICAMP – 2006.

POSSENTI, A.; Carvalho, J.E.; Monteiro, K.M.; Dias, I.M.G.; Gibrim, N.F.; Jacobucci, H.B. Atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação de alimento fermentado à base

de trigo e soja utilizado como alimento funcional. **Rev. De Gastroenterologia Endoscopia Digestiva.**, Vol. 30, n. 4, p. 126, Out – Dez., 2011.

RATES, S. M. K.; Gosmann G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Rev. Bras. Farmacog.**, Vol. 12, n. 2, p. 85-93, Jul.-Dez., 2002.

ROBARDS, K. Strategies for the determinations of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1/2, p. 657-691, 2003.

RODRIGUES, C. M.,; **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de doutor em química no Instituto de Química na Universidade Estadual Paulista, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**, ed 6, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, 1999, 2007.

SOARES, T. S.; Mota, J. H.; Vieira, M. C. **Viabilidade econômica da produção comercial de *Pfaffia glomerata***. Horticultura Brasileira. Porto Seguro – UESB/ABH, 2007. v. 25.

SHIBATA, S.; Saponins with biological and pharmacological activity. In: Wagner H.; Wolff P. (ed.). **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: Springer, 1977.

SHIOBARA, Y. et al.; A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, p.1527-30, 1993.

SMITH, L. B.; Downs, R. J.; **Flora ilustrada catarinense: Amarantáceas**. Itajaí : UFSC, 1972. 110p.

SNYDER, L. R.; Kirland, J. J.; Glajch, J. L.; **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SZABOA, S.; Vincze, A.; Growth factors in ulcer healing: lessons from recente 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**. 1978 Oct 13;41(1):99-105.

TOMA W.; Gracioso J. S.; Andrade F. D.; Lima C. A. H.; Vilegas W.; Brito A. R. S.; Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biol Pharm Bull**. 2002 Sep; 25(9):1151-5.

TOMA W, Hiruma-Lima CA, Guerrero RO, Brito AR. Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. **Phytomedicine**. 2005 May; 12(5):345-50.

TOMA W., Trigo J.R.; Bensuaski de Paula A.C.; Monteiro Souza Brito A.R. 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.

VIGO, C.L.S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius - *Amaranthaceae* Kuntze. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.6, n.2, p.7- 19, 2004.

VOMERO, N. D.; Colpo. E.; Cuidados nutricionais na úlcera péptica. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.** 2014;27(4):298-302

WALLACE, J. L.; Granger, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J.**, 10(7): 731-740, 1996.

WALLACE, J. L.; Ma, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Exp. Biol. Med.**, 226(11): 1003-1015, 2001.

WELLUM, D. A.; Kirby, W.; High-performance liquid chromatographic assay for teaflavins. **Journal of Chromatography A**, v. 206, n. 2, p. 400-406, 1981.

ZEEB, D. J.; Nelson, B. C.; Albert, K.; Dalluge, J. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 5020-5026, 2000.

ZIMMER, A. R. et al.; HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.450-3, 2006.

ANEXO

The antiulcerogenic, phytochemical and rodent and environmental toxicity of *Pfaffia glomerata* leaves: a medicinal plant commonly used by Brazilian folk medicine

Giovanna Christina Costa da Silva Mazzeo^{1,*}; Luciana Lopes Guimarães¹; Clélia Akiko Hiruma³; Larissa Lucena Perico³; Vinicius Peixoto Rodrigues³; Alba Regina Monteiro Souza Brito³; Fernando Sanzi Cortez¹, Fábio Hermes Pusceddu¹, Aldo Ramos Santos¹, Wagner Vilegas²; Cláudia Neves Correa²; Fabiano Pereira do Amaral²; Walber Toma^{1,**}

¹ Universidade Santa Cecília- UNISANTA – Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Rua Oswaldo Cruz, 266, Boqueirão, CEP 11045907 Santos, SP, Brazil

² Universidade Estadual Paulista-UNESP – Campus Experimental do Litoral Paulista, CEP 11330-900 São Vicente, SP, Brazil

³ Universidade Estadual Paulista-UNESP – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, CEP 18618-970 Botucatu, SP, Brazil

* gcmazzeo@hotmail.com

** walbertoma@unisanta.br

Abstract

For over 7000 years various forms of ginseng are used in alternative medicine, one of them is *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), popularly known as "Brazilian Ginseng" and "paratudo" and is widely used to treat gastric disorders and how healing. Studies from the root extract proved its anti-ulcer activity, but all the knowledge about the effects of this plant comes from the root, there are no reports of the use of leaves to use this drug. The study aimed to identify whether the aerial parts of the plant also have the same antiulcerogenic activity found in the root, and what the substances responsible for this activity, since the use of the leaves instead of the root is more economical and ecologically viable. The pharmacological

evaluation for the observation of anti-ulcer activity was performed by gastric ulcer induced in rodents, and the mean result obtained at dosage 500 mg.kg⁻¹. Phytochemical analysis was performed to identify the compounds responsible for the majority antiulcer action, and consisted of thin layer chromatography, high-resolution (HPTLC) and mass spectrometry (HPLC-UV-DAD and LC-IT-MS / MS). Also evaluated the antioxidant activity of the extract through sequestration method of free radicals (DPPH) and the content of phenolic compounds determined by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu. All phytochemicals tests demonstrated positive results, identifying the presence of flavonoids and steroids and proving the antioxidant action and the presence of phenolic compounds in the extract.

