



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* DA ISOCUMARINA PAEPALANTINA  
OBTIDA DE *PAEPALANTHUS LATIPES* SILV.**

**JOÃO PAULO LOUREIRO DAMASCENO**

**VITÓRIA**

**2016**



João Paulo Loureiro Damasceno

**ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* DA ISOCUMARINA PAEPALANTINA  
OBTIDA DE *PAEPALANTHUS LATIPES* SILV.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa

Coorientador: Cristiane dos Santos Giuberti

Vitória

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D155e Damasceno, João Paulo Loureiro, 1984 -  
Estudo de solubilidade e das atividades antioxidante e anti-  
*Helicobacter pylori* da isocumarina paepalantina obtida de  
*Paepalanthus latipes* Silv. / João Paulo Loureiro Damasceno –  
2016.  
83 f. : il.

Orientador: Rodrigo Rezende Kitagawa.  
Coorientador: Cristiane dos Santos Giuberti.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Solubilidade. 3. Antioxidantes. 4.  
Estresse Oxidativo. I. Kitagawa, Rodrigo Rezende. II. Giuberti,  
Cristiane dos Santos. III. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615

---

João Paulo Loureiro Damasceno

**ESTUDO DE SOLUBILIDADE E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* DA ISOCUMARINA PAEPALANTINA  
OBTIDA DE *PAEPALANTHUS LATIPES* SILV.**

Vitória, 24 de março de 2016

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil/ UNICENTRO**

---

**Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck/ UFES**

---

**Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa (orientador)/ UFES**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais (LTBPN) associado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFES com algumas etapas desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Análises Biomoleculares (LABIOM) e o Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), ambos situados no Centro de Ciências da Saúde da UFES.

Bolsa de pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho aos que estão em busca de cura. Saibam que, por mais que não se saiba quem, quando nem como, existem forças no mundo que trabalham incessantemente em busca de remédio para todos os males.

## **AGRADECIMENTOS**

É nesta breve passagem pela terra que amamos, somos amados, experimentamos novas realidades e deixamos nossa contribuição para as gerações vindouras. O futuro é formado de várias possibilidades, mas é como agimos aqui e agora que vai determinar a qualidade e a intensidade do porvir. E esta contribuição pode ser de várias formas, desde algo que coloque o seu nome registrado na história, até as pequenas vitórias do caráter e da vida diária. E é neste contexto, das pequenas vitórias que fazem toda diferença levando a um futuro de realizações que gostaria de agradecer:

Inicialmente e principalmente a minha mãe, Rosana Loureiro, por todas finitas batalhas e infinitas vitórias e por todo o amor, cujas palavras são insuficientes para descrever.

À verdadeira família que a vida nos traz, Míriam, Lúcia, Junny, Rafael, Pedro, Marcus, Tatiana.

Ao professor e amigo Rodrigo Kitagawa por toda confiança, apoio, aprendizado científico e por realmente fazer a diferença, foi uma satisfação enorme conviver por estes dois anos.

Aos novos amigos, Otalíbio Nunes pela força de caráter, ótima convivência e por dividir comigo o peso de pertencer a primeira turma de mestres em Ciências Farmacêuticas formados pelo programa, ao Augusto Borges pelo bom humor e amizade no dia a dia do laboratório, à Olívia, Rafael, Dayane, Gézylla, Jéssica, Rodolfo, André, Rafaella e demais alunos pela convivência harmoniosa e amizade.

Aos professores do programa de Pós-Graduação pela oportunidade, amizade e aprendizado científico. Aos funcionários do Departamento, pela gentileza e solicitude.

"Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo."

***Chico Xavier***

## RESUMO

*Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa que infecta a mucosa do estômago levando ao surgimento de patologias, tais como gastrite, úlceras pépticas e câncer de estômago, sendo de difícil erradicação. O tratamento padrão nem sempre é bem sucedido em função de efeitos colaterais, altos custos e baixa adesão por parte do paciente, levando a necessidade da busca por novas moléculas mais efetivas contra este microrganismo. Neste contexto, a isocumarina paepalantina, 9,10-diidroxí-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c)-piran-1-ona, isolada dos capítulos de *Paepalanthus bromelioides*, Eriocaulaceae, tem demonstrado em estudos anteriores uma ampla variedade de atividades biológicas como antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica, dos quais se destacam a capacidade antimicrobiana e antioxidante, abrindo portas para a avaliação de seus efeitos sobre a infecção causada por *H. pylori* e modulação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) geradas neste processo. Como é uma molécula pouco estudada, ainda carece de dados sobre sua solubilidade a fim de se encontrar uma alternativa viável ao uso do DMSO considerando a toxicidade do mesmo em cultura celular e sua interferência em testes de atividade antioxidante. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar solventes como alternativas ao uso do DMSO, com validação de metodologia analítica espectrofotométrica própria, a fim de escolher um veículo adequado para ensaios de atividade antioxidante frente a radicais sintéticos (DPPH e ABTS) e espécies reativas de oxigênio (HOCl, OH•, O<sub>2</sub>•-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e nitrogênio (NO•) e de atividade anti-*H. pylori*. Entre os solventes avaliados, propilenoglicol em pH 7,5 foi o solvente de escolha, sendo que os resultados sugerem uma menor interferência nos ensaios se comparado ao DMSO, tornando uma alternativa viável do ponto de vista tecnológico. Os resultados apontam uma forte atividade antioxidante da paepalantina, comparável ao Trolox®. Também foi observado um importante efeito sobre a cultura de *H. pylori* com CIM de 128 µg/ml e CBM de 256 µg/ml e sinergismo de sua sub-MIC com os antibióticos amoxicilina e metronidazol demonstrando possivelmente atuar sobre a permeabilidade da membrana bacteriana e por inibição das *Penicillin-Binding Proteins* (PBPs), devido as alterações morfológicas observadas em *H. pylori* por microscopia eletrônica de varredura, tornando a paepalantina promissora para o desenvolvimento futuro de medicamento para o combate de *H. pylori* e seus males associados.

Palavras chave: paepalantina, *Helicobacter pylori*, solubilidade, antioxidante.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a Gram-negative bacteria that infects the gastric mucosa, causing disorders like gastritis, peptic ulcers and stomach cancer, and which eradication is difficult. The standard treatment is not always successful because of its side effects, high costs and poor patient compliance, leading to the search for new drugs. In this context, the isocoumarin paepalantine, 9,10-dihydroxy-5,7-dimethoxy-1H-naphtho (2,3c) pyran-1-one, isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, has demonstrated a broad range of biological activities such as antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic. Among these, the antimicrobial and antioxidant activities stand out and allow the evaluation of the effects of *H. pylori* infection and the modulation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) involved in this process. The molecule is poorly studied and there are few data in the literature on its solubility, including a viable alternative to the use of DMSO as a solvent, considering its toxicity in cell culture and interference in the antioxidant activity tests. Thus, the goal of this study was to evaluate alternative solvents to DMSO and validate an analytical spectrophotometric method using a suitable solvent for the antioxidant assays of radical scavenging activity (DPPH and ABTS), ROS (HOCl, OH•, O<sub>2</sub>•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), RNS (NO•), and anti-*H. pylori* activity. Among the evaluated solvents, propylene glycol at pH 7.5 was the solvent of choice. The results suggest less interference in the assays compared to DMSO and that it is a viable alternative from a technological point of view. The results show a strong antioxidant activity of paepalantine in comparison to Trolox®. In addition, it was observed a significant effect on *H. pylori* culture with MIC of 128 µg/ml, MBC of 256 µg/ml, and a synergism of its sub-MIC doses with amoxicillin and metronidazole. This demonstrates a possible action on the permeability of bacterial membrane by inhibition of Penicillin-Binding Proteins (PBPs), as observed through morphological changes using scanning electron microscopy. Therefore, paepalantine is promising for the development of drugs to combat *H. pylori* and its associated disorders.

Keywords: paepalantine, *Helicobacter pylori*, solubility, antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Helicobacter pilory</i> , imagem 3D.....	18
<b>Figura 2</b> - Genes de resistência de <i>H. pylori</i> .....	20
<b>Figura 3</b> - Principais medicamentos pertencentes a classe das cumarinas.....	22
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da paepalantina.....	23
<b>Figura 5</b> - Preparo de extratos a partir dos capítulos de <i>P. latipes</i> .....	23
<b>Figura 6</b> - Cromatograma da análise por CLAE para a paepalantina.....	38
<b>Figura 7</b> - Micrografias obtidas por microscopia óptica comum.....	39
<b>Figura 8</b> – Espectro de absorção UV/VIS da paepalantina.....	40
<b>Figura 9</b> - Análise de linearidade.....	41
<b>Figura 10</b> - Resultados do ensaio de precisão.....	41
<b>Figura 11</b> - Estudo de estabilidade.....	42
<b>Figura 12</b> - Resultado de atividade antioxidante frente ao radical DPPH para solventes.....	43
<b>Figura 13</b> - Resultados do ensaio de captura de radical DPPH para a paepalantina.....	43
<b>Figura 14</b> - Efeito na atividade antioxidante da paepalantina solubilizada em propilenoglicol frente ao DPPH em função do tempo de estocagem.....	44
<b>Figura 15</b> - Efeito na atividade antioxidante da paepalantina solubilizada em DMSO frente ao DPPH em função do tempo de estocagem.....	44
<b>Figura 16</b> - Resultados do ensaio de captura do radical ABTS para paepalantina em diferentes solventes e Trolox.....	45
<b>Figura 17</b> - Resultados de atividade antioxidante frente ao radical superóxido para a paepalantina em propilenoglicol e DMSO e para o Trolox.....	46
<b>Figura 18</b> - Efeito do propilenoglicol e o DMSO na captura de HOCl no sistema TNB/HOCl.....	47
<b>Figura 19</b> - Atividade antioxidante frente ao ácido hipocloroso da paepalantina em propilenoglicol e do Trolox.....	47
<b>Figura 20</b> - Resultados de atividade antioxidante frente ao radical hidroxil para o propilenoglicol e o DMSO.....	47
<b>Figura 21</b> - Efeito da paepalantina em diferentes solventes e Trolox na captura do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49

<b>Figura 22</b> - Efeito dos solventes propilenoglicol e DMSO na captura de NO.....	50
<b>Figura 23</b> - Efeito da paepalantina em propilenoglicol e DMSO e o Trolox na captura de óxido nítrico. ....	50
<b>Figura 24</b> - Efeito dos solventes propilenoglicol e DMSO no crescimento de <i>H. pylori</i> expresso em porcentagem de crescimento.. ....	51
<b>Figura 25</b> - Efeito dose-resposta no crescimento de <i>H. pylori</i> para paepalantina dissolvida em propilenoglicol e DMSO. ....	52
<b>Figura 26</b> - Efeito dose-resposta no crescimento de <i>H. pylori</i> para amoxicilina e metronidazol.. ....	52
<b>Figura 27</b> - Curva de crescimento de <i>H. pylori</i> em diferentes concentrações de paepalantina solubilizada em propilenoglicol por tempo de estocagem .....	53
<b>Figura 28</b> - Resultado de crescimento de <i>H. pylori</i> em diferentes concentrações de paepalantina solubilizada em DMSO por tempo de estocagem .....	53
<b>Figura 29</b> - Atividade inibitória sobre a enzima urease da paepalantina na concentração de 1024 µg/ml tanto em propilenoglicol quanto em DMSO .....	54
<b>Figura 30</b> - Fotomicrografias feitas via MEV para amostras de <i>H. pylori</i> tratadas com paepalantina. ....	55
<b>Figura 31</b> - Curva dose-resposta no crescimento de <i>H. pylori</i> na presença de amoxicilina e amoxicilina adicionada de 1/4 de CIM de paepalantina (32µg/ml). ....	56
<b>Figura 32</b> - Curva dose-resposta no crescimento de <i>H. pylori</i> para metronidazol, paepalantina e metronidazol adicionado de 1/4 de CIM de paepalantina (32µg/ml).....	56
<b>Figura 33</b> - Comparação entre o arranjo ortodifenólico do flavonoide quercetina e paepalantina .....	61
<b>Figura 34</b> - Similaridade entre a paepalantina e a tetraciclina com áreas homólogas destacadas.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados do teste de dissolução.....	39
<b>Tabela 2</b> - Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH. ....	75
<b>Tabela 3</b> - Atividade antioxidante x tempo de estocagem para paepalantina em propilenoglicol.....	75
<b>Tabela 4</b> - Atividade antioxidante x tempo de estocagem para paepalantina dissolvida em DMSO .....	75
<b>Tabela 5</b> - Atividade Antioxidante para o radical ABTS.....	76
<b>Tabela 6</b> - Atividade Antioxidante frente o radical superóxido.....	76
<b>Tabela 7</b> - Percentual de TNB não oxidado pelo.....	76
<b>Tabela 8</b> - Atividade Antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio .....	77
<b>Tabela 9</b> - Curva dose-resposta no crescimento de <i>H. pylori</i> .....	77
<b>Tabela 10</b> - Atividade anti- <i>H. pylori</i> para solventes .....	77
<b>Tabela 11</b> - Porcentagem de crescimento de <i>H. pylori</i> para paepalantina dissolvida em propilenoglicol por dias de estocagem das soluções. ....	78
<b>Tabela 12</b> - Porcentagem de crescimento de <i>H. pylori</i> para paepalantina dissolvida em DMSO para cada dia após o preparo da solução estoque. ....	78
<b>Tabela 13</b> - Resumo de valores de porcentagem de solvente que é carregado em cada ensaio de atividade antioxidante considerando solução estoque a 10 mg/ml. ....	78
<b>Tabela 14</b> – Porcentagem de solvente carregado nos ensaios de cultura de <i>H. pylori</i> .....	79
<b>Tabela 15</b> - Resumo dos valores de CE50.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BabA	<i>Blood group antigen adhesion</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração
CagA	Proteína Cag A
Cag-PAI	Ilha de patogenicidade que codifica a proteína CagA
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia Clássica
CCD	Cromatografia por camada delgada
CE50	Concentração eficaz em 50% da atividade
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLMP	Cromatografia líquida de média performance
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standarts Institute</i>
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
DPR	Desvio padrão relativo
DTNB	5,5' - ditiobis- (2-ácido nitrobenzóico)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetase indutível
KatA	Catalase A
MALT	Linfoma associado a tecido linfóide
MDO	Malonaldeído
MdaB	NADPH quinona redutase
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MO	Microscopia óptica
MPO	Mieloperoxidase
NapA	Proteína sequestrante A
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium</i>
NADPH	Nicotinamida adenina difosfato
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
PMS	Metassulfato de fenazina
pH	Potencial hidrogeniônico
Prxs	Peroxirredoxinas
RDC	Resolução da diretoria colegiada
SodA	Superóxido dismutase A
SodB	Superóxido dismutase B
TNB	Ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colônias
UreA/B	Ureases A e B
UV	Ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolizante A

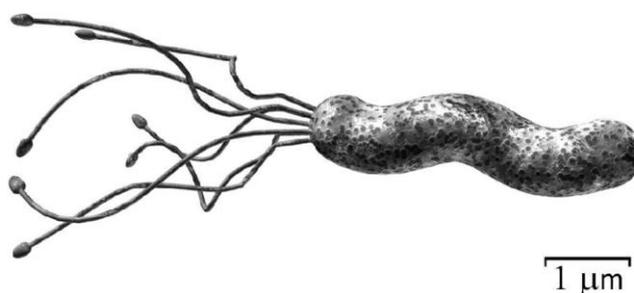
## SUMARIO

1. Introdução	18
2. Objetivos	27
3. Materiais e métodos	28
3.1 Material vegetal	28
3.2 Reagentes	28
3.3 Preparação de extratos brutos	29
3.4 Fracionamento e purificação	29
3.5. Estudo de Solubilidade	30
3.6. Validação de metodologia analítica espectrofotométrica no UV	30
3.6.1 Seletividade	31
3.6.2 Linearidade	31
3.6.3 Precisão	31
3.6.4 Estabilidade das Soluções	31
3.7 Ensaio de atividade antioxidante	32
3.7.1 Captura do radical sintético DPPH	32
3.7.2 Captura do radical sintético ABTS	32
3.7.3 Captura do radical superóxido	33
3.7.4 Captura do ácido hipocloroso	33
3.7.5 Captura do peróxido de hidrogênio	33
3.7.6 Captura do radical hidroxil	34
3.7.7 Captura de óxido nítrico	34
3.8 Avaliação da atividade anti- <i>H. pylori</i>	35
3.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima	35
3.8.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima	35
3.8.3 Avaliação de Atividade Sobre a Enzima Urease	35
3.8.4 Análise morfológica de por microscopia Eletrônica de Varredura	36
3.9 Análise estatística	37
4. Resultados	38
4.1 Pureza	38
4.2 Estudo de solubilidade	38
4.3 Validação de metodologia analítica espectrofotométrica	40
4.3.1 Seletividade	40

4.3.2 Linearidade	40
4.3.3 Precisão	41
4.3.4 Estabilidade	42
4.4 Atividade antioxidante	42
4.4.1 Radical DPPH	42
4.4.1.1. Atividade antioxidante frente ao radical DPPH em função do tempo de estocagem das soluções	43
4.4.2 Radical ABTS	45
4.4.3 Radical superóxido	45
4.4.4 Ácido hipocloroso	46
4.4.5 Radical hidroxil	47
4.4.6 Peróxido de hidrogênio	48
4.4.7 Radical óxido nítrico	49
4.5 Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i>	51
4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima	51
4.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima em função do tempo de estocagem de paepalantina	52
4.5.3 Determinação da concentração bactericida mínima	54
4.5.4 Atividade sobre a enzima urease	54
4.5.5 Análise morfológica de <i>H. pylori</i> em CIM e sub-CIM de paepalantina por microscopia eletrônica de varredura	54
5. Discussão	57
6. Conclusões	64
7. Referências	65
8. Apêndice	75
9. Anexos	80

## 1.INTRODUÇÃO

*Helicobacter pylori* (Figura 1) é uma bactéria Gram-negativa, espiralada, que apresenta motilidade em função de seus flagelos, encontrada no epitélio gástrico e isolada pela primeira vez em 1984 por Marshall & Warren. Classificada inicialmente como pertencente ao gênero *Campylobacter*, sendo chamada de *Campylobacter pyloridis*, *Campilobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori* (Goodwin, 1985). Após estudos ultraestruturais e de análise da sequência de DNA, ela foi retirada do gênero *Campylobacter* e passou a receber a denominação de *Helicobacter*, que significa forma helicoidal. A espécie, por ser mais encontrada na mucosa do antro gástrico, próxima ao piloro, acabou recebendo a denominação de *Helicobacter pylori* (Goodwin, 1989).



**Figura 1** - *Helicobacter pylori*, imagem em 3D (Marshall, 2002).

Esta bactéria tem como característica a capacidade de interagir com as células epiteliais estomacais se adaptando às condições especiais do meio gástrico garantindo assim a sua permanência no hospedeiro. O risco de desenvolver doenças gástricas relacionadas a presença de *H. pylori* depende de vários fatores, dentre eles a virulência da bactéria, a predisposição genética do hospedeiro e o meio ambiente em que o mesmo vive (Kusters, Van Liet, Kuipers, 2006; Lopes, Vales, Oleastro, 2014).

De acordo com o processo evolutivo, este microrganismo adquiriu fatores de virulência que são fundamentais na estratégia de sobrevivência na mucosa gástrica, regulando a resposta imune do hospedeiro, resistindo ao processo digestivo e, por fim, colonizando o epitélio estomacal (Kusters, Van Liet, Kuipers, 2006). *H. pylori* possui de 2 a 6 flagelos unipolares, responsáveis pela motilidade e movimentos rápidos em soluções viscosas como o muco que recobre as células epiteliais (O'Toole, Lane, Porwollick, 2000). Também apresenta a ação de proteases e fosfolipases que degradam o muco estomacal facilitando sua progressão; e a

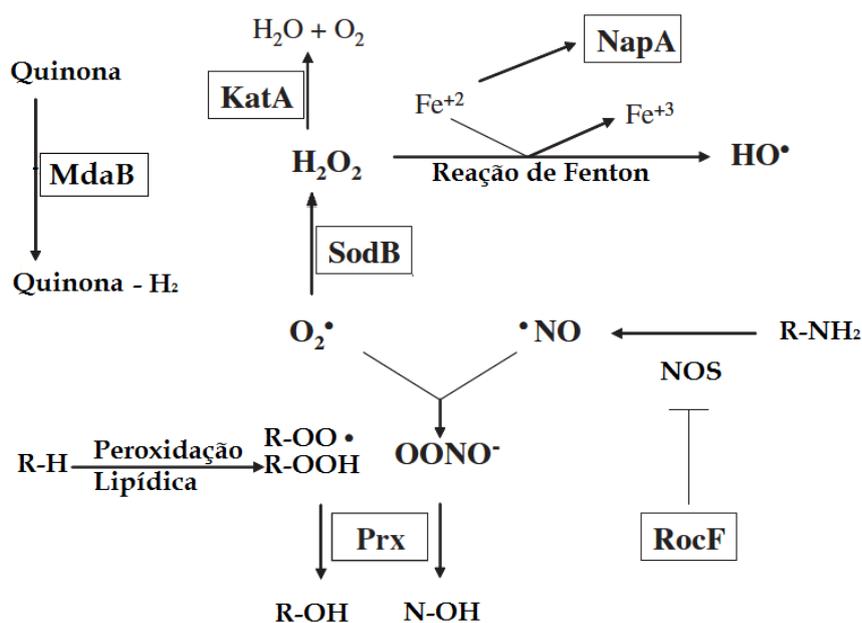
urease, que atua provocando a síntese de amônia a partir da ureia, levando a alcalinização do pH e tornando o meio gástrico favorável ao *H. pylori* (Ladeira, Salvadori, Rodrigues, 2003).

Outros fatores de virulência conhecidos são a proteína *BabA* (*blood group antigen adhesion*) responsável pela adesão à mucosa gástrica, fator importante para a colonização da bactéria (Amieva & El-Omar, 2008). Também é relatada a existência da proteína *CagA*, que é codificada pela ilha de patogenicidade *cag-PAI* a qual é responsável pelo aumento da secreção de IL-8, importante para a quimiotaxia e ativação de neutrófilos (Nillson et al., 2003). Outra proteína, *VacA* (*vacuolating cytotoxin A*), é considerada fator chave de virulência na patogênese da ulceração péptica e do câncer gástrico por induzir vacuolização da célula, formação de canais na membrana, interrupção das funções endossomais e lisossomais, apoptose e imunomodulação (Phadnis, Ilver, Janson, 1994; Atheron et al, 1999).

