



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
Universidade Federal do Piauí

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira

**Bioprospecção da bergenina isolada de *Peltophorum dubium*, com ênfase nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias: aporte para o desenvolvimento de novos fitomedicamentos**

Parnaíba – Piauí

2018

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira

**Bioprospecção da bergenina isolada de *Peltophorum dubium*, com ênfase nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias: aporte para o desenvolvimento de novos fitomedicamentos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal: Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas  
(*in memoriam*)

Parnaíba – Piauí

2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

O482b Oliveira, Guilherme Antônio Lopes de.

Bioprospecção da bergenina isolada de *Peltophorum dubium*, com ênfase nas propriedades antioxidante e anti-inflamatórias: aporte para o desenvolvimento de novos fitomedicamentos [manuscrito] / Guilherme Antônio Lopes de Oliveira. – 2018.

165 f. il. color.

Impresso por computador (printout).

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal: Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas (*in memoriam*)

1. Bergenina. 2. Antioxidante. 3. Anti-inflamatório. 4. Colite. 5. TNBS. I.  
Titulo.

CDD: 615.321

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNO:** GUILHERME ANTÔNIO LOPES DE OLIVEIRA

**TÍTULO DO PROJETO:** “Bioprospecção da bergenina isolada de *Peltophorum dubium*, com ênfase nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias: aporte para o desenvolvimento de novos fitomedicamentos.”

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Jand Venes Rolim Medeiros

**BANCA EXAMINADORA:**

**CONCEITO**

**ASSINATURA**

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros - UFPI  
(Presidente)

SATISFATORIO

Jand Venes Rolim Medeiros

Profa. Dra. Durcilene Alves da Silva - UFPI  
(Examinadora)

Satisfatório

Durcilene Alves da Silva

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira - UFPI  
(Examinador)

Satisfatório

Jefferson Soares de Oliveira

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho – UFPI  
(Examinador)

Satisfatório

José Delano Barreto Marinho Filho

Profa. Dra. Leiz Maria Costa Veras - UFPI  
(Examinadora)

Satisfatório

Leiz Maria Costa Veras

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 09 de Fevereiro de 2018.

**HORÁRIO:** 08:00h

**LOCAL:** Na sala de reuniões do Campus Ministro Reis Veloso - Parnaíba.

# Agradecimentos

À **Deus**, incomparável Pai, incomparável Amor incomparável Graça, “até aqui me ajudou o Senhor.” (1 Samuel 7.2);

Aos meus Pais, **Maria dos Remédios Lopes** e **Francisco José de Oliveira**, por todo o incentivo e por sempre acreditarem em mim;

À minha irmã **Thaís Emanuele** por todo apoio e compreensão;

Ao meu irmão **Itallo Gardiny**, por todo o apoio e por emprestar os ouvidos nos momentos de lamentações, meu irmão de sempre, para sempre!

Meu estimado orientador (*in memoriam*), **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas**. Desde a iniciação científica *voluntária* me fizestes descobrir um amor pela ciência ainda maior. Sempre vou levar o exemplo de profissionalismo, humildade e dedicação à pesquisa. Obrigado pela confiança, motivação, pela paciência, pelas críticas e elogios que sempre me impulsionaram a melhorar a cada dia.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros**, por me aceitar como orientando em um momento tão difícil deste trabalho. Também por ser exemplo de profissionalismo, humildade e dedicação à pesquisa, pela contribuição inestimável, confiança e paciência comigo. Meu muito obrigado!

Aos queridos que fizeram o Laboratório em Pesquisa Neuroquímica experimental (LAPNEX). Ciência não se faz sozinho! Em especial, **Pauline, Luciana, Amanda, Rusbene, Oskar, Keyla, Kátia e Júnior**, o LAPNEX foi muito importante para concluir esta etapa da vida.

Aos queridos que fazem o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Distúrbios Gastrointestinais (LAFIDG), por toda a atenção e disponibilidade incondicional. A colaboração de todos foi extremamente importante para este trabalho.

Às queridas do grupo de pesquisa Farmexclin do laboratório de farmacologia da Universidade de Sevilla, Espanha, por me receberem maravilhosamente bem, pela ajuda em todas as necessidades durante o período de doutorado sanduíche. **Profa. Dra. Catalina (Nina), Profa. Dra. Marina, Profa. Dra. Isabel, Ángeles** e **Luisa**. Agradeço também à **Azahara** e **Javi** por todos os momentos de descontração e enriquecimento do meu vocabulário espanhol e por algumas vezes me cederem de “forma escondida” alíquotas de anticorpos e LPS do grupo rival.

Aos meus amigos **Mizael Lima**, **Lucas Balbino** e **Aldenora Maria** por todas as colaborações a este trabalho;

Ao meu amigo **Ricardo Madeira** por toda a disponibilidade para ajudar nas correções das partes escritas na língua inglesa.

Ao **Prof. Dr. Jorge Maurício David**, por fornecer a molécula utilizada no trabalho.

À **Joilane** e **George**, amigos que o Lapnex e Renorbio me deram, agradeço por todos os momentos compartilhados.

Ao **ponto focal do RENORBIO** por todas as solicitações atendidas e aos professores do programa, todos tiveram um papel importante na minha formação.

