

Avaliação da Atividade Antiulcerogênica e Ecotoxicológica do Extrato Hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae)

Giovanna Christina Costa da Silva Mazzeo¹, Fernando Sanzi Cortez², Fábio Hermes Pusceddu², Aldo Ramos Santos^{1,2}, Luciana Lopes Guimarães^{1,3}, Fabiano Pereira do Amaral⁴, Marcos Paulo de Oliveira Silva³, Walber Toma^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos – Universidade Santa Cecília (UNISANTA)

²Laboratório de Ecotoxicologia – Universidade Santa Cecília (UNISANTA)

³Faculdade de Educação e Farmácia – Universidade Santa Cecília (UNISANTA)

⁴Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Campus Experimental do Litoral Paulista (UNESP)

Resumo

Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), conhecida popularmente como "Ginseng Brasileiro" trata-se de uma erva encontrada em todo território brasileiro. Após revisão podem-se detectar estudos farmacológicos que demonstram atividade antiulcerogênica a partir da raiz de Ginseng. No entanto, não existem relatos científicos a cerca desta atividade a partir das folhas da referida planta. Após obtenção do Extrato Etanólico 70% (EtOH 70) a partir das folhas de *P. glomerata* e aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Santa Cecília sob protocolo número 002/2012, foi realizado ensaio no modelo de úlcera gástrica induzida por HCl-Etanol em camundongos. EtOH 70 demonstra atividade antiulcerogênica na dose de 500 mg.Kg⁻¹ (**p<0,01) quando administrados pela via oral. Após exposição de EtOH 70 ao organismo aquático *Daphnia similis* foram obtidos valores de EC50 de 180,0 mg.L⁻¹, sendo caracterizada conforme diretiva 93/67/ECC da União Européia como substância não tóxica. Tais dados servem como suporte para o desenvolvimento de novos ensaios para que, em futuro próximo, EtOH 70 possa ser utilizado como terapia complementar e alternativa para o tratamento das úlceras gástricas, tendo inclusive baixos riscos de danos ao meio ambiente.

Palavras-chave: *Pfaffia glomerata*; Ginseng, Atividade Antiulcerogênica; Avaliação Ecotoxicológica

Evaluation of Antiulcerogenic and Ecotoxicological Activities of 70% Hydroalcoholic Extract Obtained from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae) leaves.

Abstract

Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae) , popularly known as " Brazilian Ginseng ", it is a small tree , found throughout Brazil . After review can be detected pharmacological studies demonstrate antiulcer activity from the ginseng root. However, there is no scientific reports about this activity from the leaves of that plant. After obtaining the EtOH 70 from the leaves of *P. glomerata* and approval by the Ethics Committee on Animal Research from Santa Cecília University under protocol number 002/2012 , testing was conducted on the model of gastric ulcer induced by HCl - ethanol in mice . EtOH 70 shows antiulcer activity at a dose of 500 mg.Kg⁻¹ (** p <0.01) when administered orally. After exposure of the aquatic organism EtOH 70 *Daphnia similis* were obtained EC50 values of

180.0 mg L⁻¹, being characterized as directive 93/67/ECC EU as non-toxic substance . Such data serve as a support for the development of new assays that in the near future, EtOH 70 can be used as an alternative and complementary therapy for the treatment of gastric ulcers , and even lower risk of harm to the environment.

Keywords: *Pfaffia glomerata* ; Ginseng , Antiulcerogenic Activity ; Ecotoxicological

INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica corresponde a uma das principais patologias do trato gastrointestinal, sendo responsável por acometer cerca de 10% da população mundial. Estresse, tabagismo, o uso abusivo de Antiinflamatórios Não-Esteroidais, o consumo de álcool e a presença da bactéria *Helicobacter pylori* (*Hp*), são elementos que estão associados ao aumento da incidência da patologia (MALFERTHEINER et al., 2009).

Dentre as principais linhas farmacológicas objetivando o tratamento da patologia da úlcera gástrica encontram-se os Antagonistas de Receptor H₂ e os Inibidores da Bomba Protônica. No entanto, diversos são os trabalhos relatando que o uso contínuo destas classes de fármacos tem desencadeado problemas à saúde humana (ARAKAWA et al., 2012). De acordo com FENT et.al, 2006, os fármacos antiulcerogênicos encontram-se entre os 15 fármacos mais consumidos em toda a Europa. Apesar do Brasil não possuir tais dados epidemiológicos, acredita-se que tais fármacos trilhem a mesma linha de consumo. Tais dados chamam atenção para os aspectos ecotoxicológicos e os riscos ambientais. Deste modo, fica evidente a necessidade de estudos de novas moléculas ativas e menos tóxicas que possam promover melhora no quadro de pacientes portadores da úlcera gástrica. Neste sentido ganham destaque as plantas medicinais como importante fonte na obtenção de novas propostas de substâncias farmacologicamente ativas.