*H. pylori* conta ainda com um eficiente sistema antioxidante próprio que vem sendo cada vez mais estudado (Stent, Every, Sutton, 2012). Já é bem conhecido o seu sistema de combate ao *stress* oxidativo via ação da superóxido dismutase (*SodB*) na conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e sua posterior eliminação via catalase (*KatA*) (Nicholls, Fita, Loewen, 2001). Tanto que, cepas de *H. pylori* com mutações no gene *sodB*, demonstram elevada sensibilidade ao radical superóxido (Bereswill et al., 2000; Wang et al., 2006).

Recentemente outros sistemas de defesa antioxidantes importantes foram elucidados. Foi observada a ocorrência de peroxiredoxinas (*Prxs*), responsáveis pela redução de uma variada gama de hidroperóxidos em seus alcoóis correspondentes (Wood et al., 2011). A Proteína *NapA*, que atua como uma segunda linha de defesa antioxidante sequestrando íons  $Fe^{3+}$  e protegendo o DNA de danos oxidativos (Evans et al., 1995; Wang, Alamuri, Maier, 2006), o gene *MdaB* que codifica a NADPH quinona-redutase a qual atua detoxificando metabólitos da cadeia respiratória bacteriana e tem uma ação secundária específica na redução de quinonas e endonucleases que atuam protegendo o DNA bacteriano de EROs exógenas (Wang et al., 2004; O'Rourke et al., 2003).

Estes genes de resistência despontam como alvos interessantes no desenvolvimento de novos medicamentos e a sua atuação no processo de eliminação das EROs por *H. pylori* pode ser resumido na Figura 2.



**Figura 2** - Genes de resistência de *H. pylori* e a atuação no processo de eliminação de radicais livres gerados na resposta imune. Modificado de: Wang, Alamuri, Maier, 2006.

É reconhecida que a maior causa da lesão não é a ação direta do microrganismo, mas sim a exacerbação da resposta imune ativada pela bactéria, a qual se mantém viável através de seus sistemas de defesa antioxidantes acima relatados que modulam a resposta imune em seu entorno. Dessa forma, ocorre a instalação de um ciclo vicioso, onde *H. pylori* ativa a resposta imune, modula a inflamação em seu entorno ao mesmo tempo que libera mais antígenos que vão ativar cada vez mais a inflamação (Ernest & Gold, 2000; Olkzak et al., 2003).

Esta ativação da resposta imune leva a uma migração de monócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o tecido inflamado os quais dão início a produção de espécies reativas de oxigênio através da ativação dos sistemas de NADPH oxidase com consequente produção de ânion superóxido (Birben et al., 2002). O ânion superóxido reage com uma série de outras moléculas levando a produção de peróxido de hidrogênio, peroxinitritos e ácido hipocloroso, produzido a partir da ação da mieloperoxidase (Israel & Peek, 2001). Essa alteração patológica indiretamente leva a um desequilíbrio na relação protease/antiprotease existente no interstício intestinal levando a uma maior produção de elastase, colagenase e gelatinase promovendo injúria local no epitélio. A ativação do *nuclear factor kappa beta* ( $\text{nfk}\beta$ ) leva a uma super-regulação de diferentes genes levando a uma

superprodução de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e iNOS (Marshall, 2002).

A gastrite é a consequência mais comum da infecção por *H. pylori* em pacientes sintomáticos (Blaser & Atheron, 2004). Obviamente, a extensão e a distribuição desta gastrite é que determina o resultado clínico, podendo ser identificados três fenótipos. O mais simples e benigno é caracterizado por uma pangastrite leve e com um mínimo de perturbação da secreção de ácido gástrico, normalmente é observado em indivíduos assintomáticos e que de um modo geral não desenvolvem doenças gastrintestinais severas. O segundo fenótipo é denominado ulcero-duodenal e é responsável por até 15% dos indivíduos infectados. Esta gastrite tem por característica uma maior produção de suco gástrico e normalmente se localiza numa posição antral podendo levar a um surgimento de úlceras duodenais. O fenótipo mais grave leva ao surgimento de câncer gástrico e se caracteriza pela presença de gastrite predominante no corpo e atrofia gástrica multifocal com hipo ou acloridria. Estas anormalidades afetam até 2% dos indivíduos infectados que chegam a desenvolver inflamação crônica induzida pela infecção (Fox, 2002; Amieva & El-Omar, 2008).

Podemos observar que a infecção por esta bactéria atua como co-fator no desenvolvimento de três importantes doenças do trato gastrointestinal superior: úlceras duodenais e gástricas (até 10%), câncer gástrico (em 0,1 a 3%) e linfoma tipo MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) (em <0,01%) (Mccoll, 2010).

A prevalência de infecção varia de em média 80% nos países subdesenvolvidos a até 40% nos países industrializados. É estimado que dos pacientes infectados por *H. pylori*, 10 a 20% venham a desenvolver desordens ulcerativas gástricas de graus variáveis e cerca de 1 a 2% tenham risco de desenvolver câncer gástrico (Kusters, Van Liet, Kuipers, 2006). Sua prevalência aumenta com a idade avançada e com um menor nível socioeconômico durante a infância e, portanto, variando consideravelmente no mundo (Woodward, Morrisson, Mccoll, 2000).

O tratamento mais efetivo envolve a administração de amoxicilina, claritromicina e um inibidor da bomba de prótons duas vezes ao dia por 30 dias, o qual apresenta taxa de erradicação de 40% (Graham, Opekun, Kleyn, 1993; Megraud, 2000; Megraud & Lamouliatte, 2003). Falhas no tratamento ocorrem em

função de diversos fatores, como a ocorrência de cepas de *H. pylori* resistentes à metronidazol e claritromicina (Kanamaru et al., 2001; Funatogawa et al., 2004), alto custo dos medicamentos e ocorrência de efeitos colaterais em função da quantidade de medicamentos, o que leva a necessidade da busca por novos fármacos como terapia alternativa (Megraud, 2004).

Neste contexto, os produtos naturais sempre tiveram lugar de destaque na descoberta de novos fármacos, incluindo novos antibióticos. Entre 1981 e 2014 cerca de 1652 novos princípios ativos foram aprovados como fármacos. Dentre eles, 47% correspondem a produtos de origem natural, seus derivados semissintéticos e produtos sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais (Newmann & Cragg, 2016).

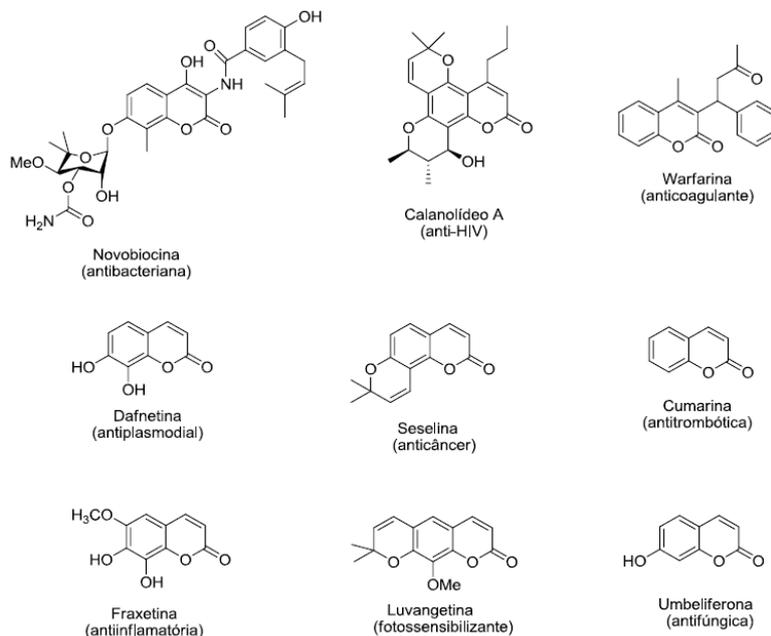
Uma análise de todas as novas moléculas aprovadas pela FDA (*Foods Drugs Administration*) até hoje, aponta que mais de um terço corresponde a produtos naturais e seus derivados, demonstrando a importância deste tipo de pesquisa no desenvolvimento de novos medicamentos (Patridge et al., 2015).

Diversas plantas são referidas quanto à sua composição química e atividade biológica, levando ao desenvolvimento de novos fármacos. São descritas inúmeras moléculas bioativas, como óleos essenciais, terpenóides, alcalóides, saponinas, flavonoides, antraquinonas e cumarinas (Rout et al., 2009).

Dentre as inúmeras classes de metabólitos secundários destacam-se as cumarinas, as quais foram inicialmente identificadas por Vogel em 1820, que isolou pela primeira vez a 1,2-benzopirona, mais conhecida como cumarina, da planta *Coumarona odorata* (Ribeiro & Kaplan, 2002).

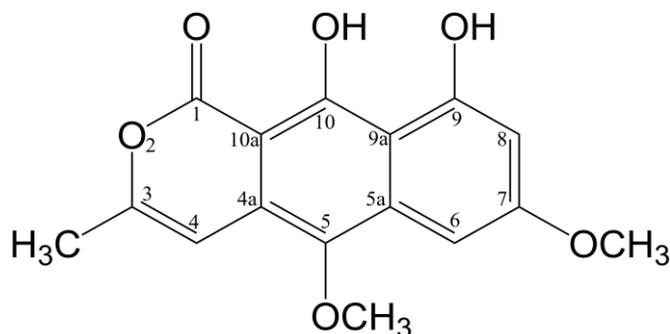
De acordo com sua estrutura básica, são lactonas do ácido *o*-hidroxi-cinâmico e atualmente são divididas em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, isocumarinas e cumarina mistas. Inúmeros fármacos foram desenvolvidos a partir desta classe de substâncias (Figura 3) sendo que este grupo de moléculas desponta como uma importante classe fitoquímica amplamente distribuída na natureza e que apresenta diversos efeitos farmacológicos, como anti-câncer (Lacy et al., 2014), anticoagulante (Helgeland, 1998), anti-inflamatória (Hadjipavlou-Litjna, 2007), antioxidante, (Paya et al., 1994; Gaccher & Jadhav, 2014) e antimicrobiana (Kaiser & Kolodziej, 1999), destacando a descoberta de

antibióticos, como a novobiocina e seus derivados (Paya, Halliwell, Hoult, 1992; Hoult & Paya, 1996; Ribeiro & Kaplan, 2002; Hardy & Cozzarelli, 2003; Lin et al., 2008; Lee et al., 2014).



**Figura 3** - Principais medicamentos pertencentes a classe das cumarinas (Murray, 1991).

A isocumarina, 9,10-diidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c)piran-1-ona, conhecida por paepalantina (Figura 4), foi isolada e identificada pela primeira vez em 1990 de capítulos florais de *Paepalanthus bromelioides*, por Vilegas e colaboradores. Nesse estudo, também foi observada significativa atividade antibacteriana, principalmente para cepas de bactérias Gram-positivas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermitis*, o que abriu fronteira para seu estudo mais aprofundado.



**Figura 4** - Estrutura química da paepalantina

Posteriormente, outros autores também isolaram a paepalantina de outras espécies do gênero *Paepalanthus*: *P. macrocephalus*, *P. microphyllus* e *P.*

*vellozoides* demonstrando uma maior probabilidade de se encontrar esse composto e seus análogos neste gênero botânico (Varanda et al., 1997; Piacente et al., 2001; Dokkedal, Sano, Villegas, 2004).

O potencial antimicrobiano da paepalantina foi, primeiramente, descrito por Villegas e colaboradores (1990), através da técnica de difusão em agar e diluição em caldo. Em 2002, Devienne & Raddi determinaram a concentração inibitória mínima, através de técnica espectrofotométrica, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, demonstrando que a paepalantina é capaz de inibir principalmente o crescimento de microrganismos Gram-positivos.

Devienne e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antibacteriana da paepalantina e de seus açúcares derivados, bem como da paepalantina com substituições das hidroxilas das posições 9 e 10 por grupamentos acil e metil. Foi observado que apenas a paepalantina demonstrou efeito sobre cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis* demonstrando que as hidroxilas das posições 9 e 10 são essenciais para atividade antimicrobiana.

O interesse na avaliação de propriedades biológicas das paepalantinas é decorrente de relatos etnofarmacológicos descritos por Hoehne (1939) e da semelhança estrutural com outros fármacos com atividade antimicrobiana. Paepalantina também foi avaliada quanto ao potencial citotóxico, mutagênico e clastogênico. Apesar das propriedades mutagênicas verificadas para paepalantina através do teste de Ames, essa isocumarina não apresentou efeitos clastogênicos quando avaliada *in vivo* em células da medula óssea de ratos Wistar e linfócitos humano (Varanda et al, 1997; Tavares et al, 1999; Varanda et al, 2004).

Devido à presença de grupamentos fenólicos na estrutura da paepalantina, semelhantes aos presentes em flavonoides e cumarinas, o potencial antioxidante também foi avaliado por Leitão, Leitão e Villegas (2002) que demonstraram a capacidade antioxidante por técnica espectrofotométrica empregando DPPH. Através de testes de quimiluminescência, Kitagawa e colaboradores (2003) demonstraram que a paepalantina é capaz inibir o *burst* oxidativo de neutrófilos estimulados.

Atividade anti-inflamatória da paepalantina sobre colite ulcerativa, cuja patogenia está associada à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) foi, demonstrada por Di Stasi e colaboradores (2004). Essa isocumarina preveniu a queda dos níveis de glutatona celular de ratos tratados com 5 e 10 mg/kg corpóreo, além de diminuir a produção de óxido nítrico através da inibição da enzima óxido nítrico sintase. Segundo esses autores, a ação preventiva na colite pode estar relacionada com atividade antioxidante da paepalantina.

Cálgaro-Helena e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da paepalantina e seus derivados sobre mitocôndrias isoladas de células hepáticas de ratos, através de modelo experimental para avaliar possíveis substâncias com efeito preventivo sobre câncer e no controle de tumores já instalados. Neste estudo, observou-se que todos os compostos atuam sobre a fase 4 da respiração provocando desacoplamento do sistema respiratório. Apenas a paepalantina promoveu a diminuição na concentração de glutatona por oxidação da mesma, além de promover a liberação do *citocromo c* que funciona como ativador de apoptose, indicando a paepalantina como composto promissor no desenvolvimento de medicamento contra o câncer.

Diante do exposto, a paepalantina é uma molécula que apresenta potencial farmacológico, principalmente relacionado aos estudos das atividades antibacteriana e antioxidante, características importantes para a avaliação anti-*H. pylori* e os danos causados pelo estresse oxidativo gerado por esta bactéria. No entanto, sua característica lipofílica dificulta a aplicação em ensaios que dependem de solubilização em meio aquoso, sendo normalmente solubilizada em dimetilsulfóxido, solvente que apresenta várias limitações como toxidez para cultura celular e interação com EROs em ensaios antioxidantes (Basch & Gadebusch, 1968; Vogin et al., 1970; Qi et al., 2008; Hanslick et al., 2009; Ménorval et al., 2012; White et al., 2013; Yuan et al., 2014). Este fato conduz a necessidade de se avaliar formas de solubilizar a molécula de modo que ela esteja biodisponível e bioavaliável para os ensaios.

Uma etapa importante na pesquisa de substâncias candidatas a se tornarem medicamentos é a avaliação das características físico-químicas do princípio ativo e de possíveis interações com adjuvantes que venham a ser utilizados durante o desenvolvimento farmacêutico. A interação química com possíveis solventes pode

causar variações em sua solubilidade, biodisponibilidade, prazo de validade e inclusive mascarar a atividade biológica avaliada (Wang, Ma, Higgins; 2006). Em função disto, se faz necessário estudar o comportamento de possíveis fármacos, seja sintéticos ou isolados de plantas, frente a diferentes adjuvantes farmacêuticos a fim de determinar o sistema ideal para preservar a sua validade ao máximo com o mínimo de perdas por interação entre os componentes da formulação. Esta fase de estudo também tem a importância de determinar quais adjuvantes inócuos em animais e seres humanos que podem ser utilizados e estabelecer metodologias analíticas validadas para o controle de qualidade da molécula (Gowthamarajan & Singh, 2010). O estudo de pré-formulação compreende metodologias pelas quais podem ser determinados o coeficiente de partição óleo/água, taxa de dissolução, ocorrência de polimorfos, estabilidade e a solubilidade como a principal delas (Vilegave, Vidyasagar, Chandankar, 2013).

A paepalantina, apesar dos estudos anteriores, ainda carece de dados sobre o seu comportamento em diferentes solventes, os estudos realizados com esta substância normalmente utilizam o dimetilsulfóxido como solvente, no entanto, o mesmo apresenta toxicidade em altas concentrações para seres humanos e demais modelos animais usados em pesquisa, além de induzir apoptose em alguns modelos de cultura celular *in vitro* (Vogin et al., 1970; Qi et al., 2008).

Considerando os estudos já relatados para a paepalantina e o potencial como candidato a novo fármaco, é de interesse científico buscar alternativas ao DMSO que também sejam capazes de solubilizar essa molécula sem a interferência nos resultados das análises executadas e que não apresentem toxidez para aplicação em ensaios *in vivo* posteriores.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Realizar estudo de solubilidade e avaliar as atividades antioxidante e anti-*Helicobacter pylori in vitro* da isocumarina paepalantina.

### Objetivos específicos

1. Realizar estudo de solubilidade, validação de metodologia analítica e estabilidade da paepalantina em diferentes solventes;
2. Avaliar a capacidade antioxidante da paepalantina sobre:
  - Radical DPPH;
  - Radical ABTS;
  - Ácido hipocloroso;
  - Radical hidroxil;
  - Ânion superóxido;
  - Peróxido de hidrogênio;
  - Óxido nítrico.
3. Avaliar a atividade anti-*H. pylori* através da:
  - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da paepalantina para *H. pylori* através da técnica espectrofotométrica de microdiluição em caldo;
  - Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) da paepalantina para *H. pylori*.
  - Avaliação da atividade inibitória sobre a enzima urease;
  - Avaliação de possíveis alterações na morfologia de *H. pylori* causadas pela CIM e sub-CIM de paepalantina por microscopia eletrônica de varredura;
  - Avaliação do sinergismo de sub-CIM de paepalantina com os antibióticos amoxicilina e metronidazol sobre *H. pylori*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A paepalantina utilizada neste estudo foi cedida pelo professor Rodrigo Rezende Kitagawa. Dados da coleta do material vegetal, preparo dos extratos e purificação são descritos a seguir.

#### 3.1 Material vegetal

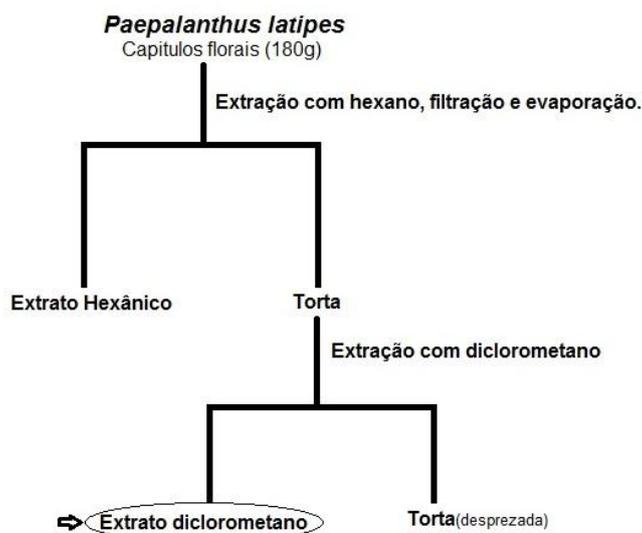
*Paepalanthus latipes* Silv. foi coletada na Serra do Cipó, em Minas Gerais e catalogada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP, sob referência CFSC 13846. Após processos de secagem e moagem, paepalantina foi extraída dos capítulos da planta (Vilegas et al., 1990). A preparação dos extratos e frações, assim como, os instrumentos e técnicas utilizados são descritos a seguir.

#### 3.2 Reagentes

Dimetilsulfóxido, glicerina, trolox, DPPH, ABTS, NADH, metassulfato de fenazina, *nitro blue tetrazolium*, ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico, peroxidase, amoxicilina, metronidazol, urease, ureia e ácido bórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, Mo, USA). Hexano, diclorometano, propilenoglicol, etanol, ácido hipocloroso e nitroprussiato de sódio foram adquiridos da Neon comercial LTDA. (São Paulo, SP, Brasil). Persulfato de potássio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, vermelho de fenol, cloreto de sódio, dextrose, hidróxido de sódio, desoxirribose, cloreto férrico, EDTA, ácido ascórbico e ácido tricloroacético foram adquiridos da Vetec Química fina, LTDA. (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Peróxido de hidrogênio foi adquirido da Dinâmica Química contemporânea LTDA. (Diadema, SP, Brasil). Ácido tiobarbitúrico foi adquirido da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Meio *brain heart infusion* foi adquirido da Himedia Laboratories LTDA. (Mumbai, Índia). Soro fetal bovino foi adquirido da Vitrocell Embriolife (Campinas, SP, Brasil). Placas de ágar Columbia sangue de carneiro 5% adquiridas da BioMérieux S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### 3.3 Preparação de extratos brutos

Extratos dos capítulos florais secos e moídos foram obtidos por maceração durante uma semana, utilizando solventes orgânicos em polaridade crescente. Ao final de cada extração a solução foi filtrada, em filtro de papel comum, e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se os extratos hexânico e diclorometânico (DCM). O extrato hexânico foi descartado e o DCM utilizado para obtenção da paepalantina. A sequência para a preparação dos extratos está esquematizada na Figura 5.



**Figura 5** - Preparo de extratos a partir dos capítulos de *P. latipes*.

### 3.4 Fracionamento e purificação

Cromatografia em coluna clássica (CC) e Cromatografia líquida de média performance (CLMP) foram utilizados para o fracionamento e purificação do extrato diclorometano e Cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de pureza:

- CC: inicialmente, a eluição foi realizada com tolueno puro, em seguida, aumentando-se a polaridade da mistura com adição de acetato de etila mais 0,5% de ácido acético até obtenção da proporção 6:4.
- CLMP: uma mistura 9:1 de tolueno / acetato de etila mais 0,5% de ácido acético foi utilizada como solvente. A polaridade do sistema foi aumentada, gradativamente, com adição de acetato de etila.