1- Introduction

During the past decade, complementary and alternative medicines have become a topic of global importance. Current estimates suggest that in many developing countries, a large portion of the population relies heavily on traditional practitioners and medicinal plants to meet primary healthcare needs. Although modern medicine may be available in these countries, herbal medicines (phytomedicines) have often maintained their popularity for historical and cultural reasons (Saraf and Saraf, 2012).

Ethnopharmacological evaluations of traditional drugs is perhaps an approach that concentrates most investigations, focusing on an assessment of traditional preparations regarding their effectiveness. Both animals and plants provide extensive resources for new Complementary and Alternative Medicine (CAM) approaches which may prove important for future applications (Albuquerque et al., 2012).

Natural products and related structures are essential sources of new pharmaceuticals, because of the immense variety of functionally relevant secondary metabolites of microbial and plant species. Furthermore, the development of powerful analytical tools based upon genomics, proteomics, metabolomics, bioinformatics and other 21st century technologies are greatly expediting identification and characterization of these natural products (Ngo et al. 2013)

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) is a perennial herb, traditionally known as Brazilian ginseng and its roots are widely used in Brazilian traditional medicine (Nascimento et al., 2007; Festucci-Buselli et al., 2008). Several

pharmaceutical manufacturers have produced phytopharmaceuticals containing *Pfaffia glomerata*, although only the roots have been processed to obtain the active ingredients (Flores et al., 2010; Carulo, 2012).

Moreover, in Brazil, several are the therapeutic properties attributed to the folk medicine by *Pfaffia glomerata* leaves. For example, in the Paraná, Espírito Santo and Pernambuco States the leaves of this plant is indicated to the fever treatment (Negrelle et al, 2007; Rodrigues & Andrade, 2014); to the Leishmaniose treatment in the Alagoas State (Queiroz, 2014); to the hemorroidas and diarreia in the Pará States (Flor, 2012; Leão et al., 2007) and wound healing in Minas Gerais (Silva et al., 2010). During the collected samples of *Pfaffia glomerata* in Santos-SP city we also obtained the information from the local population that the leaves of this plant is often prepared with ethanol solution by treatment for gastric pain. Moreover, our investigation group showed an significative antiulcerogenic properties in the HCl-ethanol gastric ulcers induced in mice when administered the EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves at dosis of 500 mg/Kg (Mazzeo et al., 2013).

Considering the use of leaves of *Pfaffia glomerata* by traditional medicine to the treatment of the gastric pain and our positive results with the EtOH 70% extract obtained in the HCl-EtOH standart induced protocol gastric ulcers, we performed the phytochemical, antiulcerogenic and toxicology protocols. Attentive also to the global growth of research related to the environmental risk assessment due to the presence of substances contaminating the environment and aiming to develop this work with proposal of sustainability and preservation of the environment, it was also carried out ecotoxicological tests from this extract.

2- Materials and methods

2.1-Drugs and chemicals

The following drugs were used: Carbenoxolone, Gallic acid and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were obtained from Sigma Aldrich, Brazil. Chloroform, ethanol, ethyl acetate and methanol were obtained from Merk KGaA, Darmstadt, Germany. The chemicals used in the buffers and other solutions were all of analytical grade. All drugs and reagents were prepared immediately before use.

2.2- Animals

Male Wistar rats (180-220 g) and mice Swiss (30-40 g) were utilized to the

gastric ulcer protocols. The animals were acclimated at a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a 12h light-dark cycle. Rats and mice had access to Nuvital and water *ad libitum*. All protocols employed were approved by the Unisanta Institutional Animal Care and Use Committee under reference number 002/2012.

2.3- Plant material and preparation of the extracts

The *Pfaffia glomerata* leaves were collected in Santos-SP, Brazil (LAT 23,95417 LONG -46,32566) and authenticated the botanical identity MSc Paulo Salles Penteado and a voucher specimen under number 6131 was deposited at the Herbarium from Santa Cecília University (HUSC). The leaves were dried for two days at 40°C and powdered. The extract was prepared according Brasil, 2011, by maceration for 2 hours and percolation for 24 hours with ethanol 70% at proportion of 1:5 (w/v). The hydroalcoholic extract were submitted to the rotary evaporator and obtained the Ethanolic 70% (EtOH 70) from *Pfaffia glomerata* leaves.

2.4- Pharmacological Assays

2.4.1- Gastric ulcer induced by absolute ethanol

The rats were divided into five treatment groups ($n = 08$) and fasted for 12 h prior to receiving an oral dose of the vehicle (saline 10 mL.kg^{-1}), carbenoxolone (100 mg.kg^{-1}) and EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves ($62.5, 125, 250, 500 \text{ mg.kg}^{-1}$). After 60 min, all groups were orally treated with 1 mL of absolute ethanol for the gastric ulcer induction. One hour later, animals were killed and their stomachs excised. The incision into each stomach was performed along the greater curvature and examined for linear hemorrhagic lesions in the glandular region (Morimoto et al., 1991). Then, the stomachs were photographed and the extent of the lesions was measured by ulcerative lesion area (U.L.A.) in mm^2 by the program AVSoft BioView Spectras[®].