O Brasil possui a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas o que corresponde a quase 19% da flora mundial (MARCELLI, 1998), sendo portanto, grande fonte para obtenção de novos recursos terapêuticos. Dentre as mais variadas espécies presentes em território nacional, destaca-se no presente trabalho *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Popularmente conhecida como “Ginseng Brasileiro”, trata-se de espécie com ampla utilização terapêutica de suas raízes (SMITH & DOWNS, 1972). No entanto, não existem trabalhos a cerca de extratos obtidos a partir das folhas desta espécie, fato este que torna a referida espécie fonte de estudo do presente trabalho.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos avaliar a atividade antiulcerogênia e ecotoxicológica do Extrato Etanólico 70% (EtOH 70%) obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e processo extrativo

As folhas de *P. glomerata* foram coletadas na cidade do Santos-SP (LAT 23,95417 LONG -46,32566), identificadas pelo Prof. Ms Paulo Sampaio sendo registrada a exsicata (número 6131). Em seguida, estas foram secas em estufa a 40°C por 48 h trituradas e em

seguida maceradas por 2 hs e percoladas (24 hs). Foi utilizado como solvente Etanol 70% na proporção de 1:5 (p/v). Ao final foi obtido o Extrato Etanólico 70% (EtOH 70) (BRASIL, 2011).

Animais

Para o ensaio farmacológico foram utilizados camundongos Swiss albinos machos com peso médio entre 30-45 g. Os mesmos foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do núcleo de pesquisas (CEP) da Universidade Santa Cecília (UNISANTA) sob protocolo número 002/2012.

Úlcera Gástrica Induzida pela Administração de HCl-Etanol em Camundongos

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 (v.o.). Uma hora após a administração dos tratamentos a lesão gástrica foi induzida nos animais pela administração (v.o.) de uma solução de HCl 150 mM em etanol 98%. Após uma hora os animais foram sacrificados e os estômagos retirados, para posterior contagem das lesões, de acordo com SZELENYI & THIEMER, 1978.

Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* para avaliação dos efeitos agudos da tintura do ginseng foram realizados de acordo com a ABNT NBR 12713 (ABNT, 2009). Foram avaliadas 10 concentrações diferentes de EtOH 70 juntamente com água de diluição. Foram adicionados 20 organismos distribuídos em 4 réplicas, para cada concentração, e observados os efeitos após um período de 48 h de exposição. Os ensaios foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16 horas luz / 8 horas escuro).

Análise Estatística

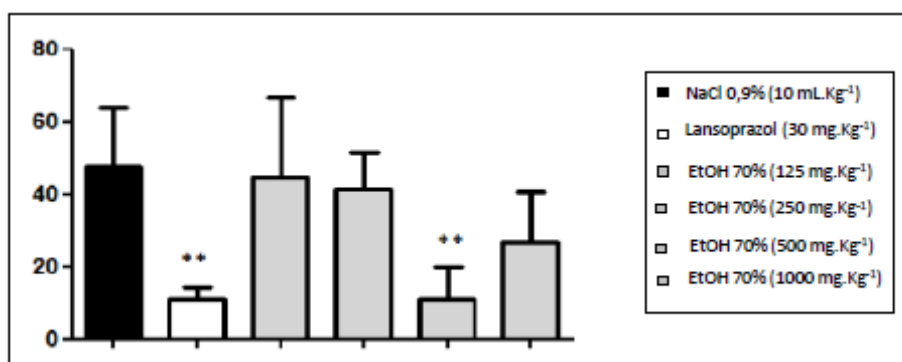
Os resultados obtidos através do protocolo de indução de lesões gástricas foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$ (Software Graph Pad Prisma[®] 3.0). Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade foram calculados através do Trimmed Spearman Karber.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocolos de experimentação animal possuem importante papel no estudo e desenvolvimento de novas moléculas com propriedades farmacológicas. Um dos modelos animais mais utilizados para avaliação da atividade antiulcerogênica trata-se do protocolo de úlcera gástrica induzida pela administração de solução de HCl-etanol. No presente trabalho EtOH 70 foi avaliado no referido modelo experimental em 4 diferentes doses (125, 250, 500 e

1000 mg.Kg⁻¹, v.o.). Pode-se observar que a dose de 500 mg.Kg⁻¹ apresentou redução das lesões ulcerogênicas (**p<0,01), quando comparado ao grupo controle (Figura 1).