- CCD: todas as frações obtidas foram analisadas por CCD, utilizando o sistema eluente 8:2:0,5 de tolueno/acetato de etila/ácido acético e agrupadas quando necessário. Após eluição, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta (UV) e, posteriormente, com iodo. Frações que continham a paepalantina, juntamente com outras impurezas, foram submetidas à CLMP e analisadas novamente.
- CLAE: a confirmação da pureza da paepalantina foi realizada por CLAE com a seguinte condição de análise: Coluna de sílica (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6 x 250 mm, 5µl, Agilent Technologies, USA) e sistema eluente contendo 8:2 clorofórmio/metanol mais 1% de ácido fórmico, em modo isocrático.

### **3.5. Estudo de Solubilidade**

Inicialmente foram selecionados três possíveis solventes para a paepalantina levando em consideração valores de constante dielétrica maior, próximo e menor ao DMSO. Dessa forma, propilenoglicol, glicerina e água foram selecionados e avaliados quanto a solubilidade da paepalantina levando em consideração algumas variáveis como: valores de concentração de 10, 20 e 40 mg/ml, pH a 7.5, temperatura (ambiente e 37°C) e adição de surfactante (0,02% de Tween 80 ou Tween 20). A avaliação consistiu na determinação da homogeneidade e da transparência das soluções por análise visual, sendo que a presença de possíveis cristais de paepalantina foi avaliada por microscopia óptica comum (Olympus AX70, Olympus optical Co., Tokyo, Japan), utilizando software de captura (Leica IM 1000 Software, Wetzlar, Germany) acoplado a câmera digital (Axiocam ERc 5s, Zeiss, Jena, Germany). Baseado nos resultados de solubilidade foi selecionado o solvente mais apropriado para experimentos subsequentes. Paepalantina dissolvida em DMSO foi utilizada como padrão de comparação.

### **3.6. Validação de metodologia analítica espectrofotométrica no UV**

Para a validação da metodologia analítica espectrofotométrica para a paepalantina no solvente escolhido na etapa anterior, considerou-se a seletividade, linearidade e precisão de acordo com as normas da RDC 899 de 29 de maio de 2003/ANVISA (BRASIL, 2003). As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV/VIS NANO DROP 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

com registro dos picos de absorção espectral na faixa que vai de 200 a 800 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata (n=10) acompanhadas de controle com solvente puro e em comparação com paepalantina dissolvida em DMSO.

### 3.6.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos espectros de absorção no UV/VIS (200 a 800 nm) dos solventes e de soluções destes solventes com paepalantina preparadas na concentração de 0,25 mg/ml. Foi considerado seletivo o comprimento de ondas específico para a paepalantina, sem interferência dos solventes.

### 3.6.2 Linearidade

A partir da solução estoque de paepalantina (10mg/ml) foram preparadas soluções nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,37; 0,5 e 0,75 mg/ml as quais foram lidas no comprimento de ondas considerado seletivo para a paepalantina. Foi realizada análise de regressão linear para comprovação da linearidade do método, sendo satisfatório um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) superior a 0,99.

### 3.6.3 Precisão

Esta análise atesta a reprodutibilidade do método e consistiu no preparo de soluções de paepalantina nas concentrações de 0,1; 0,5 e 0,75 mg/ml as quais foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda seletivo para paepalantina. O ensaio foi realizado em triplicata (n=10) sendo considerados reprodutível valores de desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 5%, sendo expresso pela fórmula:

$$\text{DPR} = (\text{desvio padrão}/\text{concentração média}).100$$

### 3.6.4 Estabilidade das Soluções

As soluções preparadas para avaliação da linearidade foram lidas novamente em espectrofotômetro nos dias 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 após o preparo e os resultados foram plotados em uma curva de absorbância x dias, sendo que os ensaios foram realizados em triplicata (n=10). Durante o período, as soluções foram estocadas em congelador (-20°C).

### 3.7 Ensaios de atividade antioxidante

Para cada ensaio de atividade antioxidante descrito a seguir foi analisada a possibilidade de interferência dos solventes utilizados previamente aos ensaios com a paepalantina em solução. As concentrações avaliadas para os solventes foram: 0,31, 0,62, 1,25, 2,5, 5,0 e 10% (v/v).

As concentrações avaliadas de paepalantina em solução foram de 3,19; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/ml. Trolox® foi utilizado como padrão de substância antioxidante. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) e concentração efetiva 50% (CE50) que é a concentração da amostra capaz de inibir/capturar 50% das espécies reativas. A equação para o cálculo da porcentagem de inibição segue abaixo:

$$\%AA = (A_0 - A).100/A_0$$

Onde:

A<sub>0</sub>= absorbância do controle positivo

A= absorbância da amostra.

%AA= porcentagem de atividade antioxidante.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas iMark®, BioRad (Washington, U.S.A), sendo que todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3) e acompanhados de controle negativo (solventes ou amostra em solução) (n=3).

#### 3.7.1 Ensaio de captura do radical sintético DPPH

Para este ensaio foi empregada uma solução de DPPH a 40 µM em etanol (EtOH). Em microplaca de 96 orifícios foram adicionados 100 µl de amostra teste e 200 µl da solução de DPPH, sendo as absorbâncias determinadas a 540 nm após 30 minutos de reação (Santos et al., 2011; Alves et al., 2010).

#### 3.7.2 Ensaio de captura do radical sintético ABTS

A atividade antioxidante sobre ABTS<sup>•+</sup> consiste na redução do radical 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolino-6-sulfonato)] e foi determinada utilizando o método de Alves et al. (2010) modificado e o protocolo oficial da EMBRAPA (Rufino et al. 2007). Inicialmente uma mistura aquosa de ABTS (7 mmol.l<sup>-1</sup>) e persulfato de potássio

(2,45 mmol.l<sup>-1</sup>) foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 horas. A solução formada de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol até obtenção de uma absorbância de 0,7 a 734 nm. Posteriormente, em microplaca foram adicionados 300 µl da solução de ABTS<sup>•+</sup> e 3 µl de solução de paepalantina em diferentes concentrações com posterior leitura espectrofotométrica a 734 nm.

### 3.7.3 Ensaio de captura do radical superóxido (Método do NBT)

Neste método o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produzido, via oxidação do NADH a NAD em associação com metassulfato de fenazina (PMS) reduz o NBT (*nitroblue tetrazolium*) a formazan em pH 7,4 a temperatura ambiente. A geração do formazan é acompanhada por espectrofotometria pela mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura do formazan em 540 nm (Alves 2010). Um antioxidante reage com O<sub>2</sub><sup>•-</sup> inibindo a produção do formazan. Em resumo, foram preparadas soluções em PBS (100 mM pH 7,4) de NADH (0,125 mM), PMS (0,5 mM) e NBT (0,45 mM) as quais foram incubadas em microplacas de 96 orifícios da seguinte forma: 180 µl de tampão, 24 µl de amostra, 6 µl de PMS e 24 µl de NBT por 2 minutos com posterior adição de 6 µl de NADH. Após 10 minutos, foi realizada leitura espectrofotométrica a 540 nm.

### 3.7.4 Ensaio de captura do ácido hipocloroso (Método do TNB)

O ensaio se baseou no monitoramento espectrofotométrico da oxidação do ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico (TNB) pelo ácido hipocloroso (HOCl) com diminuição da absorção em 412 nm (Ching *et al*, 1994). A absorbância do TNB a 412 nm diminui na presença de HOCl pela formação do 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) que absorve em 325 nm. Nesse teste, incubou-se o HOCl (25 µM) com diferentes concentrações de paepalantina por 1 minuto e, posteriormente, adicionou-se o TNB (50 µM).

### 3.7.5 Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (Método da peroxidase)

Neste ensaio o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), através da ação da enzima peroxidase, oxida o vermelho de fenol a um composto que em pH básico se torna vermelho púrpura, podendo ser quantificado em 620 nm (Pick & Keisari, 1980). A mistura de reação continha: 20 µl de paepalantina, 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), 16 µl da solução de NaCl 140 mM, vermelho de fenol 0,1 mg/ml, dextrose 5,5 mM, em tampão fosfato pH 7 e 20 µl de peroxidase (8,5 U/mL). Para obter o volume final de

200 µl a solução foi completada com a adição de tampão fosfato pH 7. Após 10 minutos a reação foi terminada pela adição de 20 µl de NaOH 1 N e submetida a leitura espectrofotométrica a 620 nm.

#### 3.7.6 Ensaio de captura do radical hidroxil (Método da desoxirribose)

O ensaio da desoxirribose consiste na degradação do açúcar desoxirribose quando exposto ao  $\text{OH}\cdot$ , formando malonaldeído (MDA) que pode ser detectado pela habilidade de reagir com ácido tiobarbitúrico formando um cromógeno rosa (Zhao et al., 2015). O ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Halliwell e colaboradores (1987), com adaptações. A mistura reacional continha: 100 µl de desoxirribose (2,8 mM), 100 µl de  $\text{FeCl}_3$  (50 µM), 100 µl de EDTA (100 µM), 100 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM), tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$  10 mM pH 7,4, ascorbato (100 µM) e 200 µl da amostra. A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora com posterior adição de 500 µl de ácido tiobarbitúrico 1%, preparado em NaOH 50 mM e ácido tricloroacético 2,8%, sendo novamente incubada por 10 minutos a 100°C. A formação de  $\text{OH}\cdot$  foi determinada a 540 nm.

#### 3.7.7 Ensaio de captura de óxido nítrico (NO)

Neste ensaio foi utilizado método descrito por Battes e colaboradores (1991) o qual consiste na geração de NO a partir de uma solução de nitroprussiato de sódio (NPS a 0,625 mM em PBS 0,1M pH7,0). Em contato com o oxigênio do ar e na presença de intensidade luminosa, o nitroprussiato forma dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) o qual, após dimerização e posterior reação com a água resulta na formação de íons nitrito, o qual pode ser quantificado através do Reagente de Griess, formando um cromóforo rosa com absorção proporcional em 540 nm e que corresponde ao teor de óxido nítrico gerado. Substâncias antioxidantes atuam capturando o óxido nítrico, impedindo a formação de nitrito, sendo a capacidade antioxidante inversamente proporcional à absorbância registrada (Battes et al., 1991; Marcocci et al., 1994). Em cada poço da microplaca foram adicionados: 50 µl de paepalantina em diferentes concentrações e 50 µl de NPS. Após 1h a temperatura ambiente e exposição à luz, foram adicionados 100 µl de reagente de Griess e posteriormente realizada leitura espectrofotométrica a 540 nm.

### **3.8 Avaliação da atividade anti-*H. pylori***

#### **3.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para *H. pylori***

A CIM foi avaliada através da técnica de microdiluição em caldo de acordo com a norma CLSI M7-A6, 2003, com modificações. A cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 10% de soro fetal bovino com diversas concentrações de paepalantina obtidas por diluição seriada 1:2 (1024 µg/mL – 4 µg/mL) e o mesmo volume de uma suspensão de *H. pylori* (ATCC 43504) contendo 10<sup>5</sup> UFC/mL. A microplaca foi submetida à leitura espectrofotométrica em 620 nm e, a seguir, incubada a temperatura de 36 °C – 37 °C, em atmosfera contendo 10 % de CO<sub>2</sub>, por 72 horas. Após esse período, a microplaca foi homogeneizada e nova leitura realizada para determinação da CIM. Análises feitas em triplicata acompanhadas de crescimento controle (n=3).

A CIM foi definida, graficamente, como sendo a menor concentração de paepalantina capaz de induzir a um brusco declínio no valor da absorbância de no mínimo 90% em relação ao controle positivo. Amoxicilina e metronidazol foram utilizados como controle da cepa ATCC 43504 que é metronidazol resistente e amoxicilina sensível. A possibilidade de interferência dos solventes na viabilidade bacteriana foi previamente determinada.

#### **3.8.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para *H. pylori***

A CBM foi determinada como a menor concentração de amostra que inibir a formação de colônias de *H. pylori* em placas de agar Columbia contendo sangue de carneiro 5% (incubada a 37°C por 72 h, 10% CO<sub>2</sub>), correspondente ao poço da microplaca sem crescimento aparente em BHI. Análises feitas em triplicata acompanhadas de controle com solventes (n=3).

#### **3.8.3 Avaliação de atividade sobre a enzima urease**

A atividade de inibição da urease foi determinada pela produção de amônia catalisada pela urease de acordo com o método descrito por Tanaka et al. (2003). Em microplaca de 96 poços foram adicionados 25 µl de urease 4UI (Sigma Jack Bean urease tipo III) e 25 µl da amostra em diferentes concentrações, incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados, 25 µL de vermelho de fenol 0,02% e 200 µl de ureia 50 mM em tampão fosfato 100 mM (pH

6,8). A absorvância da mistura reacional foi medida em 540 nm em leitora de microplacas iMark®, BioRad (Washington, U.S.A), após 20 minutos. A quantidade de amônia produzida é equivalente a hidrolise de ureia, sendo que altos valores de absorção indicam alta atividade da urease na mistura reacional. Como controle positivo de inibição foi utilizado o ácido bórico 100 mM como padrão. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula =  $(1 - \text{ABS}_{\text{amostra}}/\text{ABS}_{\text{controle}}) \times 100$ . Análises foram realizadas em triplicata (n=3). Neste ensaio, a possibilidade de interferência dos solventes foi previamente avaliada.

#### 3.8.4 Análise morfológica de *H. pylori* na sub-CIM de paepalantina por microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram realizadas culturas de *H. pylori* contendo paepalantina na CIM (128 µg/ml) e sub-CIM (64 µg/ml) acompanhadas de crescimento controle de acordo com o item 3.8.1. Após o período de incubação as amostras foram submetidas a centrifugação (4000 RPM, 5 min) com descarte do sobrenadante. O resíduo foi suspenso em 1 ml de tampão cacodilato (0,1M pH:7,2), novamente submetido a centrifugação, sendo que este processo repetido mais uma vez. Após, as amostras residuais foram fixadas em lamínulas a temperatura ambiente e desidratadas em série de alcoóis (30, 50, 70, 90 e 100% álcool/água, 10 min cada). Após secagem completa, o material foi metalizado em ouro e analisado em microscópio eletrônico de varredura JEOL®, JSM-6610 LV (Tokio, Japão) a uma tensão de aceleração eletrônica de 10kV e no aumento final de x 22000 (Chakraborti et al., 2013; Fischer et al., 2013).

#### 3.8.5 Avaliação de sinergismo entre sub-MIC de paepalantina e os antibióticos amoxicilina e metronidazol sobre *H. pylori*

Este ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.8.1. Foram avaliadas as associações dos antibióticos metronidazol (512 - 16 g/ml) e amoxicilina (1 - 0,031 g/ml) com paepalantina na sub-CIM de 32 µg/ml. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

### 3.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

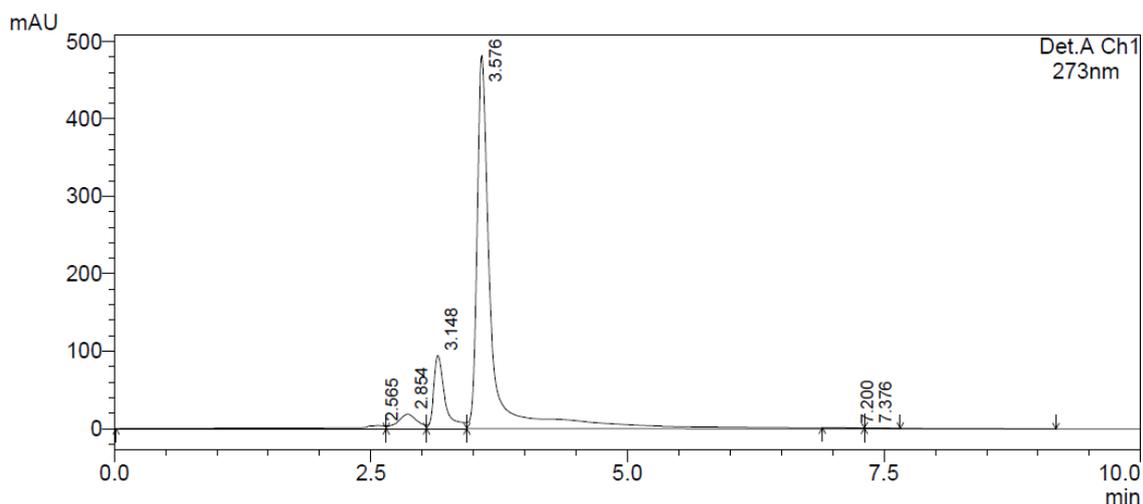
Na validação da metodologia analítica espectrofotométrica foi utilizada análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo consideradas lineares amostras que apresentaram coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) igual ou superior a 0,95 e determinado o coeficiente angular (a) e o intercepto da reta (b).

Para os ensaios de atividade antioxidante foi realizada análise de regressão linear tendo sido consideradas lineares as amostras cujo coeficiente de correlação seja superior a 0,95 e determinados seu coeficiente angular e o intercepto da reta. Para as amostras que apresentaram linearidade foi aplicado o teste *t-student* para comparação das CE50% da paepalantina nos solventes e trolox ( $p < 0,05$ ). Para os ensaios que não apresentaram linearidade foi realizada análise de variância de duas vias com aplicação de teste *pos-hoc* de *Bonferroni* ( $p < 0,05$ ). Para o ensaio de inibição de urease foi aplicado teste *t-student* para comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pureza

A análise da paepalantina por CLAE mostra pureza próxima a 81,3 %. O cromatograma pode ser visto na Figura 6 com o tempo de retenção (Tr) da paepalantina em 3,576 minutos.



**Figura 6** - Cromatograma da análise por CLAE para a paepalantina (Tr = 3,597) (n=3).

### 4.2 Estudo de solubilidade

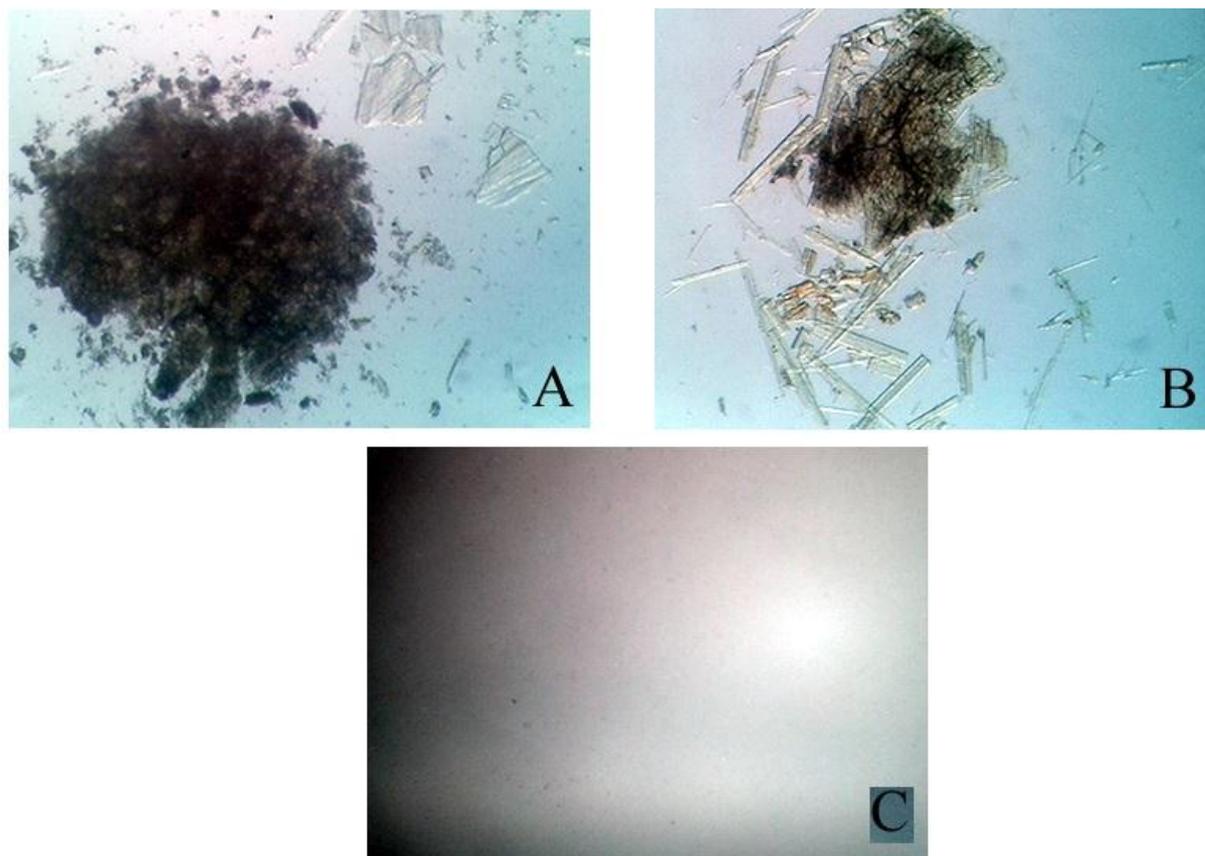
Os dados de solubilidade da paepalantina apontaram como solvente ideal o propilenoglicol no pH 7,5 (Tabela 1). A glicerina e água apresentaram baixa solubilidade para a paepalantina em todas as concentrações testadas, mesmo sob aquecimento ou alcalinização. Adicionalmente, paepalantina em glicerina com pH 7,5 resultou em escurecimento dos cristais, demonstrando reatividade. A paepalantina apresentou solubilidade na concentração máxima de 10 mg/ml em propilenoglicol, sendo mais solúvel em pHs maiores. A adição de surfactante não foi favorável em função da formação de micelas com fases distintas não sendo considerado uma solução homogênea passível de ser aplicada com reprodutibilidade nos ensaios posteriores. DMSO solubilizou a paepalantina em todas as concentrações testadas.

**Tabela 1** - Resultados do teste de dissolução para paepalantina em diferentes solventes

Solvente	Constante dielétrica ( $\epsilon$ )	Concentração (mg/ml)			Aquecimento (37°C)	pH (7,5)	Surfactante (tween 0,02%)	
		10	20	40			80	20
Água	78,36	I	I	I	I	I	SH	SH
Propilenoglicol	28,37	PS	PS	I	PS	S	SH	SH
Glicerina	45,63	I	I	I	I	R	SH	SH
DMSO	46,82	S	S	S	-	-	-	-

solúvel (S), parcialmente solúvel (PS), insolúvel (I), instável (R) e suspensão heterogênea (SH). (n=3)

Os resultados do ensaio de solubilidade foram confirmados através de microscopia óptica comum (Figura 7) a qual demonstra a ausência de cristais na solução de propilenoglicol pH 7,5 e a ocorrência de formas cristalinas distintas da paepalantina nos demais solventes avaliados.