2.4.2- Determination of mucus in gastric content

This assay was performed following the methodology described previously by Sun et al. (1991). Mice fasted for 24h, under anesthesia, the abdomen incised and the pylorus ligated. The EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves at a dose of 500 mg/kg (10 mL.kg^{-1} , *p.o.*) ($n = 6$); Carbenoxolone 100 mg/kg (10 mL.kg^{-1} , *p.o.*) ($n = 6$) as positive control or 0.9% saline (10 mL.kg^{-1} , *p.o.*) (negative control) ($n = 6$) were

administered intraduodenally (*i.d.*) after the pylorus ligation. The animals were killed 4h after the drug treatments. The stomach content was immersed in 10 ml 0.02% alcian blue in 0.16 M sucrose – 0.05 M sodium acetate, pH 5.8, and incubated for 24 h at 20°C. The alcian blue binding extract was centrifuged at 2000× *g* for 10 min. The absorbance of the supernatant was measured at 615 nm using a light spectrophotometer U/2000 (Hitachi, Japan). The free mucous in the gastric content was calculated from the amount of alcian blue binding (mg/wet tissue [g]).

2.4.3- Evaluation of the mechanisms involving the antiulcerogenic activity

Qualitative 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay on Thin Layer Chromatography (TLC)

Chemical constituents of the extracts were analyzed by (TLC) using aluminium-backed TLC plates (Merck, silica gel 60 F254). The TLC plates were developed with chloroform:ethyl acetate: methanol: water (15:40:22:9; v/v/v/v) (Kotze and Eloff, 2002). Development of the chromatograms was in a closed tank in which the atmosphere had been saturated with the eluent vapour by lining the tank with filter paper wetted with the eluent. The plates were dried in the fumehood. To detect antioxidant activity, chromatograms were sprayed with 0.2%, 2,2, diphenyl- 2-picrylhydrazyl (Sigma®)(DPPH) in methanol, as an indicator (Deby and Margotteaux, 1970). The presence of antioxidant compounds was detected by yellow spots against a purple background on TLC plates sprayed with 0.2% DPPH in methanol.

2.4.4- Determination of Total Phenols by Folin-Ciocalteu Method

The concentration of total phenols from EtOH 70% *Pfaffia glomerata* leaves was determined with Folin-Ciocalteu reagent following the colorimetric method adapted by Huang and co-workers (Huang et al., 2005). Measurements were carried out in triplicate, and calculations were based on a calibration curve obtained with gallic acid. The levels of total phenols were expressed as milligrams of gallic acid (GAE) equivalents per gram of weight (mg GAE.g⁻¹).

2.5- Phytochemical Analysis

2.5.1- HPLC-UV-DAD

HPLC was performed in a chromatograph analytical (gradient quaternary,

model PU-2089 Jasco) coupled to a diodearray detector (DAD) (model MD-2010, Jasco). Separations were carried out on a Luna 2 RP-18 column (250 × 4.6 mm-i.d., 5 µm) (Phenomenex) with precolumn (4 × 3 mm i.d., Phenomenex). Two solvent systems were used. Solvent A consisted of water with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and solvent B, acetonitrile at a flow rate 1.0 mL.min⁻¹, starting with 5% of B subsequently generated gradient to reach 100% B in 60 min. EZChrom Elite Software Client/Server version 3.1.7 (Chromatec) was used during the chromatographic data acquisition and analysis.

2.5.2- LC-IT-MS/MS

HPLC separations were carried out on Sinergy Hidro (250 x 10 mm i.d.; 4 µm) column. Two solvent systems were used, Solvent A consisted of water with 0.1M formic acid and solvent B, methanol. MS analysis and fragmentation experiments were performed on LCQ Deca MS (ESI-IT-MS) (Thermo Finnigan) equipped with an ESI source and an ion trap mass analyzer, which were controlled by the LCQ navigator software. The MS was operated in the positive and negative ion mode in the range m/z 200–2000. Xcalibur (version 1.3, Thermo Finnigan) was used during the data acquisition and analysis of MS.

2.6- Acute toxicity assay

For an acute toxicity test by single dose, the animals were divided into two groups (n = 10) for each group. The negative control group received 0.9% saline (10 mL.kg⁻¹, *p.o.*) and the test group received EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves at a dose of 5 g.kg⁻¹, *p.o.* diluted in 0.9% saline at a concentration of 10 mL.kg⁻¹. Water and food consumption, the mass of waste products (feces and urine), and the body weight of the animals were assessed daily for seven days. At the end of the experimental protocol, the animals were sacrificed and their organs (heart, lung, liver and kidney) were macroscopically analysis (Brito, 1994).

2.7- Ecotoxicity assays

2.7.1- Acute assays with *Daphnia similis* organism

This assay was performed according to US EPA (2002) guideline, with adaptations proposed by the Brazilian standardization protocol (ABNT, 2004). According to this protocol, neonates of *Daphnia similis* were exposed to several

concentrations of safflower oil diluted in 0.9% saline for a period of 48h. Four replicates for each concentration and controls were employed, with five organisms being added to each replicate, giving a total of twenty organisms per test concentration. At the end of 48h of exposure, immobility and mortality were analyzed and the maximal effective concentration (EC50) was calculated using the Trimmed Spearman-Kärber statistical method.

3- Results and discussion

Medicinal plants have been used for the treatment of various diseases and are becoming an important research area for drug discovery. In our studies based in the ethnopharmacological data we evaluated the EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves (62.5; 125; 250; 500 and 1000 mg/kg, p.o.) in the gastric ulcer induced by absolute ethanol. We obtained that the dosis of 500 mg/Kg showed a significative reduction of Ulcerogenic Lesion Area (ULA) ($***p < 0.001$) when compared to the negative control group (0.9% Saline) (Figure 1). Moreover, we also investigated the pharmacological activity of this extract at dose of 500 mg/Kg (p.o.) in the adherent gastric mucous after pylorus ligation on mice. On this experiment we observed the significant increases of mucous amount ($***p < 0.001$) in comparison to the control values. These results demonstrated the cytoprotection properties of the extract evaluated (Figure 2).