Figura 1: Índice de Lesões Ulcerogênicas (ILU) induzidas por HCl-Etanol em camundongos pré-tratados com o Extrato Etanólico 70% (EtOH 70%) obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata*



Os resultados apresentados demonstram o Índice de Lesões Ulcerogênicas (ILU-mm²) expressos na forma de média ± desvio padrão. Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste posteriori de Dunnett com **p<0,01.

LEE et al., 2010, relata que lesões ulcerogênicas induzidas pela administração de HCl-Etanol estão relacionadas ao processo de peroxidação lipídica na mucosa gástrica, que por sua vez, possui significativa participação na patogênese das úlceras gástricas. JÚNIOR et al., 2013, também defende a mesma proposta em seus trabalhos, associando também tais lesões gástricas ao processo de estresse oxidativo. Deste modo, tem-se como primeira hipótese a proposta de que EtOH 70 possa demonstrar atividade antiulcerogênica através de mecanismos antioxidantes.

Objetivando avaliar o potencial risco ambiental de EtOH 70% de *Pfaffia glomerata*, foram realizados ensaios através do protocolo de *Daphnia similis*. Os resultados demonstram valor de CE50 média de 180,0 mg.L⁻¹ sendo que, segundo diretiva 93/67/ECC da União Européia, tal composto classificado como uma substância “não tóxica”. (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação do risco ecotoxicológico após exposição de *Daphnia similis* ao extrato obtido a partir da tintura de *Pfaffia glomerata* (EtOH 70%) baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia

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

Tais dados aumentam a relevância do presente trabalho, tendo em vista que, esta pode ser em futuro próximo provável terapia complementar e alternativa para o tratamento da úlcera gástrica, tendo como vantagem adicional o baixo risco de danos ao meio ambiente.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente projeto, pode-se concluir que o extrato obtido (EtOH 70%) a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* apresenta significativa atividade antiulcerogênica quando administrado na dosagem de 500 mg.Kg⁻¹ pela via oral. Além disso, EtOH 70 demonstra ser não tóxico no modelo de ensaio ecotoxicológico por *Daphnia similis*. Tais dados são relevantes à medida que poderão servir como referência para a sequência de análises farmacológicas e ecotoxicológicas a fim de que em futuro próximo as folhas de tal planta possam fazer parte da lista de compostos indicados para o tratamento das úlceras gástricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAKAWA T, WATANABE T, TANIGAWA T, TOMINAGA K, FUJIWARA Y, MORIMOTO K. (2012). Quality of ulcer healing in gastrointestinal tract: Its pathophysiology and clinical relevance. **World J Gastroenterol** 18(35): 4811–4822.

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

FENT K, WESTON AA, Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquat Toxicol** 76: 122–159.

FIGUEIREDO F.R.S.D.N., NASCIMENTO E.P., MONTEIRO A.B., AMARO E.N., COSTA J.G.M., COUTINHO H.D.M., DE MENEZES I.R.A., KERNTOPF M.R. (2013). Antiulcerogenic Activity of the Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1-10.

JÚNIOR F.E.B., DE OLIVEIRA D.R., BENTO E.B., LEITE L.H.I., SOUZA D.O., SIEBRA A.A., SAMPAIO R.S., MARTINS A.O.P.B., RAMOS A.G.B., TINTINO S.R., LACERDANETO L.J., FIGUEIREDO P.R.L., OLIVEIRA L.R., RODRIGUES C.K.S., SALES V.S., LEE B., NUGROHO A., BACHRI M.S., CHOI J., LEE K.R., CHOI J.S., KIM W.B., LEE K.T., LEE J.D., PARK H.J. (2020). Anti-ulcerogenic Effect and HPLC Analysis of the Caffeoylquinic Acid-Rich Extract from *Ligularia stenocephala*. **Biol. Pharm. Bull.** 33(3) 493-497.

MALFERTHEINER P, CHAN FKL, MCCOLL KEL (2009). Peptic ulcer disease. **Lancet** 374: 1449–1461.

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.

OYAGI A., OGAWA K., KAKINO M., HARA H. (2010). Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. **BMC Complement. Altern. Med.** Aug 18, 10-45.

SMITH, L.B., DOWNS, R.J. (1972). **Flora ilustrada catarinense: Amarantáceas**. Itajaí : UFSC. 110p.

SZELENYI I., THIEMER K. (1978). Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch Toxicol.** Oct 13;41(1):99-105.