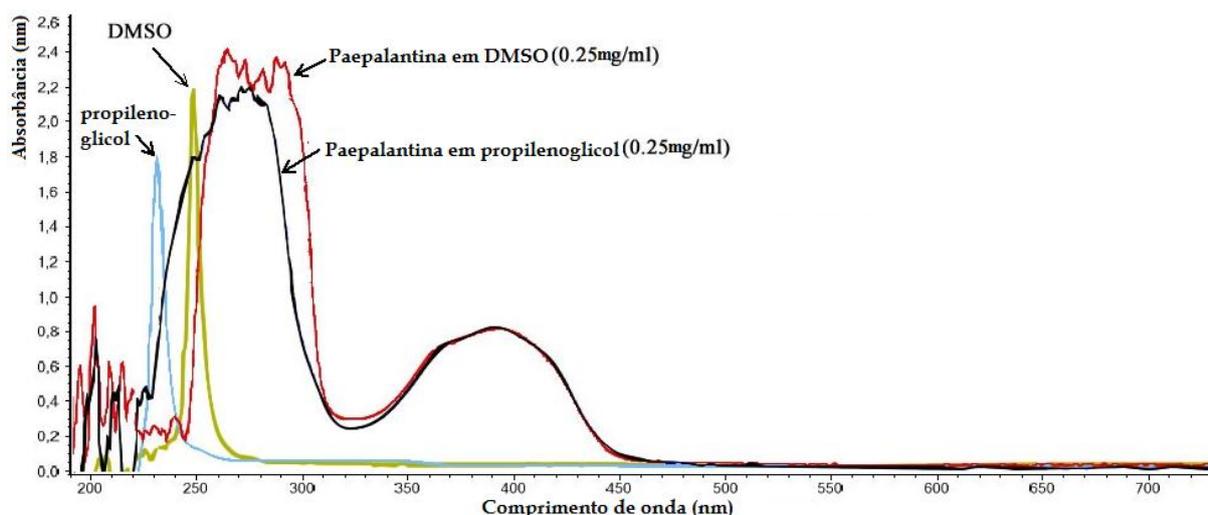


**Figura 7** - Micrografias obtidas por microscopia óptica comum no aumento de 400X. Paepalantina a 10 mg/ml, pH 7,5 em: glicerina (A), água (B) e propilenoglicol (C). (n=3)

### 4.3 Validação de metodologia analítica espectrofotométrica

#### 4.3.1 Seletividade

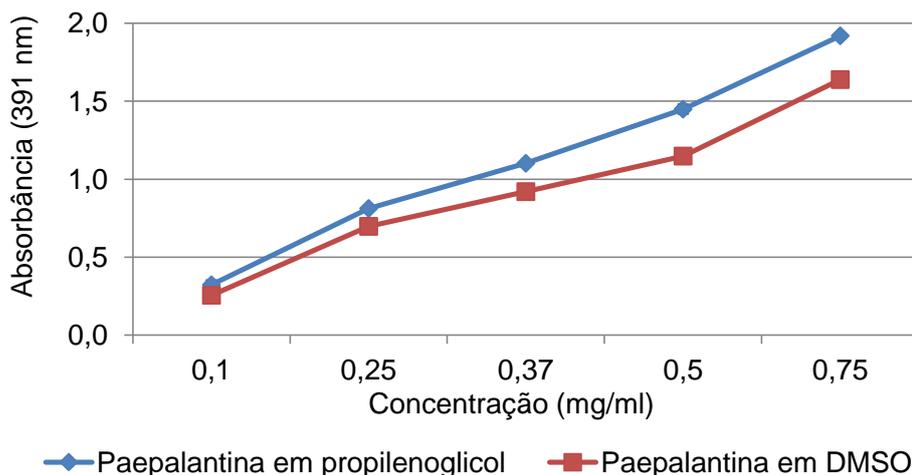
A análise do espectro de absorção dos solventes propilenoglicol e DMSO demonstra que ambos não absorvem em comprimentos de onda superiores a 270 nm (Figura 8). Os espectros de absorção tanto da paepalantina em propilenoglicol como em DMSO mostram que na faixa de absorção de 240 nm até 340 nm, há interação com os solventes, causando deslocamento das bandas de absorção, não sendo um intervalo confiável. No entanto, na faixa de absorção que vai de 340 até 450 nm temos um platô, o qual não sofre deslocamentos em função dos solventes, sendo seletivo para a paepalantina, com o valor máximo de absorção estabelecido em 391 nm. Dessa forma, este comprimento de onda foi selecionado para a realização dos estudos de linearidade, estabilidade e precisão realizados posteriormente.



**Figura 8-** Perfil de absorção da paepalantina (200 a 800 nm) (n=10)

#### 4.3.2 Linearidade

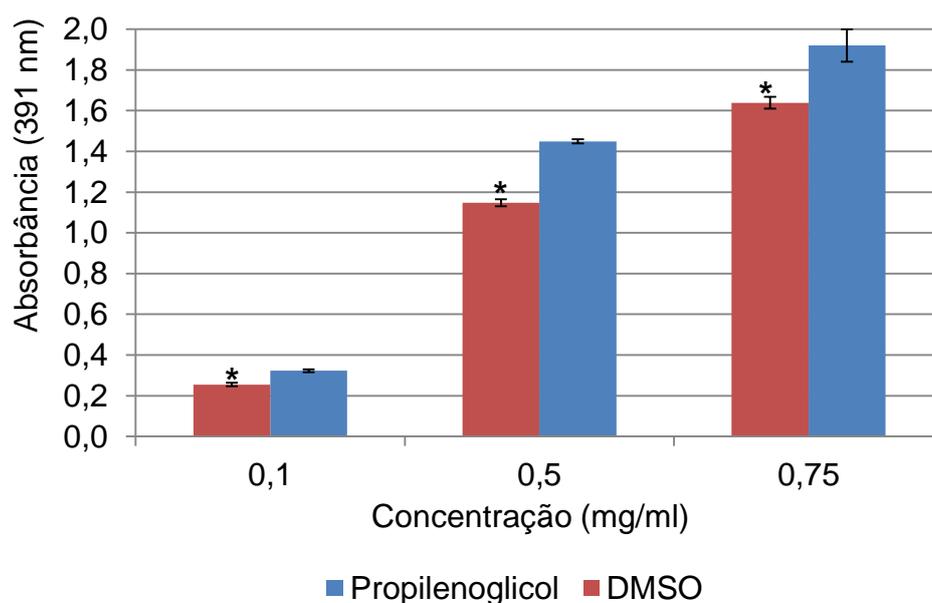
As amostras foram consideradas aprovadas no ensaio de linearidade. A análise de regressão linear para ambas as amostras resultou em um coeficiente de regressão ( $R^2$ ) superior a 0,99 o que atesta a linearidade do método podendo ser visto um resumo dos dados na Figura 9:



**Figura 9** - Análise de linearidade das curvas de calibração espectrofotométricas. Paepalantina em propilenoglicol ( $R^2 = 0,99$ ;  $a = -0,20$ ;  $b = 1,33$ ) e paepalantina em DMSO ( $R^2 = 0,99$ ;  $a = -0,17$ ;  $b = 1,58$ ). Todas as absorvâncias foram medidas em triplicata ( $n=10$ ).

#### 4.3.3 Precisão

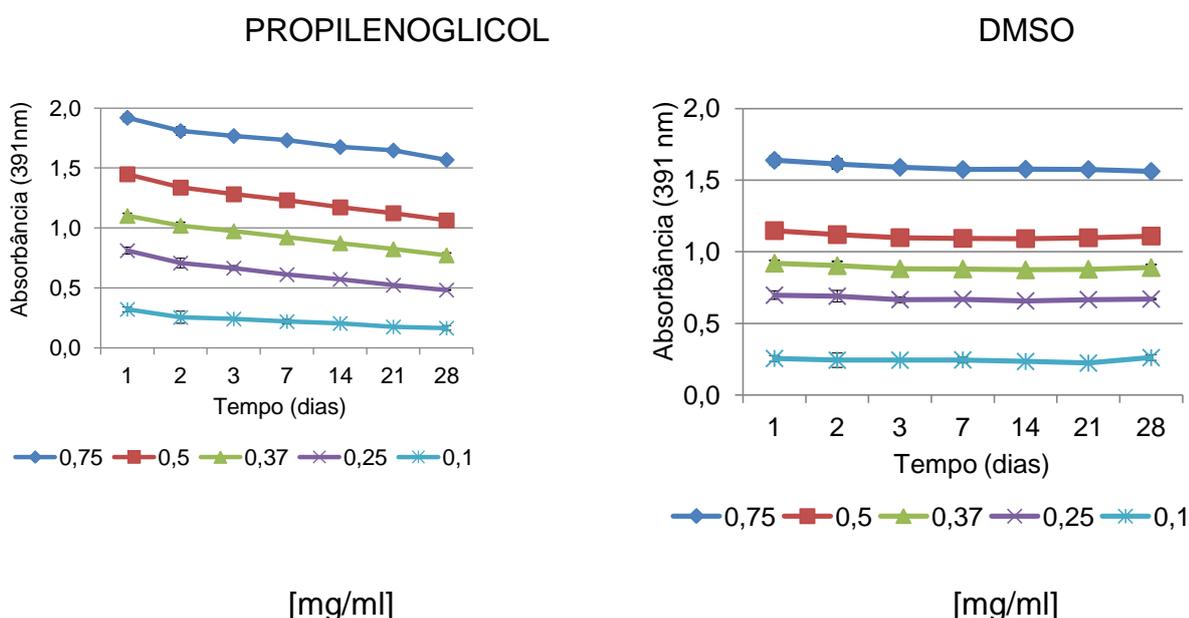
A análise de precisão da metodologia analítica validada (Figura 10) resultou em valores de desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 5%, o que está dentro dos valores aceitáveis. Soluções de paepalantina em propilenoglicol nas concentrações de 0,75; 0,5 e 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (DPR de 4,1; 0,7 e 2,1 % respectivamente) e paepalantina em DMSO (DPR de 1,8; 1,5 e 3,5% respectivamente).



**Figura 10** – Resultados do ensaio de precisão para as soluções de paepalantina em propilenoglicol e paepalantina em DMSO. Ensaio feito em triplicata ( $n=10$ ). \* = diferença significativa entre propilenoglicol e DMSO ( $p<0,05$ )

#### 4.3.4 Estabilidade

A análise de estabilidade foi realizada durante 28 dias comparando soluções de paepalantina preparadas em propilenoglicol pH 7,5 e DMSO (Figura 11), a partir de soluções estoque a 10mg/ml. Observou-se que a solução preparada com DMSO foi mais estável que a preparada com propilenoglicol com um decréscimo de apenas 2,3% nos valores de absorbância após os 28 dias de preparo, sendo que a solução preparada com propilenoglicol apresentou uma redução de 14,21% na absorção indicando uma menor estabilidade em relação ao DMSO.

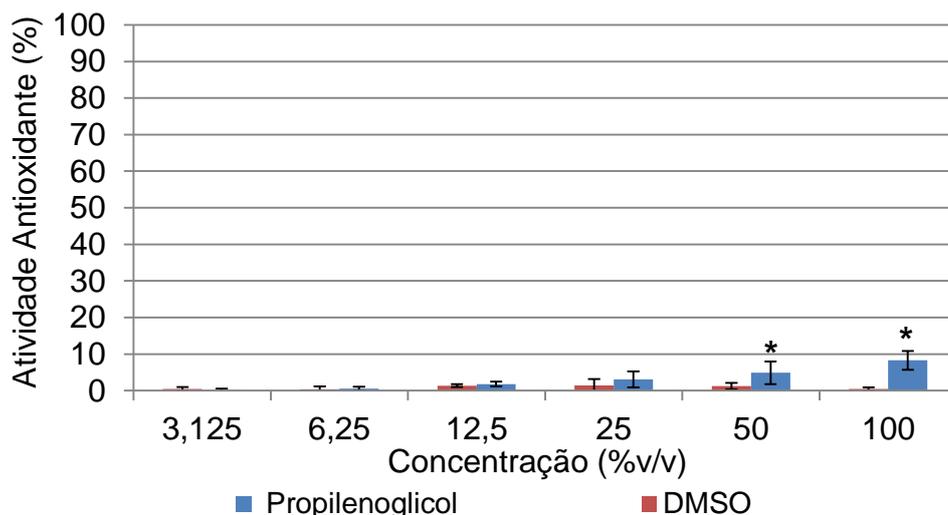


**Figura 11** – Estudo de estabilidade da paepalantina em função do tempo de estocagem. Solução de paepalantina em propilenoglicol e DMSO. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

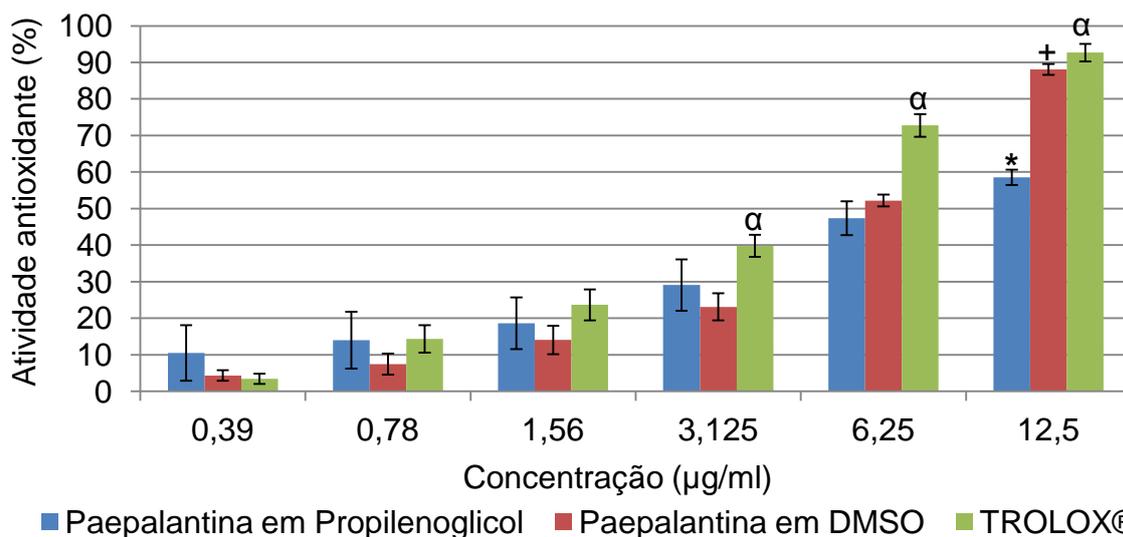
#### 4.4 Atividade antioxidante

##### 4.4.1 Atividade antioxidante frente ao radical DPPH

Os solventes propilenoglicol e DMSO não apresentaram interferência no ensaio (Figura 12). Os resultados apontam que a atividade antioxidante tanto da paepalantina em propilenoglicol como em DMSO são similares ao trolox (Figura 13). Os valores de CE50 foram considerados estatisticamente semelhantes. CE50 para paepalantina em propilenoglicol:  $5,45 \pm 1,09 \mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0,95$ ); CE50 para paepalantina em DMSO:  $6,12 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0,99$ ) e CE50 para TROLOX:  $5,24 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0,96$ ).



**Figura 12** – Resultado de atividade antioxidante frente ao radical DPPH expresso em % de atividade antioxidante *versus* % de volume de solvente na amostra. Ensaio feito em triplicata (n=3). \* = diferença significativa entre propilenoglicol e DMSO ( $p < 0,05$ )

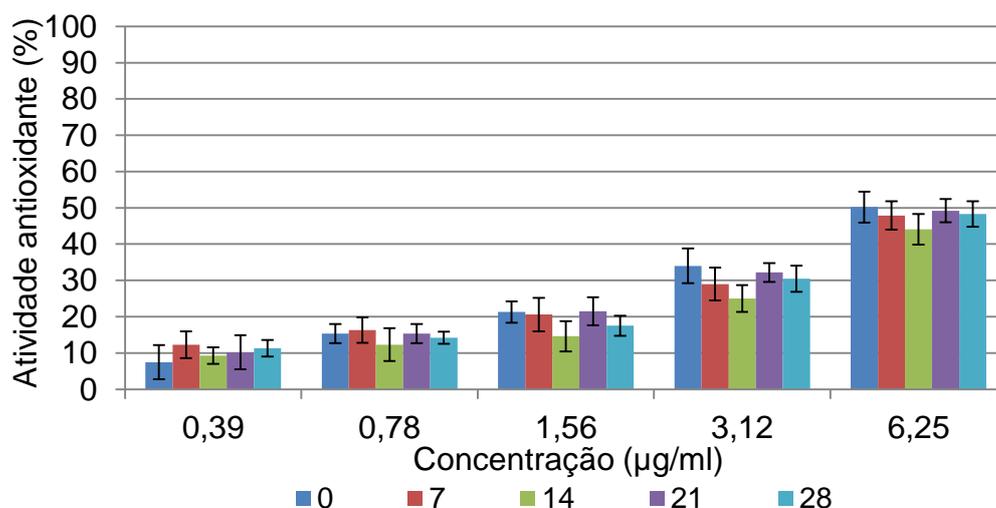


**Figura 13-** Resultados do ensaio de captura de radical DPPH expresso em % de atividade antioxidante *versus* concentração para a paepalantina em diferentes solventes e para o trolox. Ensaio feito em triplicata (n=3). \* = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e DMSO, + = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e trolox e  $\alpha$  = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em DMSO e trolox, ( $p < 0,05$ )

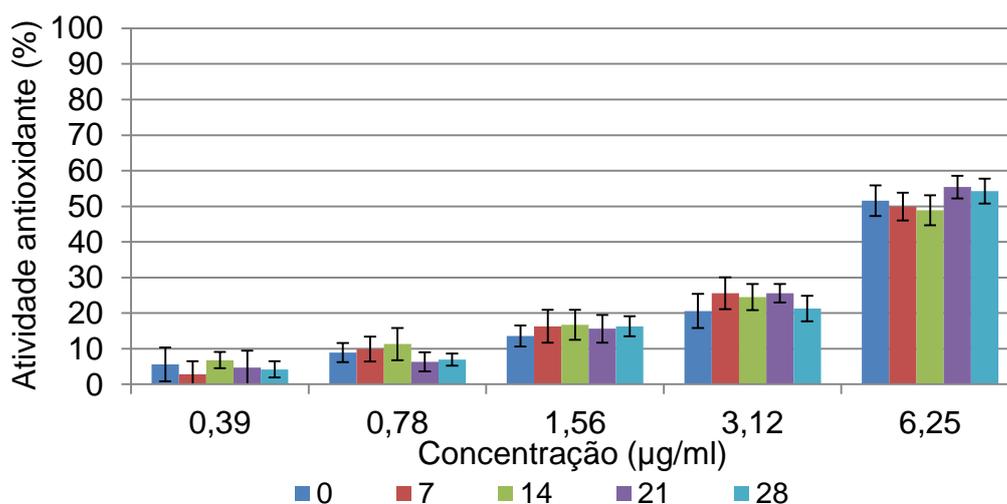
#### 4.4.1.1. Atividade antioxidante frente ao radical DPPH em função do tempo de estocagem das soluções de paepalantina em propilenoglicol e DMSO

Considerando os resultados do estudo de estabilidade da paepalantina em propilenoglicol e DMSO, os quais apontam um decréscimo no valor de absorção

para a solução de paepalantina em propilenoglicol de 14,21% e DMSO 2,3%, analisou-se a possibilidade de interferência desse resultado na atividade antioxidante das soluções frente ao DPPH em função do tempo de estocagem, os quais estão expressos na Figura 14 para solução de paepalantina solubilizada em propilenoglicol e Figura 15 para paepalantina em DMSO. Os resultados demonstram não haver interferência na atividade antioxidante da paepalantina em até 28 dias após o preparo das soluções, especialmente para propilenoglicol o qual apresentou uma redução maior da absorção no estudo de estabilidade.



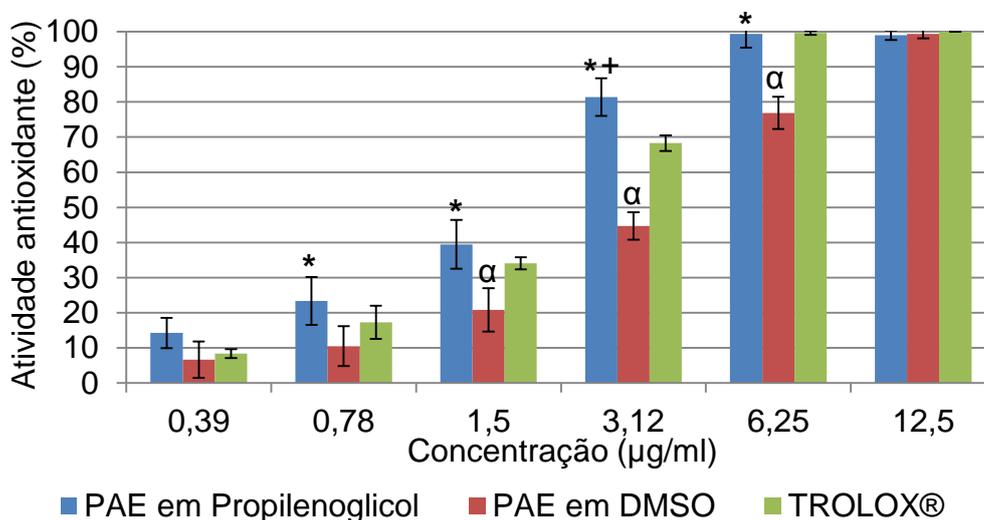
**Figura 14** – Efeito na atividade antioxidante da paepalantina solubilizada em propilenoglicol frente ao DPPH em função do tempo de estocagem (n=3).



**Figura 15** - Efeito na atividade antioxidante da paepalantina solubilizada em DMSO frente ao DPPH em função do tempo de estocagem (n=3).

#### 4.4.2 Atividade antioxidante frente ao radical ABTS

Os solventes propilenoglicol e DMSO foram avaliados preliminarmente, não apresentando interferência significativa nos ensaios. Os resultados de CE50 são similares para todas as amostras (Figura 16), resultando em valores de CE50 da paepalantina em propilenoglicol de  $2,42 \pm 1,62 \mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0,95$ ), paepalantina em DMSO de  $3,33 \pm 1,99 \mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0,99$ ) e para o TROLOX de  $1,62 \pm 1,89 \mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0,96$ ) os quais se apresentaram estatisticamente semelhantes. No entanto, na análise da porcentagem de atividade antioxidante das concentrações das amostras, paepalantina em propilenoglicol, paepalantina em DMSO e Trolox, pode-se observar uma maior atividade antioxidante da paepalantina em propilenoglicol comparada às demais, a partir da menor concentração testada ( $0,39 \mu\text{g/ml}$ ).