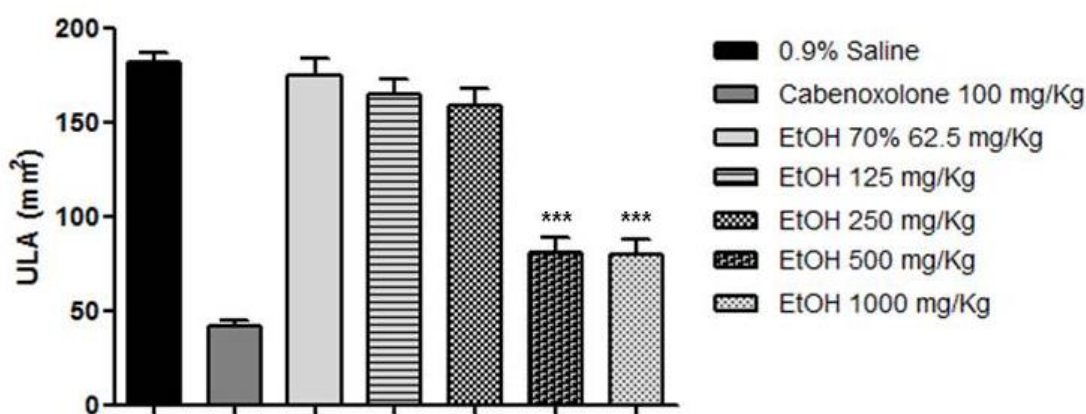


Figure 1: Effects of EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves and the control groups when submitted to the gastric ulcer induced by absolute ethanol on rats. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. ANOVA followed by Dunnet's test with $***p < 0.001$

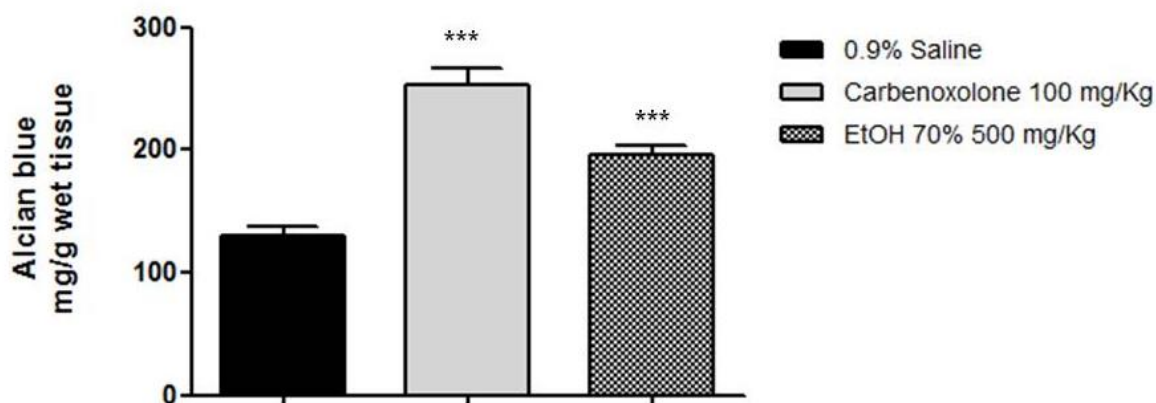


Figure 2: Effects of 0.9% saline, carbenoxolone and EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves on adherent gastric mucous after pylorus ligation on mice. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. ANOVA followed by Dunnett's test. (***) $p < 0.001$ compared to the 0.9% saline control group).

To the evaluated complementary mechanisms involving of the antiulcerogenic activity of EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves, we performed the qualitative analysis of an antioxidant activity using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay on TLC with the gallic acid were used with the positive control. The TLC-DPPH screening method suggested the existence of substances with antioxidant activity in the extracts tested, as indicated by chromatographic spots of yellow (R_f values of 0.37 and 0.81) on purple background that resulted from the reduction of DPPH radical (Figure 3).

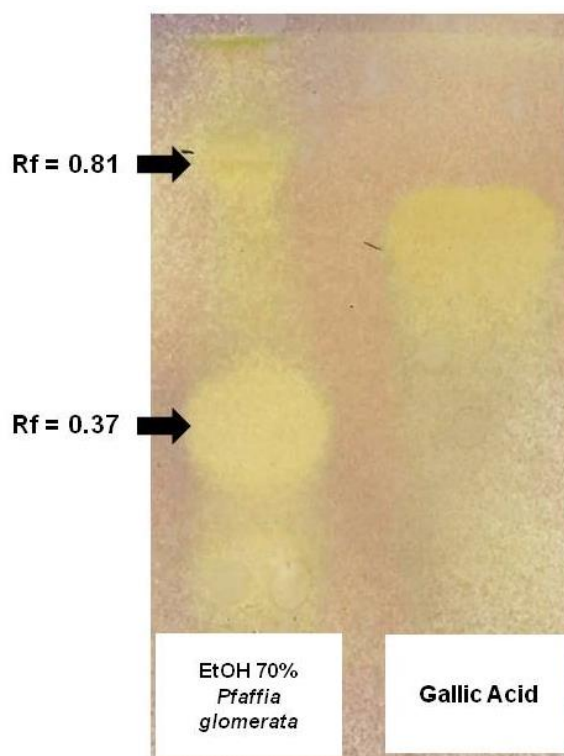


Figure 3: EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves (left) and Gallic acid with positive control (right) separated on a TLC plate and derivatized with DPPH.