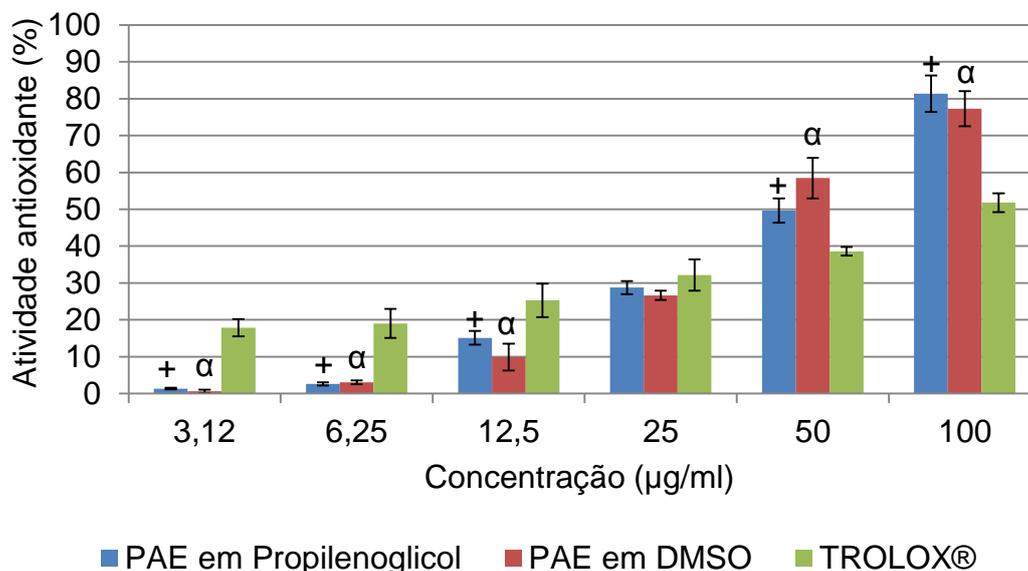


**Figura 16** – Resultados do ensaio de captura do radical ABTS para paepalantina em diferentes solventes e Trolox (n=3). \* = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e DMSO, + = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e trolox e  $\alpha$  = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em DMSO e trolox, ( $p < 0,05$ )

#### 4.4.3 Atividade antioxidante frente ao radical superóxido

Neste ensaio, a análise dos solventes demonstrou que ambos não interferem nos resultados com a paepalantina. A paepalantina tanto em propilenoglicol como em DMSO apresentou uma considerável atividade antioxidante frente ao ânion superóxido. Apesar de não ter sido possível calcular o CE50 em função da baixa linearidade, pode-se observar que a paepalantina possui atividade antioxidante

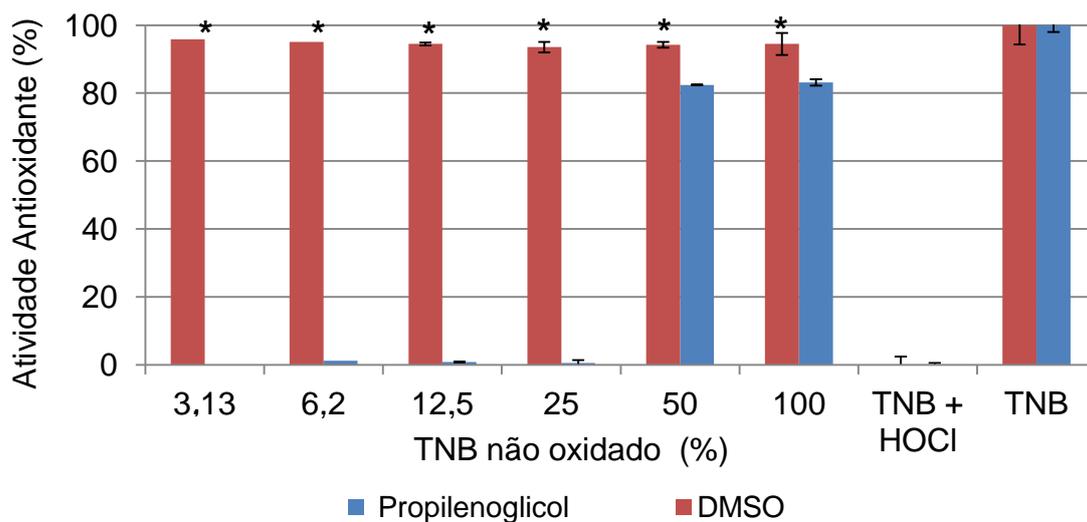
comparável ao Trolox, sendo até superior a partir da concentração de 50 µg/ml tanto para paepalantina em propilenoglicol como em DMSO (Figura 17).



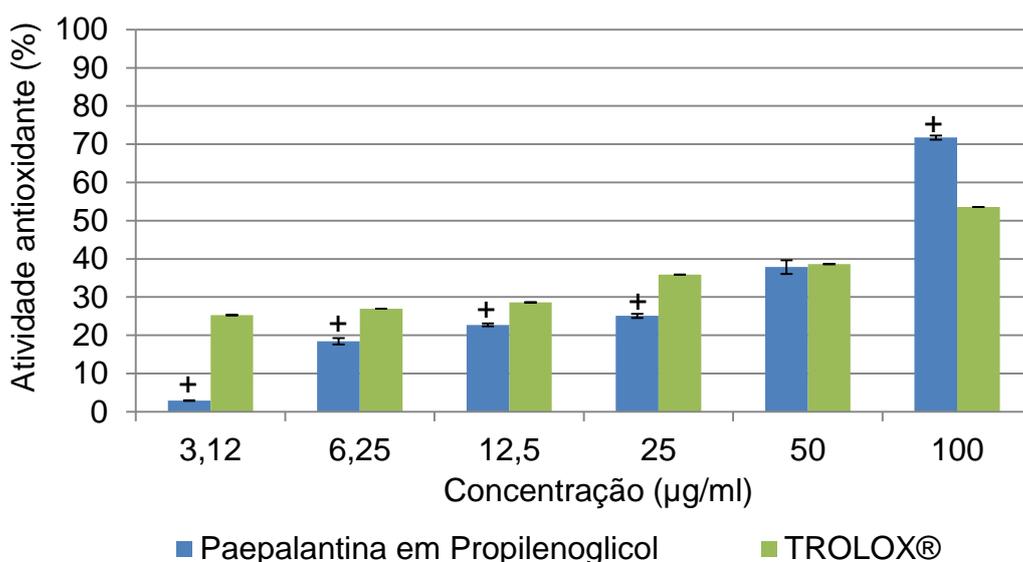
**Figura 17** - Resultados de atividade antioxidante frente ao radical superóxido para a paepalantina em propilenoglicol e DMSO e para o Trolox. (n=3). + = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e trolox e  $\alpha$  = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em DMSO e trolox, ( $p < 0,05$ )

#### 4.4.4 Atividade antioxidante frente ao ácido hipocloroso

Os ensaios preliminares com os solventes frente ao HOCl demonstraram um alto grau de interferência do DMSO (Figura 18). O propilenoglicol apresentou interferência apenas em concentrações acima de 5% (v/v) podendo ser utilizado para carrear a paepalantina no teste, em concentrações inferiores. Dessa forma, o ensaio antioxidante com HOCl foi conduzido apenas com paepalantina em propilenoglicol e Trolox, o qual mostra que não há diferença estatística entre paepalantina e Trolox na concentração de 50 µg/ml tendo inclusive uma atividade antioxidante superior na concentração de 100 µg/ml (Figura 19).



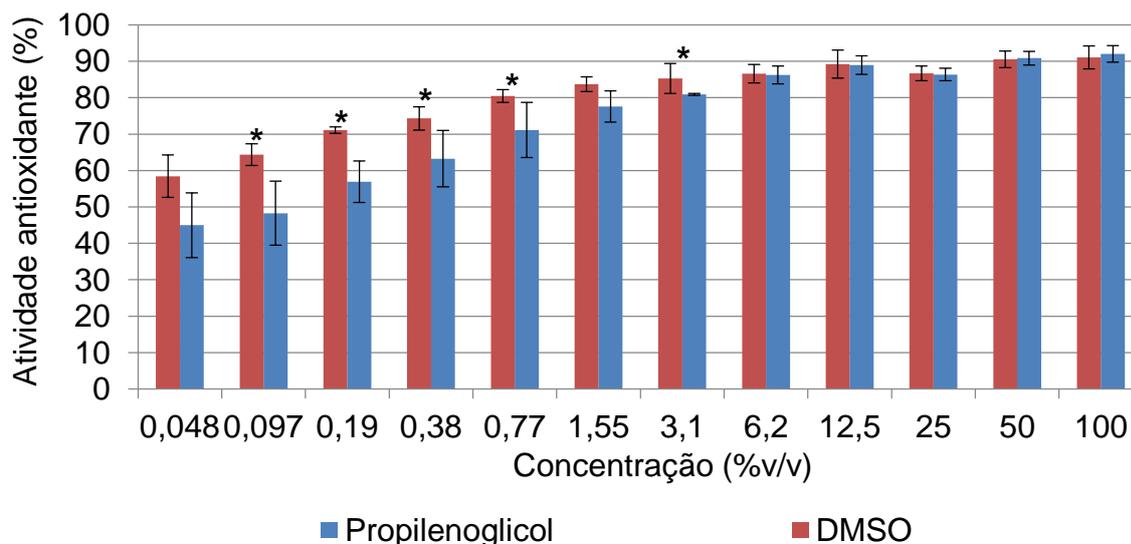
**Figura 18** - Efeito do propilenoglicol e o DMSO na captura de HOCl no sistema TNB/HOCl. \* = diferença significativa entre propilenoglicol e DMSO, ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19**- Atividade antioxidante frente ao ácido hipocloroso da paepalantina em propilenoglicol e do Trolox. + = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e trolox ( $p < 0,05$ )

#### 4.4.5 Atividade antioxidante frente ao radical hidroxil

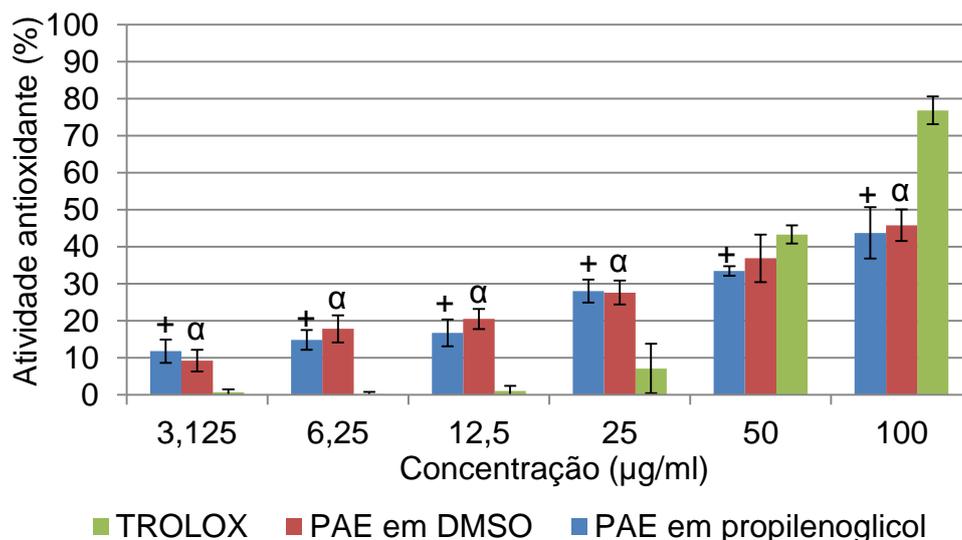
As análises preliminares realizadas com os solventes revelaram que ambos influenciam diretamente no resultado do ensaio (Figura 20). Sendo assim, não foi possível realizar o teste de captura de radical hidroxil para a paepalantina.



**Figura 20-** Resultados de atividade antioxidante frente ao radical hidroxil para o propilenoglicol e o DMSO. Análise feita em triplicata. \* = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e DMSO ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.6 Atividade antioxidante frente ao peróxido de hidrogênio

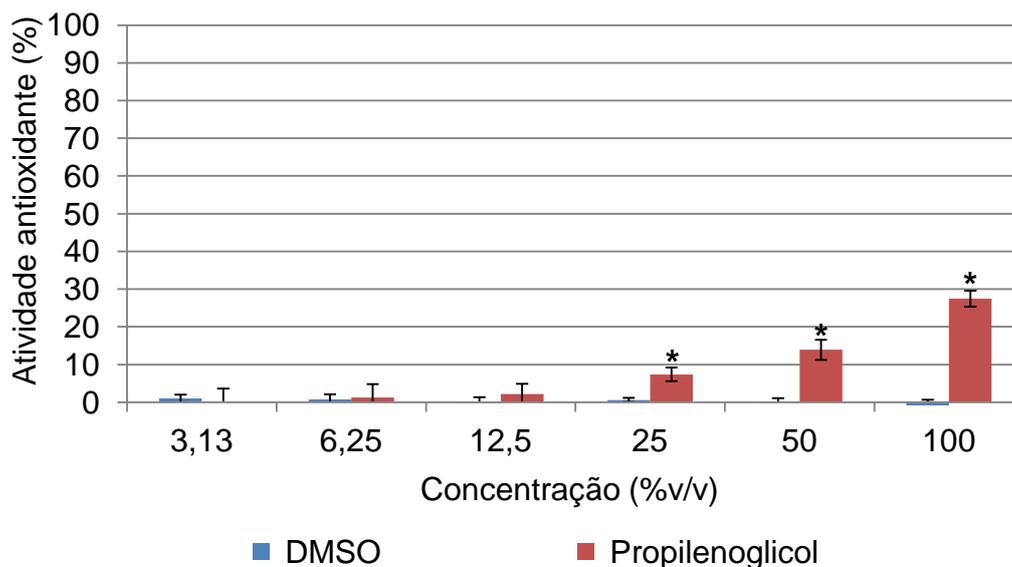
Neste ensaio, ambos os solventes não interferiram nos resultados. Nos resultados de captura de  $H_2O_2$  a paepalantina solubilizada tanto em propilenoglicol com DMSO apresentou maior efeito nas concentrações de 3,125 a 25  $\mu g/ml$  comparado ao Trolox. Na concentração de 50  $\mu g/ml$  não houve diferença estatística entre as amostras com porcentagem de inibição próxima a 40%. No entanto, na maior concentração testada, 100  $\mu g/ml$ , a paepalantina em ambos os solventes apresentou uma menor atividade antioxidante frente ao  $H_2O_2$  comparada com Trolox. De acordo com os resultados, não foi possível o cálculo do CE50 (Figura 21). A análise dos resultados com paepalantina solubilizada em propilenoglicol e DMSO demonstrou não haver diferença estatística significativa na captura do  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ ).



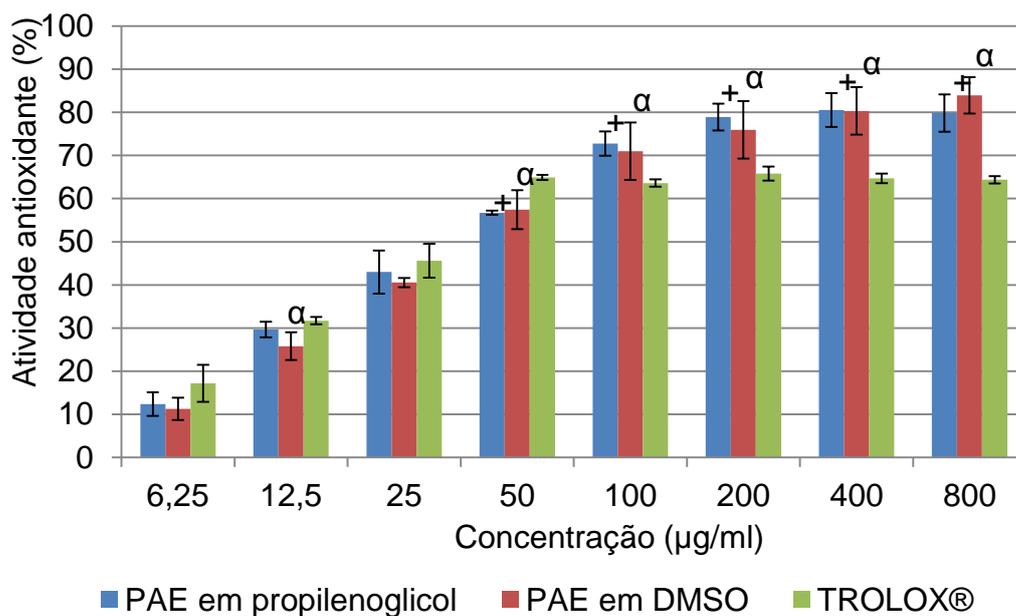
**Figura 21** - Efeito da paepalantina em diferentes solventes e Trolox na captura do  $H_2O_2$ . + = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e trolox e  $\alpha$  = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em DMSO e trolox, ( $p < 0,05$ )

#### 4.4.7 Atividade antioxidante frente ao óxido nítrico

A análise dos solventes neste ensaio demonstra que tanto propilenoglicol como DMSO não interfere nos resultados até a concentração de 12,5% (v/v). Os resultados de atividade antioxidante da paepalantina frente ao óxido nítrico resultaram em um perfil de atividade muito similar ao trolox (Figura 22). Se utilizando do modelo estatístico de correlação logarítmica foi possível calcular a CE50 das amostras, que foi de  $37,5 \pm 3,5$  µg/ml para paepalantina em propilenoglicol ( $R_{yy} = 0,99$ ),  $40,1 \pm 4,4$  µg/ml para paepalantina em DMSO ( $R_{yy} = 0,99$ ) e  $35,2 \pm 3,7$  µg/ml para Trolox® ( $R_{yy} = 0,99$ ), não havendo diferença estatística entre os valores encontrados (Figura 23).



**Figura 22** – Efeito dos solventes propilenoglicol e DMSO na captura de NO. Valores expressos em porcentagem de atividade antioxidante. \* = diferença significativa entre propilenoglicol e DMSO ( $p < 0,05$ )

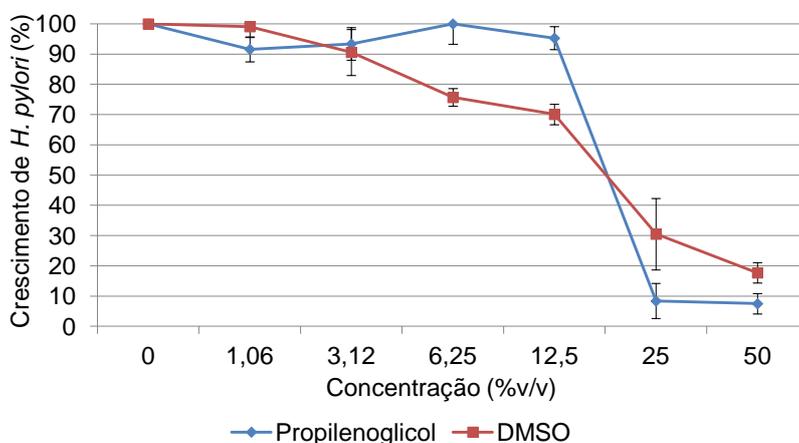


**Figura 23** – Efeito da paepalantina em propilenoglicol e DMSO e o Trolox na captura de óxido nítrico. Valores expressos em porcentagem de atividade antioxidante + = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em propilenoglicol e trolox e  $\alpha$  = diferença significativa entre paepalantina solubilizada em DMSO e trolox, ( $p < 0,05$ )

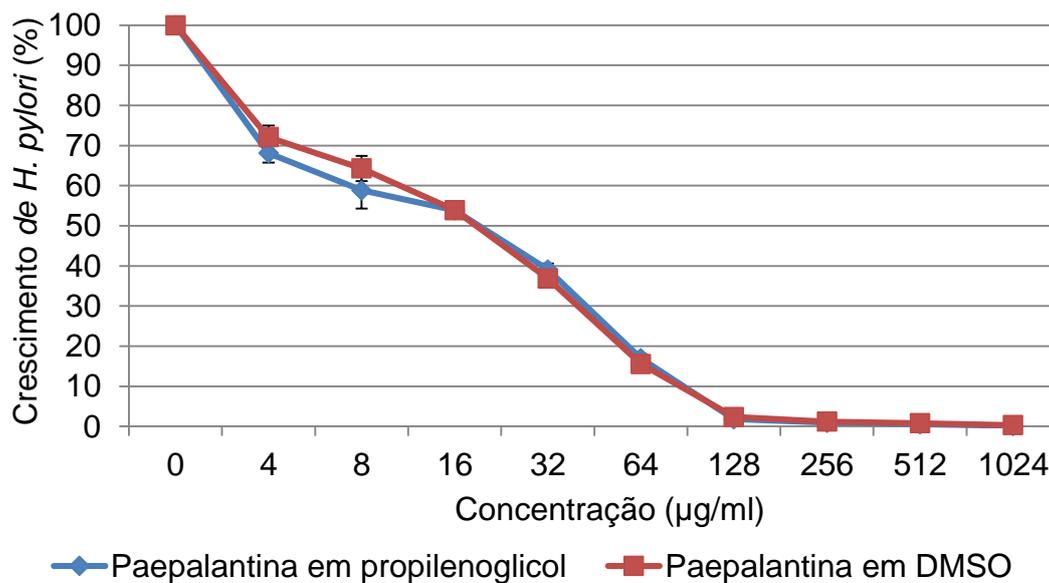
## 4.5 Atividade anti- *H. pylori*

### 4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima para *H. pylori*

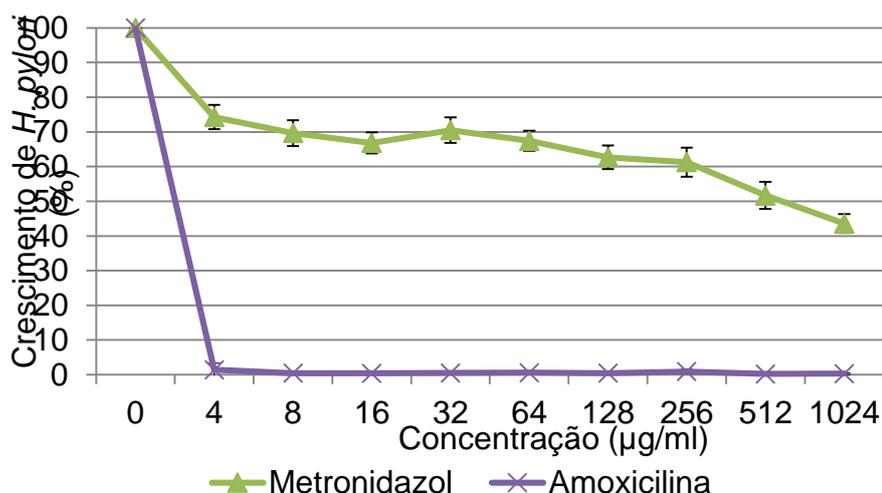
A Figura 24 mostra o efeito dos solventes propilenoglicol e DMSO sobre *H. pylori*, sendo que DMSO apresenta efeito inibitório a partir de 6,25% (v/v), com inibição de crescimento bacteriano próximo a 30%, enquanto que nesta mesma concentração, a viabilidade bacteriana é mantida cerca de 100% com propilenoglicol. Considerando como ponto de partida solução-mãe de paepalantina em propilenoglicol de 10 mg/ml e paepalantina em DMSO de 40 mg/ml, a concentração máxima de solvente utilizado neste ensaio foi de 2,56% e 0,64%, para propilenoglicol e DMSO, respectivamente, não interferindo nos resultados de viabilidade de *H. pylori* com a paepalantina. O efeito da paepalantina dissolvida em propilenoglicol e DMSO sobre *H. pylori* são mostrados na Figura 25. Os resultados apontam CIM de 128 µg/ml, tanto para paepalantina dissolvida em propilenoglicol quanto em DMSO. Considerando a característica da cepa de *H. pylori* utilizada neste estudo, amoxicilina sensível e metronidazol resistente, o efeito dos antibióticos sobre a bactéria é mostrado na Figura 26.