Considering the many secondary natural metabolites available from plants with antioxidant activity, phenolic compounds play a particularly important role in human health as they occur in significant amounts in many fruits, vegetables and medicinal plants. Thus, after antioxidant activities showed by EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves, we evaluated the total phenolic content of this extracts measured by using the Folin-Ciocalteu reagent. The extract presented a phenol contents and the results are expressed as gallic acid equivalents per g of ethanolic extract of *Pfaffia glomerata* (Table 1)

Table 1: Determination of Total Phenols by Folin-Ciocalteu Method on EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves.

Treatments	Folin-Ciocalteu ^{a,b} (mg of GAE.g ⁻¹)
EtOH 70% <i>Pfaffia glomerata</i> leaves	152.3 ± 7.6

^aMean ± standard deviation of triplicate assays.

^bTotal phenolics data expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram (mg of GAE.g⁻¹).

The phytochemical analysis of EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves indicated the presence of flavonoids and phytosteroids, and the HPLC analysis confirmed the presence of kaempferol (an flavonol) and β -ecdysone (an phytosterol) as the main secondary metabolites (Figures 4, 5, 6, 7 and Table 2). The structural characteristics of each peak was determined by comparing its correspondent UV spectrum with those UV spectra available at the HPLC computer library (Carmona et al., 2007; Rostagno et al., 2014; www.massbank.jp).

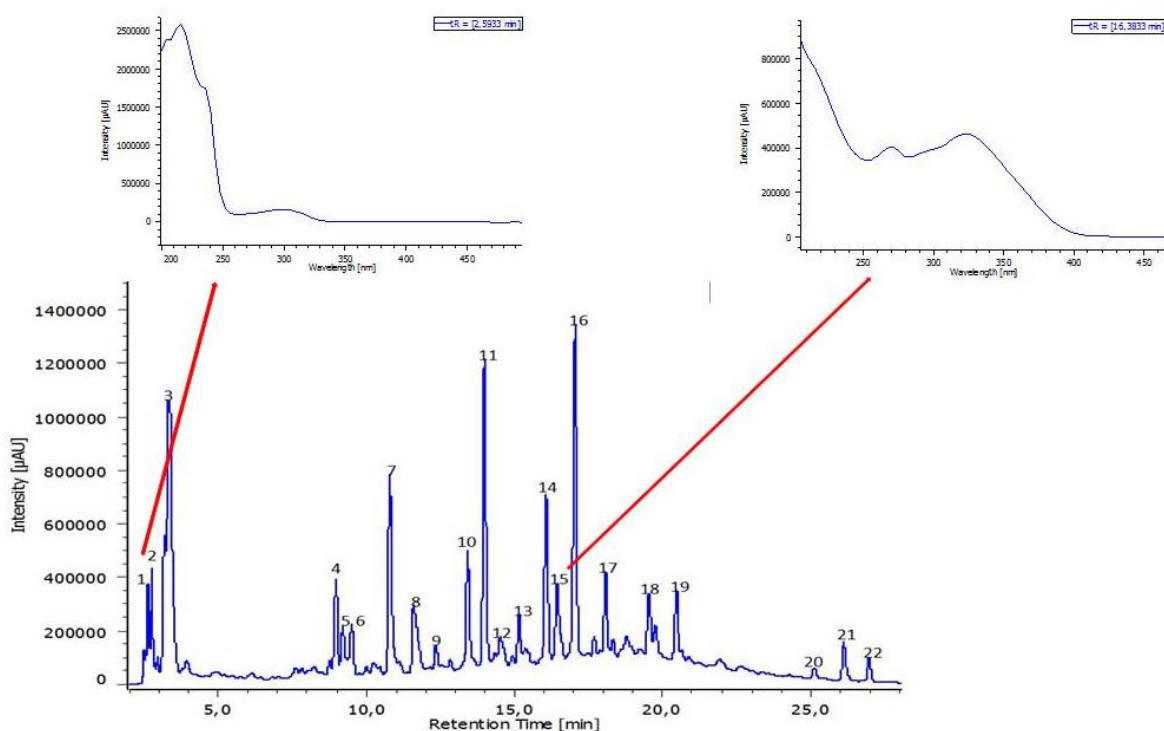


Figure 4: HPLC profile of the extract of *Pfaffia glomerata* leaves recorded at 250 nm. UV absorption spectrum for peaks 1 and 15 (identified as β -ecdysone and kaempferol, respectively) is shown in detail (RT 2,5933 and 16,3833min)