**Figura 24** - Efeito dos solventes propilenoglicol e DMSO no crescimento de *H. pylori* expresso em porcentagem de crescimento. Ensaio feito em triplicata (n = 3).



**Figura 25** – Efeito dose-resposta no crescimento de *H. pylori* para paepalantina dissolvida em propilenoglicol e DMSO. Análise feita em triplicata (n=3).



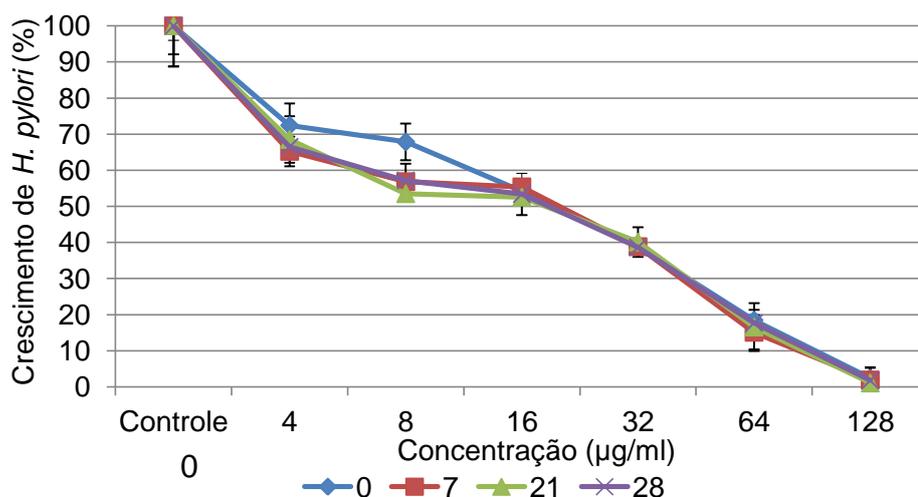
**Figura 26** - Efeito dose-resposta no crescimento de *H. pylori* para amoxicilina e metronidazol. Análise feita em triplicata (n=3).

#### 4.5.2. - Determinação da concentração inibitória mínima *in vitro* para *H. pylori* em função do tempo de estocagem de paepalantina

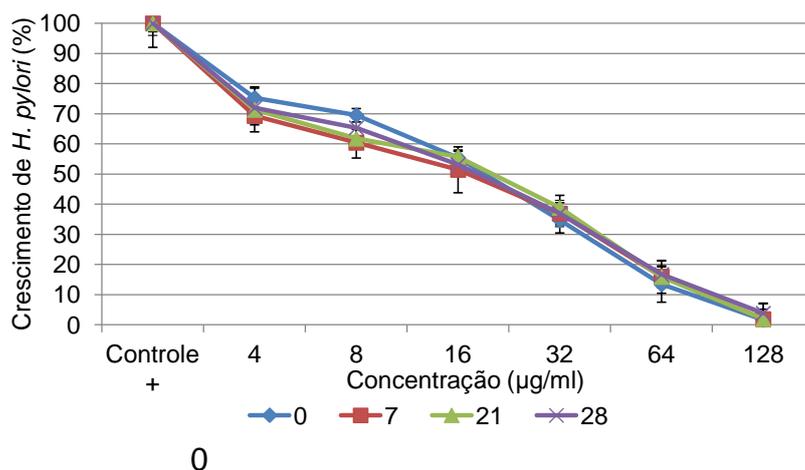
Analisando os resultados do estudo de estabilidade da paepalantina em propilenoglicol e DMSO mostrados na Figura 11 pode-se observar um decréscimo no valor de absorção para a solução de paepalantina em propilenoglicol de 14,21%

e DMSO de 2,3%. Em função disto, se avaliou a possibilidade de alterações de atividade das soluções frente ao *H. pylori* em função do tempo de estocagem, os quais estão expressos na Figura 27 para solução de paepalantina dissolvida em propilenoglicol e Figura 28 para paepalantina em DMSO.

Os resultados demonstram não haver interferência na atividade anti-*H. pylori* da paepalantina em até 28 dias após o preparo das soluções, mantendo a CIM em 128 µg/ml.



**Figura 27** - Curva de crescimento de *H. pylori* em diferentes concentrações de paepalantina solubilizada em propilenoglicol por tempo de estocagem (0 – 28 dias). Realizado em triplicata (n=30).



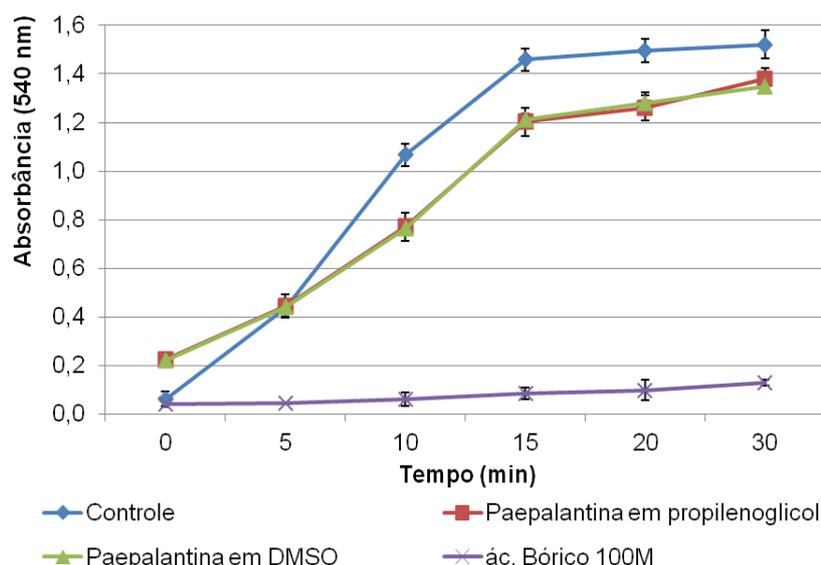
**Figura 28** - Resultado de crescimento de *H. pylori* em diferentes concentrações de paepalantina solubilizada em DMSO por tempo de estocagem (0 – 28 dias).

#### 4.5.3 Determinação da concentração bactericida mínima para *H. pylori*

A paepalantina apresentou valor para Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 256 µg/ml tanto solubilizada em propilenoglicol quanto em DMSO.

#### 4.5.4 Atividade sobre a enzima urease

A paepalantina apresentou baixa atividade para a enzima urease, com uma porcentagem de inibição de 12,3% tanto para paepalantina em propilenoglicol quanto para paepalantina em DMSO após 20 minutos de reação na maior concentração analisada (Figura 29). Ácido bórico demonstrou 96,2% de inibição. Não foi observada influência dos solventes (dados não mostrados).

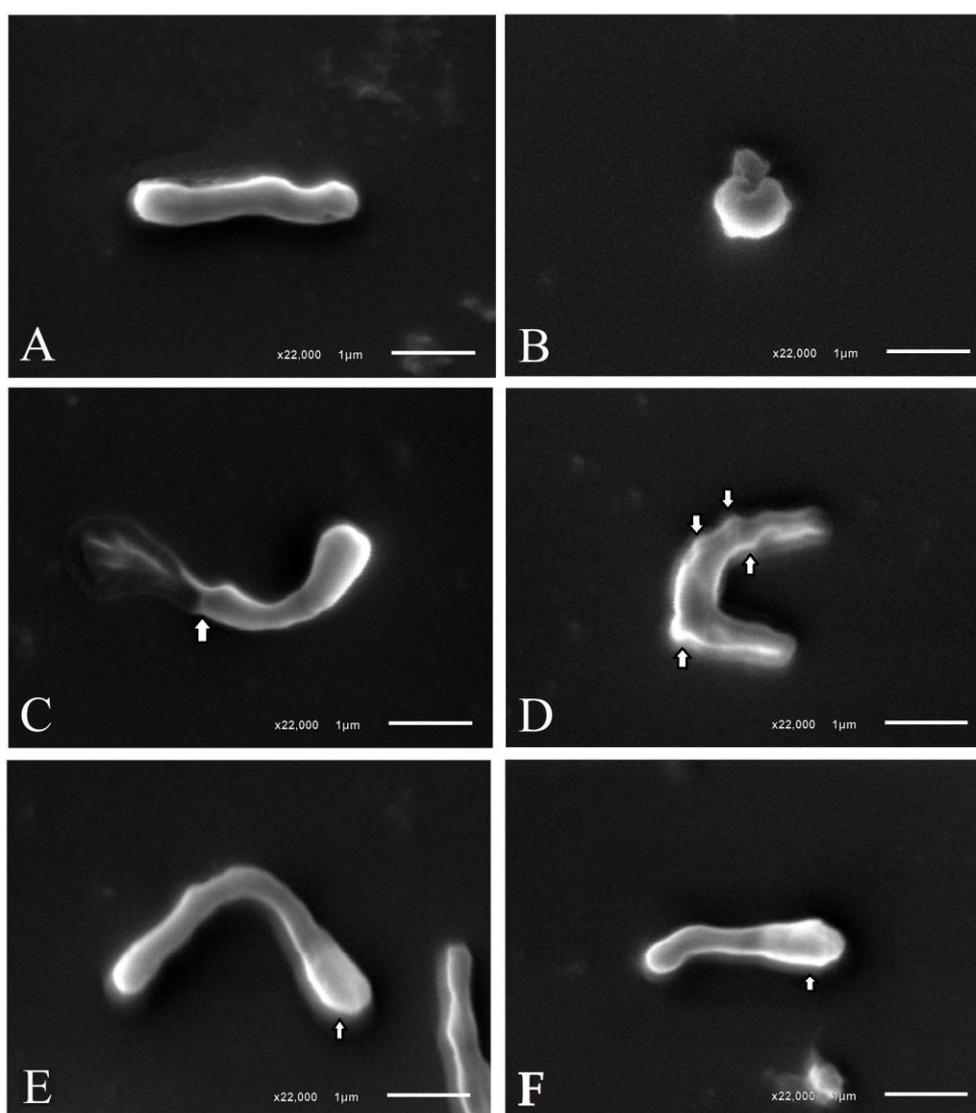


**Figura 29** - Atividade inibitória sobre a enzima urease da paepalantina na concentração de 1024 µg/ml tanto em propilenoglicol quanto em DMSO. Ácido bórico 100 mM como controle de inibição. Ensaio realizado em triplicata (n=3).

#### 4.5.5 Análise morfológica de *H. pylori* em CIM e sub-CIM de paepalantina por microscopia eletrônica de varredura

A Figura 30 mostra as micrografias da CIM e sub-CIM de paepalantina em propilenoglicol para *H. pylori* acompanhadas do controle de crescimento (controle positivo) por microscopia eletrônica de varredura. Podem ser observadas tanto para CIM como para sub-CIM alterações morfológicas consideráveis na forma e superfície

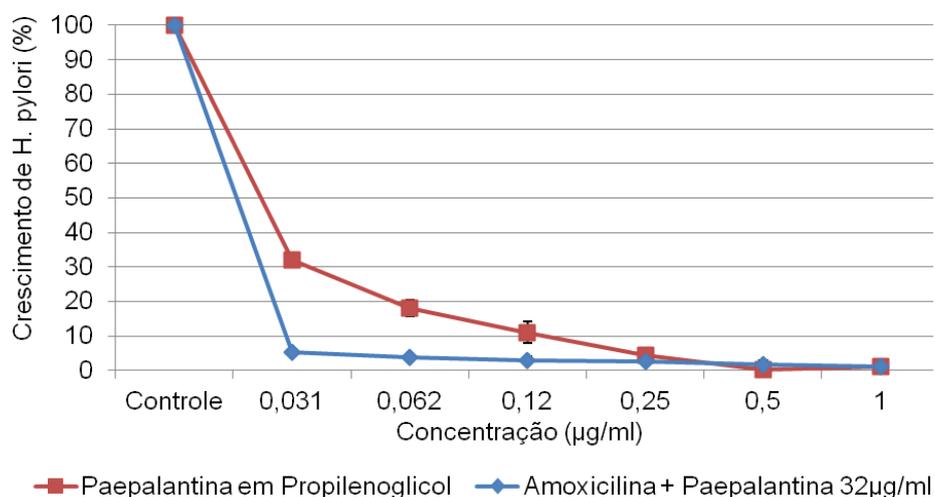
da bactéria comparadas ao controle positivo. Para as bactérias cultivadas na CIM de paepalantina, pode-se observar perda da forma espiralada para formas cocoides (Figura 30-B) e a ocorrência de extravasamento de conteúdo intracelular por rompimentos na membrana (Figura 30-C). As amostras cultivadas na sub-CIM apresentaram em geral tendência para forma cocóide em um dos polos e formas alongadas características e perda de capacidade de divisão celular (Figura 30-D, 30-E). Alterações na superfície de *H. pylori* também são observadas na sub-CIM de paepalantina com a formação de protuberâncias na membrana, relatadas na literatura como “blebs” (Figura 30-D) (De Loney & Schiller, 1999).



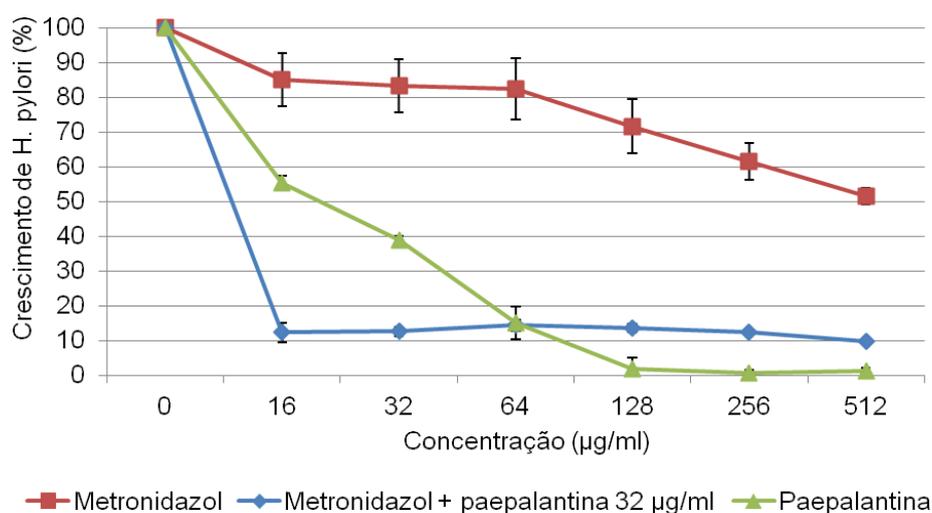
**Figura 30** - Fotomicrografias feitas via MEV para amostras de *H. pylori* cultivadas como controle positivo (A), CIM de paepalantina (B, C) e sub-CIM de paepalantina (D, E, F). As setas indicam alterações morfológicas, em C extravasamento celular, em D protuberâncias (blebs), em E e F polarização da densidade eletrônica.

#### 4.5.6 Efeito sinérgico da sub-CIM de paepalantina com os antibióticos amoxicilina e metronidazol sobre *H. pylori*

A associação da paepalantina com amoxicilina e metronidazol resultou no implemento de atividade anti-*H. pylori* com ocorrência de sinergismo. Pode-se observar na Figura 31 que  $\frac{1}{4}$  de CIM (32  $\mu\text{g/ml}$ ) de paepalantina em associação com amoxicilina resultou no aumento de eficácia do antibiótico com a redução da CIM da amoxicilina de 0,25  $\mu\text{g/ml}$  para 0,031  $\mu\text{g/ml}$ . Os resultados da associação de paepalantina com metronidazol mostram CIM de 16  $\mu\text{g/ml}$ , caracterizando sinergismo importante visto que a cepa de *H. pylori* utilizada neste estudo ser metronidazol resistente (Figura 32).



**Figura 31** - Curva dose-resposta no crescimento de *H. pylori* na presença de amoxicilina e amoxicilina adicionada de  $\frac{1}{4}$  de CIM de paepalantina (32 $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 32** - Curva dose-resposta no crescimento de *H. pylori* para metronidazol, paepalantina e metronidazol adicionado de  $\frac{1}{4}$  de CIM de paepalantina (32 $\mu\text{g/ml}$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento farmacêutico de novos medicamentos algumas etapas são necessárias para que moléculas com atividade biológica recém-descobertas sejam declaradas seguras para uso em humanos. É necessário avaliar, além das características inerentes à ação farmacológica, o seu comportamento frente a adjuvantes que vão atuar melhorando a sua biodisponibilidade, bioavaliabilidade e assegurar a estabilidade da molécula. Este estudo de desenvolvimento galênico se inicia em etapas pré-clínicas através da determinação de suas características físico-químicas, sendo a solubilidade a principal delas (Issa & Ferraz, 2011).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS) criado por Amidon e colaboradores em 1995 tem como principais parâmetros a permeabilidade intestinal e a solubilidade, os quais considera fundamentais para absorção de princípios ativos e indica métodos para determinação de solubilidade *in vitro*, sendo alguns, inclusive, aprovados pela *Foods and Drugs Administration* (FDA). É recomendado que a determinação de solubilidade seja em condições de pH fisiológico (1 a 7,5) e a temperatura de 37°C e em diferentes solventes. Contudo, é comum nas etapas iniciais de pré-formulação a quantidade de material disponível ser restrita, principalmente em se tratando de metabólitos secundários extraídos de plantas, como a paepalantina, em função disto há a necessidade de se adaptar os estudos iniciais de solubilidade para pequenos volumes, o que demanda o planejamento correto do experimento com a adoção de equipamento adequado (Steele, 2001).

Neste contexto, solubilidade é uma das propriedades físico-químicas mais estudadas durante o processo de pré-formulação farmacêutica (Issa & Ferraz, 2011). É uma característica importante para o desenvolvimento de formulações líquidas já que uma correta determinação dos valores de solubilidade de uma molécula irá influenciar diretamente na estabilidade e qualidade do produto final. Mesmo em formulações sólidas e semi-sólidas também é importante, pois irá determinar a quantidade de fármaco que estará dissolvido e disponível nos sítios de absorção (Augustijns & Brewster, 2007).

O principal solvente com aplicação segura e inócua em humanos e, por consequência, o solvente ideal para a veiculação de fármacos, é a água.

Substâncias que apresentam baixa solubilidade em água tendem a apresentar taxas de diluição e de absorção também baixas durante a sua permanência no tubo digestivo ou mesmo uma tendência a cristalizar-se em soluções aquosas (Lobenberg et al., 2000). A paepalantina possui característica lipofílica sendo fracamente solúvel em água, o que implica em uma série de dificuldades para sua avaliação em estudos que dependem de sua interação com reagentes hidrofílicos, culturas celulares ou estudos em modelos animais.

O solvente comumente utilizado em pesquisas envolvendo produtos naturais e que tem sido a escolha em estudos anteriores, envolvendo a paepalantina, é o dimetilsulfóxido (DMSO). Por ser uma molécula anfótera, solubiliza tanto produto lipossolúvel quanto hidrossolúvel, facilitando a solubilidade de substâncias e extratos. No entanto, inúmeros estudos têm relatado interferências por parte deste solvente com efeitos tóxicos em vários tipos de cultura celular, microrganismos e modelos animais (Basch and Gadebusch, 1968; Jacob & Heschler, 1986; Vogin et al., 1970; Qi et al., 2008; Hanslick et al., 2009; Menorval et al. 2012; Yuan et al. 2014). Estudos também atestam que o DMSO possui atividade sequestrante frente a radicais livres como o hidroxil (Panganamala, 1976) o que demonstra interferência deste solvente em estudos de atividade antioxidante.

Neste contexto, avaliamos, no presente estudo, a solubilidade da paepalantina em outros solventes, além do DMSO, solvente que é comumente utilizado para os ensaios com este composto.

Inicialmente as amostras foram escolhidas em função dos valores das constantes dielétricas ( $\epsilon$ ), os quais representam o potencial do solvente de separar dois íons de carga oposta, sendo estes valores diretamente relacionados com a polaridade das soluções. Assim sendo, espera-se que quanto menor o valor de constante dielétrica, menor a polaridade do solvente e, conseqüentemente, maior a solubilidade de moléculas lipossolúveis como a paepalantina. Os resultados do estudo de solubilidade são expressos na Tabela 1 e mostram essa relação direta, considerando o propilenoglicol como solvente de menor de valor de  $\epsilon$  e melhor solubilidade comparado com glicerina e água. Com relação ao DMSO que possui  $\epsilon$  maior que propilenoglicol e solubiliza completamente a paepalantina, a capacidade de solubilizar esta molécula está relacionada com sua característica, pois trata-se de um solvente aprótico polar que possui capacidade de solubilizar uma ampla gama de substâncias, possui dois grupos metila os quais cedem elétrons por ligação sigma

( $\sigma$ ) a um átomo de enxofre o qual faz uma ligação do tipo  $sp^2$  com um átomo de oxigênio. A presença das metilas favorece a solubilidade de moléculas mais apolares, enquanto que o dipolo induzido no grupamento sulfidríla (S=O) faz com que este líquido seja de alta polaridade. Isto explica a solubilidade relativa da paepalantina em DMSO, apesar de sua baixa polaridade (Jacob & Heschler, 1986).

De acordo com os resultados, a paepalantina foi solúvel em propilenoglicol a 10 mg/ml, pH 7,5 e em DMSO em todas as concentrações avaliadas.

O incremento na solubilidade da paepalantina em pH 7,5 se deve ao fato da paepalantina ser uma molécula que possui característica fracamente ácida, ficando ionizada em pHs mais elevados, sendo solvatada mais facilmente, como ocorre com as demais cumarinas (Augustjins & Brewer, 2007).

Considerando o estudo de solubilidade, adicionalmente foram avaliados o perfil da paepalantina em propilenoglicol e DMSO na espectroscopia no UV, validação de método analítico espectrofotométrico e a estabilidade das soluções.

Na validação de método analítico espectrofotométrico, as soluções de paepalantina contendo propilenoglicol e DMSO apresentaram correlação linear, repetitividade e precisão. Para o estudo de estabilidade das soluções, paepalantina em DMSO foi considerada estável durante o período de avaliação (28 dias), enquanto que paepalantina em propilenoglicol apresentou redução de concentração no período (Figura 11). Tal fato nos conduziu ao estudo da interferência dos solventes, DMSO e propilenoglicol, no potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* da paepalantina. Para o estudo do potencial antioxidante foi utilizado o teste do DPPH, no qual se observou que não há alteração no potencial antioxidante da paepalantina durante o período, em ambos os solventes, propilenoglicol e DMSO (Figuras 14 e 15). O mesmo foi observado no ensaio anti-*H. pylori*, no qual não houve alteração significativa no perfil de crescimento ( Figuras 27 e 28) tanto para paepalantina solubilizada em DMSO como em propilenoglicol, demonstrando que as soluções de paepalantina se mantêm estáveis durante o tempo de estocagem, principalmente com relação a paepalantina em propilenoglicol com pH 7,5, demonstrando, provavelmente, não haver abertura do anel lactônico com a alcalinização da solução.

Adicionalmente, com o objetivo de validar o propilenoglicol como alternativa viável ao DMSO, avaliou-se o efeito da paepalantina em ambos os solventes e a

interferência destes nos demais ensaios antioxidantes, como também no ensaio anti-*H. pylori*.

Os resultados para os demais ensaios antioxidantes demonstram que DMSO atua no sequestro de radical hidroxil e ácido hipocloroso (HOCl), sendo que neste último, interfere em todas as concentrações analisadas, enquanto que propilenoglicol, interfere somente no ensaio do radical hidroxil.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Kabeya e colaboradores (2013) em relação ao HOCl. Alguns estudos sugerem que a presença do átomo de enxofre na molécula do DMSO favorece a sua oxidação pelo HOCl interferindo diretamente nos resultados (Peskin & Winterburn, 2001; Ruff et al., 2012). A interferência de ambos os solventes no ensaio de sequestro de radical hidroxil possivelmente seja em função de sua grande reatividade. Steiner & Babbs (1999) observaram que o DMSO possui alta afinidade pelo radical hidroxil levando a formação de ácido metanosulfínico, o qual pode ser utilizado inclusive para estimar a quantidade de radical hidroxil gerado (Scadutto, 1995).

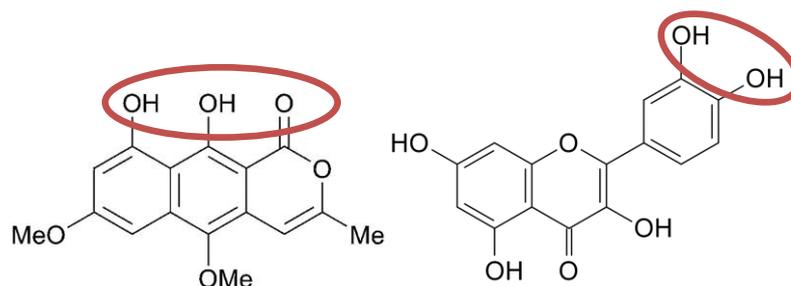
Os resultados sobre a influência dos solventes no ensaio anti-*H. pylori* mostraram que propilenoglicol foi menos tóxico em relação ao DMSO, não interferindo na viabilidade da bactéria em concentrações abaixo de 12,5% (v/v), ao contrário do DMSO que apresenta inibição de 30% no crescimento bacteriano nesta mesma concentração.

Desde a descoberta da paepalantina por Vilegas e colaboradores (1990), vários estudos vêm sendo conduzidos com essa isocumarina, destacando-se os para a atividade antioxidante (Kitagawa et al., 2003; Devienne et al., 2007) e antibacteriana (Devienne & Raddi, 2002; Devienne et al., 2005).

Alguns dos ensaios antioxidantes realizados neste trabalho ainda não foram descritos na literatura para a paepalantina e se correlacionam com as EROs envolvidas no *burst* oxidativo de neutrófilos durante a infecção por *H. pylori*.

De acordo com os resultados, paepalantina apresentou significativa atividade antioxidante frente as EROs avaliadas, comparada ao Trolox, com exceção ao peróxido de hidrogênio. Esta potente atividade antioxidante se deve a presença de hidroxilas na posição 9 e 10, as quais formam um arranjo catecólico, bem como uma estrutura planar, os quais são altamente favoráveis a deslocalização de elétrons; similar ao arranjo orto-difenólico no anel B de flavonoides, que é um requisito bem

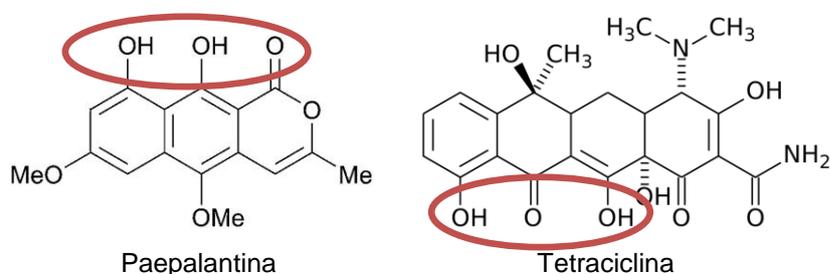
estabelecido para a atividade sequestradora de EROs por polifenóis (Figura 31) (Devienne, 2007, Tejero, 2007).



**Figura 33** - Comparação entre o arranjo ortodifenólico do flavonoide quercetina e paepalantina

Para a atividade anti-*H. pylori*, a paepalantina apresentou resultados significativos para CIM e CBM, considerando a resistência da bactéria a certos antibióticos como o metronidazol.

Estudos de estrutura-atividade realizados com cumarinas sugerem que a presença de atividade antimicrobiana esteja diretamente relacionada com a lipofilicidade e a estrutura planar da molécula (Kayser & Kolodziej, 1999), sendo provavelmente este caráter lipofílico o responsável pela fácil penetração e inserção nas membranas bacterianas (Rauckman, 1989). No caso da paepalantina, a combinação de hidroxilas nas posições 9 e 10 formando um sistema catecol, com a sua estrutura planar e característica lipofílica, são provavelmente os responsáveis por sua capacidade antibiótica (Vilegas et al., 1990; Devienne et al., 2005). O arranjo catecol associado ao oxigênio na posição 1 da paepalantina possui similaridade com o sistema oxigenado das posições 10, 11 e 12 das tetraciclinas (Figura 32), que agem inibindo a subunidade ribossomal 30S bacteriana, o qual pode ser o modo de ação da paepalantina (Chopra & Roberts, 2001).



**Figura 34** - Similaridade entre a paepalantina e a tetraciclina com áreas homólogas destacadas.

Outro possível mecanismo de ação se baseia nos antibióticos cumarínicos, como a novobiocina, que interagem com bactérias inativando a DNA girase. O núcleo cumarínico está diretamente relacionado com a atividade, formando duas pontes de hidrogênio com a arginina 136 da subunidade p24 da *gyrBa* qual é essencial para que aja inativação enzimática (Lewis, 1996). Dessa forma, sendo a paepalantina uma isocumarina, a possibilidade de atuação anti-*H. pylori* por este mecanismo também não poder ser descartado.

Adicionalmente a estes dados, a análise de alterações ultraestruturais por MEV na CIM e sub-CIM da paepalantina para *H. pylori* demonstrou a conversão para forma cocoide de *H. pylori* nestes valores de concentração, com ocorrência de rompimentos de membrana (Figura 30-C), perda da forma helicoidal característica, ocorrência de protuberâncias na membrana conhecidas na literatura como “blebs” (Figura 30-D) e ocorrência de formas filamentosas e com polarizações evidenciadas nas micrografias (Figura 30-E,F).

DeLoney e Schiller, 1999 avaliaram alterações morfológicas em *H. pylori* causadas por antibióticos betalactâmicos e observaram estas mesmas alterações estruturais as quais correlacionaram com a ligação preferencial dos antibióticos às *Penicillin-Binding Proteins* (PBP), que são enzimas envolvidas na síntese da camada de peptidoglicano que compõe a parede celular bacteriana incluindo transpeptidases, transglicosilases, endopeptidases e carboxipeptidases, como as PBP66, PBP63 e PBP60. A PBP63 está correlacionada com a formação de formas filamentosas e com a divisão do septo. Neste estudo, correlacionaram ainda a PBP60 e a PBP63 com a forma helicoidal da bactéria, estando ausente na forma cocoide, sendo associada à elongação e formação de septo. Berry e colaboradores (1995) observaram que em culturas de *H. pylori* tratadas com amoxicilina a uma concentração 10 vezes acima da CIM são observadas formas cocoides residuais. Estudos conduzidos com mais de uma cepa de *H. pylori* observou-se que a sua conversão da forma helicoidal para a cocoide é um processo passivo, que independe de síntese de proteínas pelo RNA, fortemente marcado por alterações ultraestruturais, grandemente influenciado pelo tratamento com antibióticos, sendo uma manifestação morfológica de morte da bactéria (Kusters et. al.; 1997).

Na busca por entender melhor o mecanismo de ação da paepalantina sobre *H. pylori* foi realizado estudo de sinergismo associando sub-CIM (32 µg/ml) de paepalantina com amoxicilina e metronidazol, antibióticos rotineiramente utilizados

no tratamento de *H. pylori*, o que resultou num aumento da eficácia dos antibióticos com a redução da CIM da amoxicilina de 0,25 µg/ml para 0,031 µg/ml e metronidazol com CIM de 16 µg/ml, fato importante, visto a cepa de *H. pylori* utilizada neste estudo ser metronidazol resistente. Calgaro-Helena e colaboradores (2006) observaram que a paepalantina se insere profundamente em membranas de mitocôndria, as quais são muito semelhantes a membrana celular em termos de lipídios, contendo majoritariamente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Sabe-se que a amoxicilina age sobre as PBPs e o metronidazol age oxidando o DNA, sendo mecanismos e sítios de ação diferentes e que dependem de uma boa difusão dos antibióticos pelo citoplasma. Com isto, uma hipótese é que a paepalantina esteja se inserindo nas membranas celulares de *H. pylori* causando desestabilização da mesma, o que poderia favorecer a ação de outros antibióticos por facilitar sua difusão, além de outros possíveis mecanismos receptor-específicos que a paepalantina possa apresentar, como interação com as PBPs, citado anteriormente.

Especificamente com relação ao sinergismo entre paepalantina e metronidazol, o mecanismo de resistência de *H. pylori* ao metronidazol envolve a diminuição da atividade enzimática de nitro-redutases que reduzem o grupo nitro do antibiótico a hidroxilamina, a qual interage com o DNA bacteriano (Mégraud, 1998). Dessa forma, sendo a paepalantina um forte agente antioxidante, o sinergismo com o metronidazol pode ser explicado pela possível redução do grupo nitro do metronidazol pela paepalantina, tornando-o ativo para atuar sobre o DNA bacteriano. No entanto, estudos posteriores mais aprofundados serão necessários para confirmar essas informações.

Em resumo, dados do presente estudo demonstram que o propilenoglicol pode ser uma alternativa ao uso do DMSO, o qual interfere em ensaios biológicos como os antioxidantes e os antimicrobianos, conduzindo a um desenvolvimento futuro de uma formulação com solvente compatível ao estudo pré-clínico e clínico e mais apropriado do ponto de vista tecnológico.

Adicionalmente, o potencial antioxidante da paepalantina, associado a uma importante atividade anti-*H. pylori* tornam esse composto um promissor candidato para o tratamento e prevenção de doenças causadas por *H. pylori*, pelo fato do estresse oxidativo causado pela resposta imune estar envolvido na patogênese da injúria gástrica causada por esta bactéria.

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados conduzidos neste estudo permite-nos concluir que :

1. Propilenoglicol solubiliza a paepalantina;
2. Solução de paepalantina em propilenoglicol se mantém estável durante o período de estocagem de 28 dias;
3. Propilenoglicol pode ser uma alternativa viável ao uso do DMSO para solubilizar a paepalantina;
4. Paepalantina possui potencial antioxidante comparável ao Trolox;
5. Paepalantina demonstra atividade anti-*Helicobacter pylori*;
6. Paepalantina apresenta ação sinérgica com amoxicilina e metronidazol contra *H. pylori*;

A capacidade antioxidante e anti-*H. pylori* reforçam a condução de estudos adicionais *in vitro* e *in vivo* para avaliar a paepalantina como agente na terapia de infecções por esta bactéria.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

AMIEVA, M.R.; EL-OMAR, E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 134, p. 306-23, 2008.

AUGUSTIJNS, P.; & BREWSTER, M.E. Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceutics. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. Ed. Springer, 2007.

BASCH, H.; GADEBUSCH, H.H. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide. **Applied Microbiology**, v. 12, p. 1953–1954, 1968.

BHARATE, S.S.; VISHWAKARMA, R.A. Impact of preformulation on drug development. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, p. 1239-1257, 2013.

BERESWILL, S.; NEUNER, O.; STROBEL, S.; KIST, M. Identification and molecular analysis of superoxide dismutase isoforms in *Helicobacter pylori*. **FEMS Microbiology Letter**, v.183, p. 241–245, 2000.

BERRY, V.; JENNINGS, K.; WOODNUTT, G. Bactericidal and morphological effects of amoxicillin on *Helicobacter pylori*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1859-1861, 1995.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C. ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BLASER, M.J.; ATHERON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 321–333, 2004.

CÁLGARO-HELENA, A.F.; DEVIENNE, K.F.; RODRIGUES, T.; DORTA, D.J.; RADDI, M.S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.S.; CURTI, C. Effects of isocumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: Uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemo-Biological Interactions**, v. 161, p. 155-164, 2006.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 65, p. 232-260. 2001.

DELONEY, C.R.; SCHILLER, N.L. Competition of various b-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: Antibacterial activity effects on bacterial morphology. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 43, p. 2702-2709, 1999.

DEVIIENNE, K.S.; RADDI, M.S. Screening of antimicrobial products using a microplaque photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 166-168, 2002

DEVIIENNE, K.; RADDI, M.S.; VARANDA, E. VILLEGAS, W. *In Vitro* Cytotoxicity of Some Natural and Semi-Synthetic Isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. **Naturforsch**, v. 57c, p. 85-88, 2005.

DI STASI, L.C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from capitula of *paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenosulfonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, p. 315-320, 2004.

CLSI, Norma M7-A6: **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: Norma aprovada, 6ªed, v. 20, n. 2, 2003.

DOKKEDAL, A.L.; SANO, P.T.; VILEGAS, W. Chemistry in *paepalanthus* and taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p. 503-504, 2004.

ERNST, P.B.; GOLD, B.D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 615–640, 2000.

EVANS, D.J.; EVANS, D.G.; TAKEMURA, T.; NAKANO, H.; LAMPERT, H.C.; GRAHAM, D.Y. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. **Infection and Immunity**. v. 63, p. 2213–2220, 1995.

EVERHART, J.E. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**. v. 29 , p. 559-78, 2000.

FASSBERG, J.; DTELLA, V.J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 81, p. 676 – 684, 1992.

FOX, J.G. The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. **Gut**, v. 50, p. 273–283, 2002.

FUNATOGAWA, K.; HAYASHI, S.; SHIMOMURA, H.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H.; HIRAI, Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, p. 251-261, 2004.

GACCHE, R.N.; JADHAV, S.G. Antioxidant activities and cytotoxicity of selected coumarin derivatives: preliminary results of a structure-activity relationship study using computational tools. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 4, p. 165-169, 2012.

GOODWIN, C.S. *Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. **Lancet**, v. 2, p. 1019-20, 1989.

GOODWIN, C.S. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. **Journal of Medical Microbiology**, v. 19, p. 257-67, 1985.

GOWTHAMARAJAN, K.; SINGH, S.K. Dissolution testing for poorly soluble drugs: A continuing perspective. **Dissolution Technologies**. v.17, p. 24-32, 2010.

GRAHAM, D.Y.; OPERKUN, A.R.; KLEIN, P.D. Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.16, p.292–294, 1993.

HAGEMAN, M. Preformulation designed to enable discovery and assess developability. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 90-100, 2010.

HANSLICK, J.L., LAU, K.; NOGUCHI, K.K.; OLNEY, J.W., ZORUMSKY, C.F.; MENNERICK, S.; FARBER, N.B. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. **Neurobiology of Disease** v. 34, p. 1–10, 2009.

HARDY, C.D.; COZZARELLI, N.R. Alteration of *Escherichia coli* Topoisomerase IV to novobiocin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, p. 941-947, 2003.

HELGELAND, L. The action of vitamin k and coumarin anticoagulants. **Biochemical Education** v. 8, p. 66–69, 1998.

HOEHNE, F.C. Outras monocotyledoneas toxicas ou suspeitas. In: HOEHNE, F.C.; **Plantas e substâncias vegetais toxicas e medicinais**. Graphicards, São Paulo/Rio de Janeiro, p. 97–98, 1939.

ISRAEL, D.A.; PEEK, R.M. Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. **Alimentary Pharmacology & Therapy**, v. 15, p. 1271-129, 2001.

ISSA, M.G.; FERRAZ, H.G. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. **Dissolution Technology**, v.18, p.6-13, 2011.

JACOB, S.W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. **Cryobiology**, v. 23, p. 14–17. 1986.

KABEYA, L.M.; ANDRADE, M.F.; PIATESI, F.; AZZOLINI, A.E.C.S.; POLIEZZO, A.C.M.; LUCISANO-VALIM, Y.M. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in hypochlorous acid and taurine chloramine scavenging assays: interference of dimethyl sulfoxide and other vehicles. **Analytical Biochemistry**, v. 437, p. 130-132, 2013.

KAISER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial activity of simple coumarins: Structural requirements for biological activity. **Naturforsch.** v. 54c, p. 169-174, 1999.

KANAMARU, T.; NAKANO, Y.; TOYODA, Y.; MIYAGAWA, K.; TADA, M.; KAISHO, T.; NAKAO, M. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 2455-2459, 2001.

KITAGAWA, R.R.; RADDI, M.S.G.; KHALIL, N.M.; VILEGAS, W.; FONSECA, L.M. Effect of the isocoumarin Paepalantine on the luminal and lucigenin amplified chemiluminescence of rat neutrophils. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p.905-908, 2003.

KULO, A.; SMITS, A.; NAULAERS, G.; HOON, J.; ALLEGAERT, K. Biochemical tolerance during low dose propylene glycol exposure in neonates: A formulation-controlled evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 50-51, 2012.

KUSTERS, J.G.; GERRITS, M.M.; VAN STRJP J.A.G.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. **Infection and Immunity**, v.65, p. 3672-3679, 1997.

KUSTERS, J.G.; VAN VLIET, A.H.; KUIPERS, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical Microbiology**, v.19, p.449-90, 2006.

LADEIRA, M.S.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopathology of *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Clinica Médica Laboratorial.**, v.39, p. 335-342, 2003.

LEE, J.H.; KIM, Y.G.; CHO, H.S.; RYU, S.Y.; CHO, M.H. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Phytomedicine**. v. 21, p. 1037-1042, 2014.

LEWIS, J.R.; SINGH, O.M.; SMITH, C.V.; SKARZYNSKI, T.; MAXWELL, A.; WONACOTT, A.M.; WIGLEY, D.B. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 1412-1420, 1996.

LEITÃO, G.G.; LEITÃO, S.G.; VILEGAS, W. Quick preparative separation of natural Naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. **Naturforsch**, v. 57, p.1051-1055, 2002.

LIN, C.H.; TSAI, S.H.; CHEN, C.S.; CHANG, Y.C.; LEE, C.M.; LAI, Z.Y.; LIN, C.M. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1416-1425, 2008.

LOBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 3-12, 2000.

LOPES, A.I.; VALE, F.F.; OLEASTRO, M. *Helicobacter pylori* infection – recent developments in diagnosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 9299-9313, 2014.

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clinical Medicine**, v.2, p.147-152, vol. 2002.

MARSHALL, B.J.; ROYEE, H.; LINEAR, D.I.; GOODWIN, C.S.; PEARMAN, J.W.; WARREN, J.R.; ARMSTRONG, J.A. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. **FEMS microbiology Letters**, v. 25, p.83–88, 1984.

MCCOLL, K. E. Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. The **New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 1597-604, 2010.

MEGRAUD, F. Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. **Drugs**, v. 64, p.1893–1904, 2004.

MEGRAUD, F.; LAMOULIATTE, H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. **Alimentary Pharmacology 7 therapeutics**, v. 17, p. 1333–1343, 2003.

MEGRAUD, F. Strategies to treat patients with antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 507–509, 2000.

MÉNORVAL, M.A.; MIR, L.M.; FERNÁNDEZ, M.L.; REIGADA, R. Effects of dimethylsulfoxide in cholesterol-containing lipids membranes: a comparative study experiments in silico and with cells. **PLoS ONE**, v.7, p. 1–12, 2012.

MURRAY, R.D.H. **Naturally Occurring Plant Coumarins**. New York: Springer-Verlag/Wien, p. 200-209, 1978.

MURRAY, R.D.H. **Coumarins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer-Verlag, v. 58, p. 84-316, 1991.