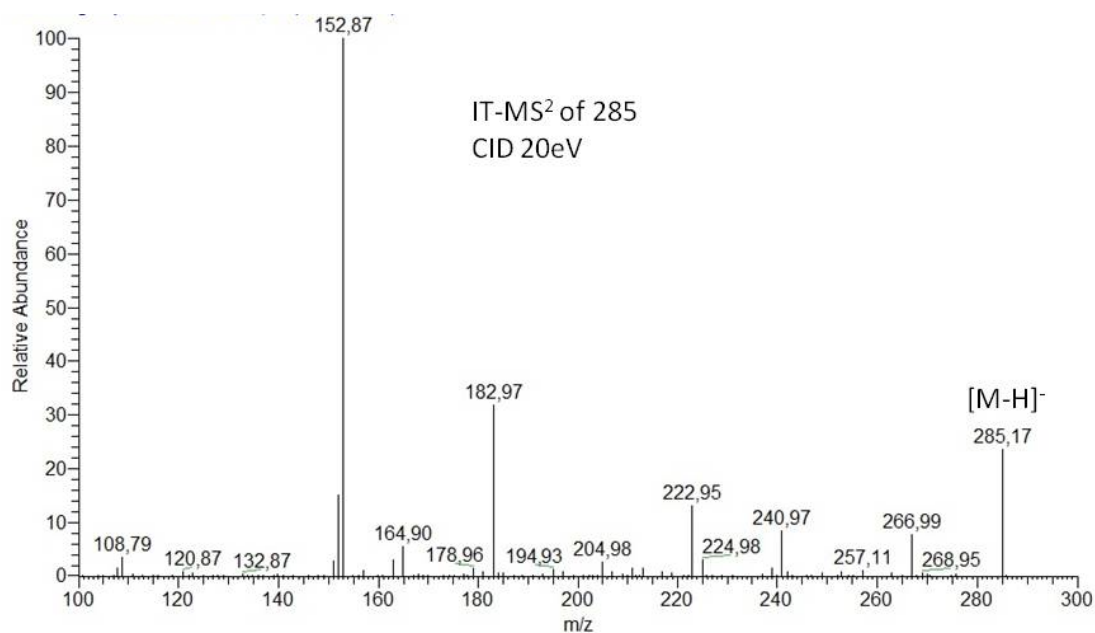
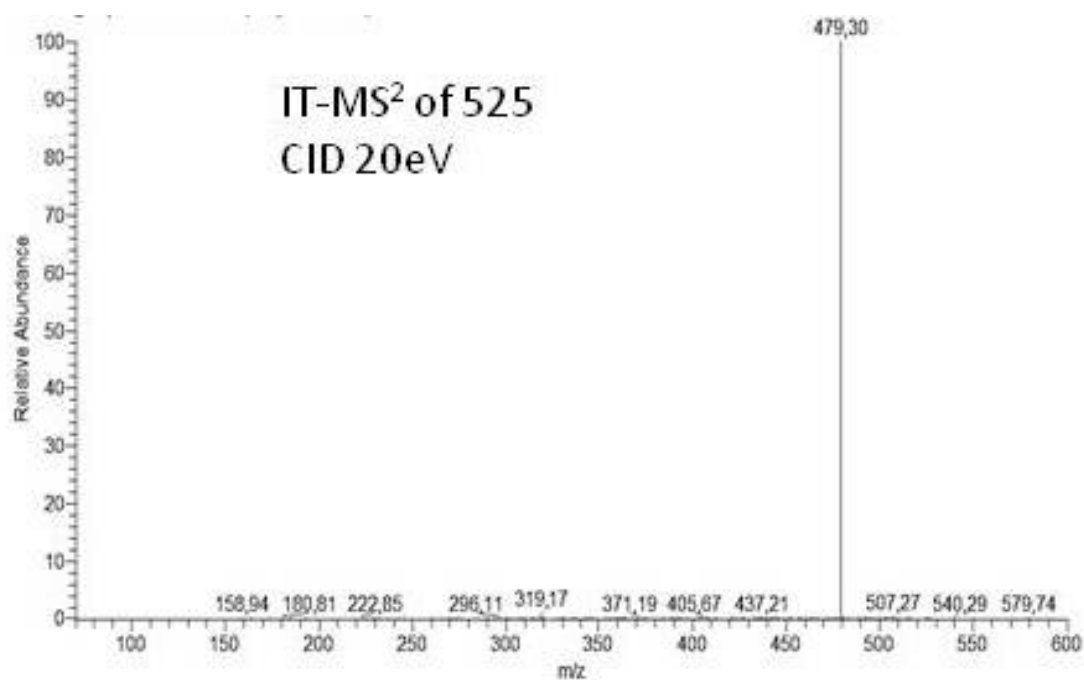


Figure 5: IT-MS² analysis for the compound identified as Kaempferol (MW 286) in negative ion mode [M-H]⁻