NELSEN, J.L.; HAAS, C.E.; HABTEMARIAM, B.; KAUFMAN, D.C.; PARTRIDGE, A.; WELLE, S.; FORREST, A.A. Prospective evaluation of propylene glycol clearance and accumulation during continuous-infusion lorazepam in critically ill patients. **Journal Intensive Care Medicine**, v. 23, p. 184–194, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1081 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2016.

NICHOLLS, P.; FITA, I.; LOEWEN, P.C. Enzymology and structure of catalases. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 14, p. 10-17, 2000.

NILSSON, C; SILLEN, A; ERIKSSON, L; STRAND, M.L.; ENROTH, H.; NORMARK, S.; FALK, P.; ENGSTRAND, L. Correlation between cag pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori* associated gastroduodenal disease. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6573–6581, 2003.

OLCZAK, A.A.; SEYLER, R.W.; OLSON, J.W.; MAIER, R.J. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 580–583, 2003.

O'ROUKE, E.J.; CHEVALIER, C.; PINTO, A.V.; THIBERGE, J.M.; LELPI, L.; LABIGNE, A.; RADICELLA, J.P. Pathogen DNA as target for host-generated oxidative stress: role for repair of bacterial DNA damage in *Helicobacter pylori* colonization. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 2789–2794, 2003.

O'TOOLE, P.W.; LANE, M.C.; PORWOLLIK, S. *Helicobacter pylori* motility. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1207-14, 2000.

PANGANAMALA, R.V.; SHARMA, H.M.; HEIKKILA, R.E.; GEER, J.C.; CORNWELL, D.G. Role of hydroxyl radical scavengers dimethyl sulfoxide, alcohols and methional in the inhibition of prostaglandin biosynthesis. **Prostaglandins**, v. 11, p. 599-607, 1976.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M.S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 204-7, 2015.

PAYA, M.; HALLYWELL, B.; HOULT, J.R.S. Interaction of a series of coumarins with reactive oxygen species. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 205-214. 1992.

PAYA, M.; GOODWIN, P.A.; HERAS, B.; HOULT, J.R.S. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity off a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**. v. 48, p. 445-451, 1994.

PESKIN, A.V.; WINTERBOURN, C.C. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 5, p. 572-579, 2001.

PIACENTE, S.; SANTOS, L.C.; MAHMOOD, N.; ZAMPELLI, A.; PIZZA, C.; VILLEGAS, W. Naphthopyranone Glycosides from *Paepalanthus microphyllus* **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 680-682, 2001.

PHADNIS, S.H.; ILVER, D.; JANZON, L. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori* cytotoxic activity. **Infection & Immunology**, v. 62, p.1557–1565, 1994.

QI, W.; DING, D.; SALVI, R.J. Cytotoxic effects of dimethyl sulphoxide (DMSO) on cholear organotypic cultures. **Hearing Ressearch**, v. 236, p. 52–60, 2008.

RAUCKMAN, B.S.; TIDWELL, M.Y.; JOHNSON, J.V.; ROTH, B. 2,4-Diamino-5-benzyl- pyrimidines and analogues as antibacterial agents. 10. 2,4-Diamino-5-(6-quinolyl-methyl)- and -[(tetrahydro-6-quinolyl)methyl]pyrimidine derivatives. Further specificity studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 1927-1935, 1989.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química nova**. v.25, p. 533-538, 2002.

ROUT, S.P.; CHOUDARY, K.A.; KAR, D.M.; DAS, L.M.; JAIN, A. Plants in traditional medicinal system - Future sources of new drugs. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 1-23, 2009.

RUFF, F.; JALSOVSKY, I.; SZABÓ, D.; RÁBAI, J.; FARKAS, O.; KUCSMAN, A. Mechanism for the reactions of sulfides and sulfoxides with hypochlorites: Racemization and oxygen exchange of oxysulfonium salts and sulfoxides. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 25, p. 1086-1096, 2012.

RUFINO, M.M.S.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-GIMENEZ, J.; CALIXTO-SAURA, F.G. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>**. EMBRAPA Agroindústria Tropical, comunicado técnico 128, 2007.

SANTOS, S.N.; CASTANHA, R.F.; HABER, L.L.; MARQUES, M.O.M.; SCRAMIM, S.; MELO, I.S.; **Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH**. EMBRAPA Meio Ambiente, comunicado técnico 50, 2011.

SCADUTTO, R.C. Oxidation of DMSO and methanesulfinic acid by the hydroxyl radical. **Free Radical Biology Medicine**, v.18, p. 271-277, 1995.

SPETH, P.A.; VREE, T.B.; NEIELEN, N.F.; DE MULDER, P.H.; NEWELL, D.R.; GORE, M.E.; DE PAUW, B.E. Propylene glycol pharmacokinetics and effects after intravenous infusion in humans. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.9, p. 255–258, 1987.

STEELE, G. Preformulation predictions for small amounts of compound as an aid to candidate drug selection. Em: GIBSON, M.; **Pharmaceutical Preformulation and Formulation**. Florida: Taylor & Francis, 2001.

STEINER, M.G.; BABBS, C.F. Quantitation of the Hydroxyl Radical by Reaction with Dimethyl Sulfoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 278, p. 478-81, 1990.

STENT, A.; EVERY, A.L.; SUTTON, P. Helicobacter pylori defense against oxidative attack. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v.302, p. G579-G587, 2012.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Ed Atheneu, 2002.

TAVARES, D.C.; VARANDA, E.A.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.; TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine in vivo and in vitro mammalian systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p.115-120, 1999.

TEJERO, I.; GONZÁLEZ-GARCIA, N.; GONZÁLEZ-LAFONT, A.; LLUCH, J.M. Tunneling in green tea: understanding the antioxidant activity of catechol-containing compounds. A variational transition-state theory study. **Journal of American Chemistry Society**, v. 129, p. 5846-5854, 2007.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; BASTOS, M.L. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Journal of Food Chemistry**, v.50, p. 4989-4993, 2002.

VARANDA, E.A.; RADDI, M.S.G.; DIAS, F.L.; ARAUJO, M.C.P.; GIBRAN, S.C.A.; TAKAHASHI, C.S.;VILEGAS, W. Mutagenic and Cytotoxic Activity of an Isocoumarin (Paepalantine) Isolated From *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v.17, p.85–95, 1997.

VARANDA, E.A.; DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; FURUYA, E.M.; VILEGAS, W. Mutagenicity of paepalantina dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.109-114, 2004

VILEGAS, W.; ROQUE, N.F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A.M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299-2301, 1990.

VOGIN, E.E.; CARSON, S.; CANNON, G.; LINEGAR, C.R.; RUBIN, L. Chronic toxicity of DMSO in primates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 16, p. 606–612, 1970.

WANG, G.; ALAMURI, P.; MAIER, R.J.: The diverse antioxidant systems of *Helicobacter pylori*. **Molecular Microbiology**, v.61, p. 847-860, 2006.

WANG, G.; CONOVER, R.C.; BENOIT, S.; OLCZAK, A.A.; OLSON, J.W.; JOHNSON, M.K.; MAIER, R.J. Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation. the **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 51908–51914, 2004.

WANG Q.; MA D.; HIGGINS J.P. Analytical method selection for drug product dissolution testing. **Dissolution Technologies**, v.44, p. 6-13, 2006.

WANG, G.; HONG, Y.; JOHNSON, M.K.; MAIER, R.J. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: Protective roles of peroxiredoxins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1596–1603, 2006.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, v.16, p. 1311–5, 1984.

WHITE, E.A.; ORAZEM, M.E.; BUNGE, A.L. Characterization of damaged skin by impedance spectroscopy: chemical damage by dimethyl sulfoxide. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 2607–2614, 2013.

WOOD, Z.A.; SCHRÖDER, E.; HARRIS, J.R.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 28, p. 32-40, 2003.

WOODWARD, M.; MORRISON, C.; MCCOLL, K. An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 53, p. 175-81, 2000.

YUAN, C.; GAO, J.; GUO, J.; BAI, L.; MARSHALL, C.B.; CAI, Z.; WANG, L.; XIAO, M. Dimethylsulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1–9, 2014.

ZAR, T.; GRAEBER, C.; PERAZELLA, M.A. Recognition, treatment, and prevention of propylene glycol toxicity. **Seminars in Dialysis**, v. 20, p. 217–219, 2007.

ZHAO, H.; GAO, J.; ZHONGHUA, W.; WU, S. Quantitative detection of hydroxyl radicals in Fenton system by UV-vis spectrophotometry. **Analytical Methods**, v. 7, p. 5447, 2015.

## 8. APÊNDICE

**Tabela 2** - Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH para paepalantina em diferentes solventes e trolox expressos em porcentagem de inibição.

Concentração	Paepalantina em Propilenoglicol	Paepalantina em DMSO	TROLOX®
[µg/ml]	% de inibição	% de inibição	% de inibição
0,39	10,4 ± 5,6	4,3 ± 5,61	3,4 ± 4,1
0,78	14,0 ± 5,8	7,4 ± 5,82	14,3 ± 1,6
1,56	18,6 ± 5,7	14,0 ± 5,79	23,6 ± 2,5
3,125	29,0 ± 5,0	23,1 ± 5,05	39,7 ± 2,1
6,25	47,3 ± 4,6	52,2 ± 4,64	72,7 ± 2,1
12,5	58,5 ± 2,1	88,7 ± 2,10	92,6 ± 0,9

Média ± desvio padrão (n=3)

**Tabela 3** - Porcentagem de atividade antioxidante da paepalantina dissolvida em propilenoglicol, em diferentes concentrações, por tempo de estocagem para ensaio de DPPH.

Dias após o preparo da solução estoque					
µg/ml	0	7	14	21	28
0,39	7,5 ± 4,7	12,3 ± 3,7	9,3 ± 2,3	10,2 ± 4,7	11,3 ± 2,3
0,78	15,4 ± 2,7	16,3 ± 3,5	12,3 ± 4,5	15,4 ± 2,7	14,2 ± 1,7
1,56	21,3 ± 3,0	20,6 ± 4,6	14,6 ± 4,2	21,5 ± 3,9	17,5 ± 2,8
3,12	34,0 ± 4,8	29,0 ± 4,5	25,0 ± 3,7	32,2 ± 2,6	30,5 ± 3,6
6,25	50,2 ± 4,3	47,9 ± 3,9	44,1 ± 4,2	49,2 ± 3,2	48,3 ± 3,5

Média ± desvio padrão (n=3).

**Tabela 4** - Resultado de atividade antioxidante para o teste de DPPH para a paepalantina dissolvida em DMSO em diferentes concentrações e em diferentes dias após o preparo da solução estoque.

Dias após o preparo da solução estoque					
µg/ml	0	7	14	21	28
0,39	5,6 ± 3,5	2,8 ± 2,3	6,8 ± 2,7	4,7 ± 4,7	4,2 ± 2,3
0,78	8,9 ± 2,5	9,9 ± 3,5	11,3 ± 2,9	6,3 ± 2,7	6,9 ± 1,7
1,56	13,6 ± 4,7	16,3 ± 4,6	16,7 ± 3,5	15,6 ± 3,9	16,3 ± 2,8
3,12	20,6 ± 3,8	25,6 ± 3,7	24,5 ± 3,7	25,6 ± 2,6	21,3 ± 3,6
6,25	51,6 ± 2,9	49,9 ± 2,6	48,9 ± 2,6	55,4 ± 3,2	54,3 ± 3,5

Média ± desvio padrão (n=3).

**Tabela 5** - Atividade Antioxidante da paepalantina em diferentes solventes e trolox para o radical ABTS expressos em porcentagem de inibição (%)

<b>Concentração</b>	<b>Paepalantina em Propilenoglicol</b>	<b>Paepalantina em DMSO</b>	<b>TROLOX®</b>
[µg/ml]	% de inibição	% de inibição	% de inibição
0,39	14,2 ±4,3	6,6 ±5,2	8,3 ±1,3
0,78	23,3 ±6,8	10,4 ±5,7	17,2 ±1,6
1,56	39,4 ±6,9	20,7 ±6,2	34,1 ±1,7
3,12	81,4 ±5,4	44,7 ±3,9	68,2 ±2,2
6,25	99,3 ±3,9	76,9 ±4,6	99,7 ±0,5
12,5	99,1 ±1,3	99,3 ±1,2	99,9 ±0,01

Média ± desvio padrão

**Tabela 6** - Atividade Antioxidante frente o radical superóxido para a paepalantina em diferentes solventes e trolox expresso em % de inibição.

<b>Concentração</b>	<b>Paepalantina em Propilenoglicol</b>	<b>Paepalantina em DMSO</b>	<b>TROLOX®</b>
[µg/ml]	% de inibição	% de inibição	% de inibição
3,12	1,3 ±0,2	0,6 ±0,5	17,9 ±2,3
6,25	2,6 ±0,4	3,1 ±0,5	19,1 ±3,9
12,5	15,1 ±1,9	9,9 ±3,6	25,3 ±4,5
25	28,8 ±1,8	26,6 ±1,3	32,1 ±4,2
50	49,6 ±3,3	58,5 ±5,5	38,6 ±1,2
100	81,4 ±4,9	77,2 ±4,8	51,8 ±2,6

Média ± desvio padrão

**Tabela 7** - Percentual de TNB não oxidado pelo HOCl na presença de diferentes concentrações de paepalantina em diferentes solventes e trolox.

<b>Concentração</b>	<b>Paepalantina em Propilenoglicol</b>	<b>Paepalantina em DMSO</b>	<b>TROLOX®</b>
[µg/ml]	% de inibição	% de inibição	% de inibição
3,12	2,8 ±0,1	38,6 ±0,7	25,3 ±1,2
6,25	18,4 ±0,8	39,5 ±0,2	26,9 ±1,5
12,5	22,7 ±0,4	45,4 ±0,2	28,6 ±1,5
25	25,1 ±0,5	44,6 ±0,3	35,8 ±1,1
50	37,9 ±1,8	47,9 ±0,6	38,6 ±0,9
100	71,7 ±0,6	58,3 ±0,3	53,5 ±0,6

Média ± desvio padrão

**Tabela 8** - Porcentagem de inibição de diferentes concentrações de paepalantina em propilenoglicol e DMSO e o Trolox frente ao peróxido de hidrogênio.

<b>Concentração</b>	<b>Paepalantina em Propilenoglicol</b>	<b>Paepalantina em DMSO</b>	<b>TROLOX®</b>
[µg/ml]	% de inibição	% de inibição	% de inibição
3,13	11,8 ±3,1	9,3 ±2,1	0,7 ±0,8
6,25	14,9 ±2,7	17,8 ±2,7	0,2 ±0,6
12,5	16,7 ±3,6	20,5 ±2,1	1,1 ±1,4
25	28,1 ±3,1	27,6 ±2,3	7,1 ±6,7
50	33,5 ±1,3	36,9 ±4,3	43,3 ±2,4
100	43,7 ±6,9	45,8 ±2,9	76,8 ±3,8

Média ± desvio padrão (n=3)

**Tabela 9** - Efeito da paepalantina em propilenoglicol e DMSO no crescimento de *H. pylori* expressos em porcentagem de crescimento.

<b>Concentração</b>	<b>Paepalantina em Propilenoglicol</b>	<b>Paepalantina em DMSO</b>
[µg/ml]	% de crescimento	% de crescimento
4	68,1 ±2,4	72,1 ±1,9
8	58,8 ±4,5	64,3 ±3,2
16	53,8 ±0,9	53,9 ±1,6
32	39,1 ±0,5	36,9 ±1,1
64	16,9 ±1,1	15,5 ±1,1
128	1,8 ±0,3	2,3 ±0,8

Média ± desvio padrão (n=3)

**Tabela 10** - Atividade anti- *H. pylori* para solventes expressos em porcentagem de crescimento.

<b>Concentração</b>	<b>Propilenoglicol</b>	<b>DMSO</b>
% v/v	% de crescimento	% de crescimento
1,06	91,6 ±4,1	99,1 ±3,6
3,12	93,4 ±7,4	91,1 ±9,9
6,25	100 ±2,1	75,7 ±2,9
12,5	95,3 ±3,8	70,1 ±3,4
25	8,4 ±5,8	30,5 ±11,8
50	7,5 ±3,4	17,7 ±3,4

Média ± desvio padrão (n=3)

**Tabela 11** - Porcentagem de crescimento de *H. pylori* para paepalantina dissolvida em propilenoglicol por dias de estocagem das soluções.

Paepalantina em propilenoglicol								
	0		7		21		28	
$\mu\text{g/ml}$	% de crescimento							
4	72,4	$\pm 6,1$	65,2	$\pm 4,1$	68,5	$\pm 6,5$	66,5	$\pm 2,8$
8	67,9	$\pm 5,1$	56,8	$\pm 5,1$	53,5	$\pm 1,1$	57,2	$\pm 1,1$
16	54,2	$\pm 2,9$	55,4	$\pm 2,1$	52,5	$\pm 5,1$	53,4	$\pm 5,8$
32	38,8	$\pm 1,2$	38,8	$\pm 1,2$	40,1	$\pm 4,1$	38,6	$\pm 2,1$
64	18,5	$\pm 2,9$	15,1	$\pm 4,7$	16,6	$\pm 6,6$	17,7	$\pm 2,2$
128	2,4	$\pm 3,1$	1,9	$\pm 3,3$	1,1	$\pm 1,9$	1,8	$\pm 1,6$

Média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

**Tabela 12** - Porcentagem de crescimento de *H. pylori* para paepalantina dissolvida em DMSO para cada dia após o preparo da solução estoque.

Paepalantina em DMSO								
	0		7		21		28	
$\mu\text{g/ml}$	Média	d.p.	Média	d.p.	Média	d.p.	Média	d.p.
4	75,3	$\pm 3,7$	69,3	$\pm 2,9$	71,3	$\pm 7,2$	72,1	$\pm 2,7$
8	69,5	$\pm 2,2$	60,4	$\pm 4,9$	61,8	$\pm 3,2$	65,4	$\pm 4,1$
16	55,4	$\pm 2,2$	51,4	$\pm 7,6$	55,7	$\pm 2,3$	53,1	$\pm 2,7$
32	34,8	$\pm 4,2$	36,9	$\pm 3,6$	38,9	$\pm 4,1$	37,1	$\pm 4,4$
64	13,4	$\pm 5,9$	16,1	$\pm 3,5$	15,9	$\pm 5,4$	16,7	$\pm 4,4$
128	1,7	$\pm 5,6$	1,9	$\pm 3,3$	1,9	$\pm 0,6$	3,9	$\pm 3,1$

Média  $\pm$  desvio padrão (n=3)

**Tabela 13** – Resumo de valores de porcentagem de solvente que é carregado em cada ensaio de atividade antioxidante considerando solução estoque a 10 mg/ml.

$\mu\text{g/ml}$	Paepalantina % de solvente no volume de amostra					
	DPPH	ABTS	NBT	TNB	Peroxidase	NO
100	3	3	3	16	2	16
50	1,5	1,5	1,5	8	1	8
25	0,75	0,75	0,75	4	0,5	4
12,5	0,38	0,38	0,38	2	0,25	2
6,25	0,19	0,19	0,19	1	0,125	1
3,13	0,09	0,09	0,09	0,5	0,016	0,5

**Tabela 14** – Porcentagem de solvente carrado nos ensaios de cultura de *H. pylori* para diferentes concentrações de paepalantina preparadas a partir de soluções estoque em propilenoglicol a 10mg/ml e DMSO a 40mg/ml.

[Paepalantina] µg/ml	% de solvente no ensaio de <i>H pylori</i>	
	Propilenoglicol	DMSO
Limite máximo	12,5	3,12
1024	10,2	2,55
512	5,1	1,27
256	2,55	0,63
128	1,25	0,31
64	0,63	0,15
32	0,31	0,079
16	0,15	0,039
8	0,077	0,019
4	0,038	0,0098

**Tabela 15** - Resumo dos valores de CE50 que foram possíveis de ser calculados para paepalantina em diferentes solventes e trolox.

Radical Livre	CE50					
	Paepalantina em Propilenoglicol		Paepalantina em DMSO		Trolox	
DPPH	5,4	±1,1	6,2	±0,8	5,2	±1,9
ABTS	2,4	±1,6	3,3	±2	1,6	±1,9
NO	37,5	±3,5	40,1	±4,4	35,2	±3,7

Média ± desvio padrão (n=3)



# CERTIFICADO

## Certificamos que

O trabalho intitulado  
**POTENCIAL ANTI-Helicobacter pylori E ANTIOXIDANTE DA ISOCUMARINA PAEPALANTINA OBTIDA DE Paepalanthus bromelioides**

de autoria de  
**JOÃO PAULO LOUREIRO DAMASCENO; CRISTIANE DOS SANTOS GIUBERTI; RITA DE CÁSSIA GONÇALVES; RODRIGO REZENDE KITAGAWA**

apresentado na modalidade oral por  
**JOÃO PAULO LOUREIRO DAMASCENO**

no X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e V Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 16 a 19 de setembro de 2015.

**Petrolina, 19 de setembro de 2015.**

*Joelson Roberto Guedes de S. Almeida*

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
Presidente do Simpósio

*Laila S. Espindola*

Prof. Dra. Laila Salmen Espindola  
Presidente da Sociedade Brasileira de Farmacognosia

REALIZAÇÃO



APOIO





## Original Article

## Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*



João Paulo Loureiro Damasceno<sup>a</sup>, Cristiane dos Santos Giuberti<sup>a,b</sup>, Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves<sup>a,b</sup>, Rodrigo Rezende Kitagawa<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 May 2015

Accepted 13 July 2015

Available online 1 August 2015

## Keywords:

Antioxidant

Paepalantine

Preformulation

## ABSTRACT

Coumarins are phenolic compounds and have various biological properties, including antioxidant activity. The isocoumarin paepalantine, isolated from *Paepalanthus bromelioides* Silveira, Eriocaulaceae, exhibits a wide range of biological activities, including antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic properties. Studies on paepalantine often use dimethylsulfoxide as a solvent. However the dimethylsulfoxide interferes with antimicrobial, cytotoxic and antioxidant assays. Thus, this study aims to evaluate alternative solvents for paepalantine and evaluate their potential to interfere with antioxidant assays (ABTS<sup>•+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, HOCl). Of the selected solvents, propylene glycol had good solubility and remained stable throughout the study period. The results suggested that there is no interference from propylene glycol in antioxidant assays, while dimethylsulfoxide significantly interfered with the HOCl assay. The antioxidant assays showed that paepalantine demonstrated similar or even better antioxidant activity than Trolox. Thus, propylene glycol may be the solvent of choice for paepalantine, a compound that has significant biological potential.

© 2015 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.