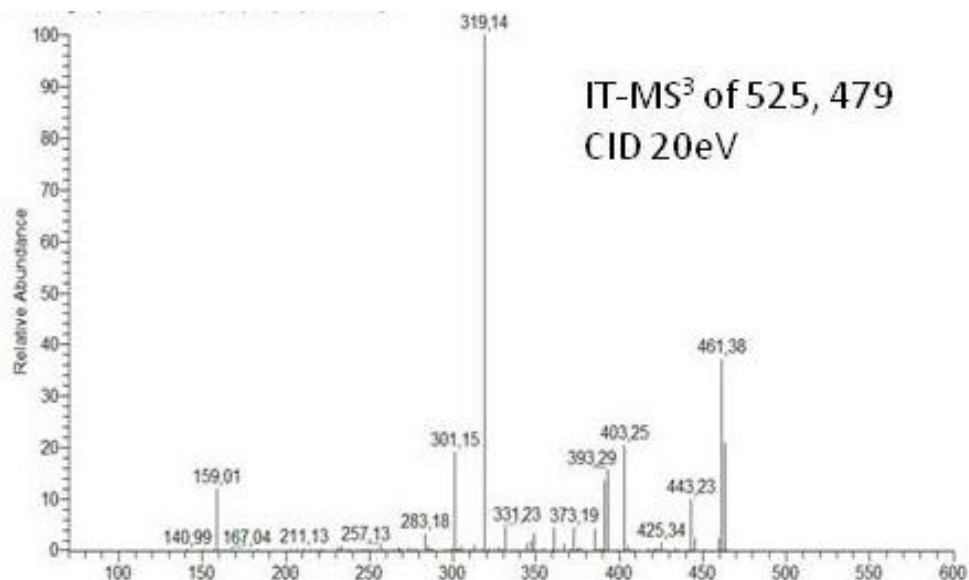


Figure 6: MS² (left) and MS³ (right) analysis for the compound identified as β -ecdysone in negative ion mode. β -ecdysone exhibited the adduct ion $[M+HCOO]^-$ at m/z 525 in the negative mode, due to the addition of 0.1% formic acid in the mobile phase (Felipe et al, 2014).

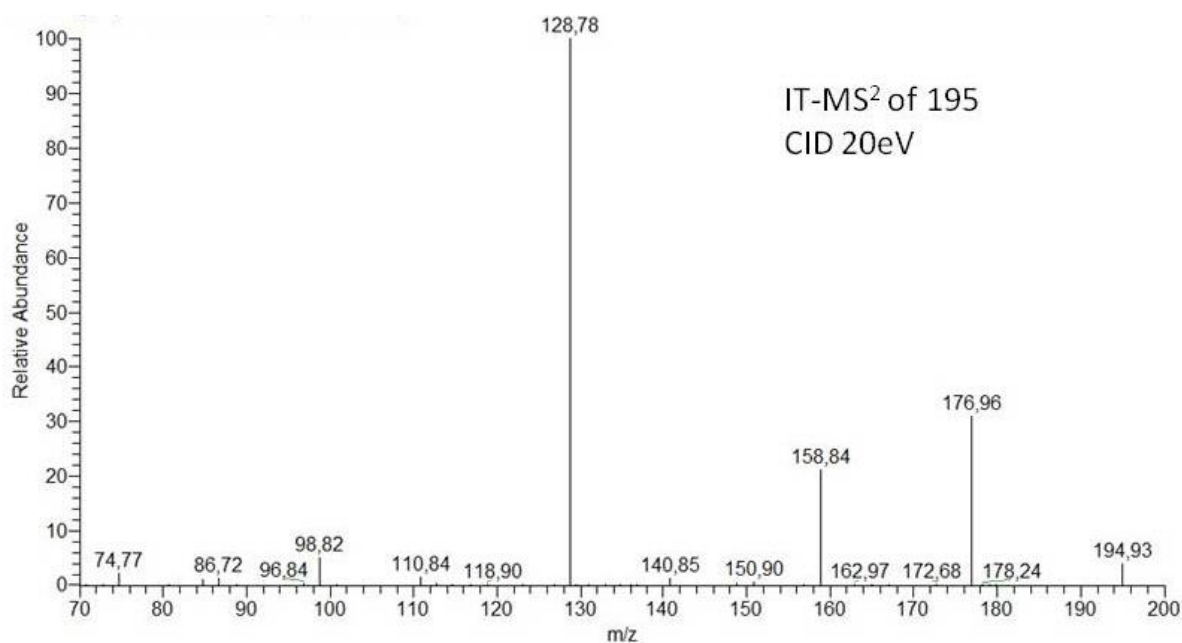


Figure 7: MS² analysis for the compound identified as Gluconic acid (MW 196) $[M-H]^-$

Table 2: Identification of substances obtained in the EtOH 70% from *Pfaffia*

glomerata leaves by LC-IT-MS/MS in negative mode

[M-H] ⁻	MS ⁿ ions	Identification	Reference
195	176,96; 158,84; 128,78; 98,82; 74,77	Gluconic acid	Felipe et al., 2014
285	266,69; 240,97; 222,95; 182,97; 152,87; 108,79	kaempferol	Mass Bank, 2015
525 [M+HCOO] ⁻	479,00; 461,38,; 319,14; 301,15; 159,01	β-ecdysone	Felipe et al., 2014

Flavonoids such as kaempferol are among the cytoprotective materials for which anti-ulcerogenic efficacy has been extensively confirmed. They protect the gastric mucosa against a variety of ulcerogenic agents via several mechanisms of action, mainly free-radical scavenging and antioxidant properties, increased mucus production, antisecretory action, and inhibition of the *Helicobacter pylori* growth. (Sumbul et al., 2011). Thus, the antiulcerogenic, cytoprotective, antioxidant and total phenols showed in this work (Figures 1, 2, 3 and Table 2) can be attributed to the kaempferol presents in the EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves.

Freire et al., 2005, demonstrated in your investigation that butanolic extract obtained from *Pfaffia glomerata* roots presented an phytosteroid 20-hydroxyecdysone and this extract and the isolated 20-hydroxyecdysone compound demonstrated an antioxidant activities. In our phytochemical analysis the phytosteroid β-ecdysone it is present in the EtOH 70% extract from *Pfaffia glomerata* leaves and this compound also can be responsible for antioxidant, antiulcerogenic and cytoprotective properties for the evaluated extract.

Given the positive results obtained in the pharmacological assays using the EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves we also performed an acute toxicity assay (single dose at 5 g.Kg⁻¹, p.o.) to determine the probable toxicological activity of the extract evaluated. In this case, the oral administration of the extract did not have any effect on mortality, body weight, water consumption, feeding or excreta volume.

A growing database reports that human and veterinary pharmaceutical residues are present in aquatic and terrestrial environments worldwide. Evidence

indicates that nontarget organisms may be chronically exposed to low (ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$ range) concentrations of a variety of pharmaceuticals, but that even these concentrations may result in significant biological effects (Fabri, 2015).

Considering the probability of environmental risk of EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves when discharges into aquatic environments, we performed an toxicity assay using the freshwater cladoceran *Daphnia similis*. The EC50 calculated by Trimmed Spearman Karber was 180.0 mg.L^{-1} (Table 3). The European directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances classifies the substances according to accurate results of toxicity (values of EC50, IC50), namely, substances with $\text{EC}_{50} < 0.1 \text{ mg/l}$ are classified as “extremely toxic”; between 0.1 and 1 mg.L^{-1} are classified as “very toxic”; between 1 and 10 mg.L^{-1} are classified as “toxic”; between 10 and 100 mg.L^{-1} are classified as “harmful”; and higher than 100 mg.L^{-1} are considered to be “non-toxic” (CEC, 1996). Based on this directive, the extract evaluated can be classified as a “non-toxic” substance to the environment.

Table 3: Results of acute ecotoxicity assay on *Daphnia similis* after 48 h of exposure. Immobility and mortality were analyzed and the maximal effective concentration (EC50) was calculated using the Trimmed Spearman Karber statistical method

Nãotóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamente tóxico
CE50 > 100	CE50 entre 10 e 100	CE50 entre 1,0 e 10	CE50 entre 0,1 e 1,0	CE50 < 0,1
mg.L^{-1}	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}	mg.L^{-1}

Based on the data reported we can conclude that EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves shows significant antiulcer, cytoprotective and antioxidant activities when administered at a dose of 500 mg.kg^{-1} orally. Its pharmacological activities may be attributed to the presence of kaempferol and β -ecdysone. Likewise, the extract at a dose of 5 g.kg^{-1} had no toxic effects on rodent models and according EC50 obtained from *Daphnia similis* protocols The European directive 93/67/EEC classified the EtOH 70% evaluated as “non-toxic” substance. We conclude that this study provided important data regarding the pharmacological, chemical, toxicological and environmental effects of EtOH 70% from *Pfaffia glomerata* leaves.

Acknowledgment

CAPES (Higher Education Personnel Improvement Coordination)

References

Abourehab M.A.; Khaled A.K.; Sarhan H.A.; Ahmed O.A.. Evaluation of combined famotidine with quercetin for the treatment of peptic ulcer: in vivo animal study. **Drug Design, Development and Therapy** 2015;9 2159–2169

Arab, H.; Salama S.A.; Omar H.A.; Arafa E.A.; Maghrabi I.A. Diosmin. **Protects against Ethanol-Induced Gastric Injury in Rats: Novel Anti-Ulcer Actions Hany.**

Biswajit Podder,^a Kyoung Seob Song,^b Ho-Yeon Song,^a and Yong-Sik Kim*, **A Cytoprotective Effect of Kaempferol** on Paraquat-Exposed BEAS-2B Cells via

Brito, A.R.M.S., 1994. **Manual de ensaios toxicologicos *in vivo***. 1^a ed., Campinas, Editora Unicamp. 116 p.

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

Fabbri E¹.Ann N Y Acad Sci. 2015 Mar; 1340:20-8. doi: 10.1111/ nyas.12605. Epub 2014 Dec 31. Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna.

Felipe et al., 2014. **Molecules** 2014, 19, 15720-15734; doi: 10.3390/ molecules 191015720

JF de Souza Daniel¹, KZ Alves², D da Silva Jacques², PV da Silva e Souza², MG de Carvalho¹, RB Freire², DT Ferreira³, M FI Freire⁴. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**. Year : 2005 | Volume : 37 | Issue : 3 | Page : 174-178

Luiz-Ferreira A.; Cola M; Barbastefano V; de-Faria F.M.; de Almeida A.B.A.; Farias-Silva E.; Calvo T.R.; Hiruma-Lima C.A.; Vilegas W.; Souza-Brito A.R.M. Healing, Antioxidant and Cytoprotective Properties of *Indigofera truxillensis* in Different Models of Gastric Ulcer in Rats. **Int. J. Mol. Sci.** 2012, 13, 14973-14991.

Mass Bank (2015). www.massbank.jp (acesso em 10/06/2-15).

M. Carmona et al. / **Food Chemistry** 100 (2007) 445–450 for kaempferol.

Modulating Expression of MUC5AC . **Biol. Pharm. Bull.** 37(9) 1486–1494 (2014) Vol. 37, No. 9 © 2014 The Pharmaceutical Society of Japan Regular Article

Morales J.; Gunther G.; Zanoeco A.L.; Lemp E.. Singlet Oxygen Reactions with Flavonoids. A Theoretical – Experimental Study. **PLoS ONE**, July 2012, Volume 7, Issue 7, e40548

Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology** 57, 495–505.

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0122417 March 30, 2015.

Rostagno et al. : **Anal. Methods**, 2014, 6, 2452 for beta-ecdysone.

Sumbul, S., Ahmad, M. A., Mohd., A., & Mohd., A. (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, 3(3), 361–367. doi:10.4103/0975-7406.84437.

Wang, Y.C.. Medicinal plant activity on Helicobacter pylori related diseases. **World J Gastroenterol** 2014 August 14; 20(30): 10368-10382