Agradeço à **Universidade Federal do Piauí**, por ter me proporcionado um grande amadurecimento pessoal e profissional.

Às agências de fomento à pesquisa: **CAPES** - *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* e **FAPEPI** – *Fundação de Amparo à pesquisa do Piauí*. Agradeço pelo prezado apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradecimento especial ao **CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche na Universidade de Sevilla – Espanha.

**Confiam em Ti Senhor, aqueles que  
conhecem o teu nome; porque Tu, Senhor,  
não abandonas aqueles que te buscam”  
(Salmos 9.10).**

## LISTA DE FIGURAS

### **INTRODUÇÃO**

Figura 1 - Estrutura química da bergenina.....	18
--	----

### **REVISÃO DE LITERATURA**

Figura 2 - <i>Peltophorum dubium</i> .....	25
Figura 3 - Estrutura química e aspectos físico-químicos da bergenina.....	35

### **CAPÍTULO 1 - Bergenina isolada de *Peltophorum dubium*: isolamento, caracterização e atividades antioxidantes em sistemas biológicos e não biológicos**

Figura 1 - Projeção da bergenina por ORTEP.....	48
Figura 2 - Difração de Raio X com refinamento pelo método Rietveld .....	49
Figura 3 - Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier da bergenina.....	50
Figura 4 - Termograma de DSC da bergenina.....	51
Figura 5 - Capacidade antioxidante da bergenina contra o radical DPPH..	52
Figura 6 - Capacidade antioxidante da bergenina contra o radical ABTS..	53
Figura 7 - Capacidade antioxidante da bergenina contra a produção de íons nitrito.....	54
Figura 8 - Capacidade antioxidante da bergenina contra o radical hidroxila.....	55
Figura 9 - Potencial redutor da bergenina.....	56
Figura 10 - Capacidade da bergenina de quelar o Fe <sup>2+</sup> .....	57
Figura 11 - Capacidade da bergenina em inibir a hemólise.....	58
Figura 12 - Expressão da capacidade antioxidante da bergenina pela inibição da hemólise oxidativa.....	59
Figura 13 - Determinação dos níveis de GSH em eritrócitos após o	

tratamento com bergenina.....	60
Figura 14 - Análise da peroxidação lipídica em eritrócitos após o tratamento com bergenina.....	61
Figura 15 - Análise da correlação de Pearson para avaliar o parâmetro antioxidante da bergenina.....	62
Figura 16 - Possíveis mecanismos da ação antioxidante da bergenina na neutralização do radical R <sup>•</sup> (DPPH <sup>•</sup> , ABTS <sup>•+</sup> , OH <sup>•</sup> e L <sup>•</sup> ).....	66

***CAPITULO 2 - Bergenina isolada de *Peltophorum dubium* diminui a resposta inflamatória em macrófagos peritoneais de murinos estimulados por LPS pela via de sinalização Jak-STAT***

Figura 1 - Estrutura química da bergenina isolada de <i>P. dubium</i> .....	78
Figura 2 - Viabilidade celular em macrófagos peritoneais por SRB após o tratamento com bergenina e DMSO.....	79
Figura 3 - Efeitos da bergenina na produção de nitrito.....	80
Figura 4 - Análise densitométrica de iNOS.....	81
Figura 5 - Diminuição dos níveis de citocinas após o tratamento com bergenina em macrófagos estimulados por LPS.....	82
Figura 6 - Efeito da bergenina na expressão proteica de (A) I $\kappa$ B- $\alpha$ ; (B) MAPKs (ERK, JNK and p38) e (C) STAT3 em macrófagos estimulados por LPS.....	84

***CAPITULO 3 - Efeito preventivo da bergenina contra o desenvolvimento de colite aguda induzida por TNBS em ratos, estudo da inibição de mediadores inflamatórios e a modulação da via de sinalização do inflamassoma NLRP3 / ASC***

Figura 1 - Representação da aparência macroscópica da mucosa do cólon dos ratos.....	102
Figura 2 - Imagens dos cortes histológicos de tecido colônico de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida por TNBS e tratados com bergenina.....	103

<b>Figura 3 - Atividade da mieloperoxidase no tecido colônico de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida por TNBS e tratados com bergenia.....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 4 - Expressão das proteínas pSTAT-3, IκB-α, iNOS e COX-2 no tecido colônico de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida por TNBS e tratados com bergenia.....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 5 - Concentrações de IL-10 e IFNγ em ratos com colite aguda após tratamento com bergenia.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 6 - Efeitos do tratamento com bergenia na expressão de NLRP3 e ASC em ratos com colite aguda induzida por TNBS.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 7 - Efeitos do tratamento com bergenia na expressão de Pro-caspase 1 e caspase-1 no tecido colônico depois de ratos com colite aguda induzida por TNBS.....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 8 - Efeitos do tratamento com bergenia sobre os níveis de IL-1β e IL-18.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 9 - Efeito do tratamento com bergenia sobre o nível de caspase-11 no tecido colônico de ratos com colite aguda induzida por TNBS.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE TABELAS

### **REVISÃO DE LITERATURA**

**Tabela 1 - Principais atividades da bergenina descritas na literatura..... 36**

### ***CAPÍTULO 1 - Bergenina isolada de *Peltophorum dubium*: isolamento, caracterização e atividades antioxidantes em sistemas biológicos e não biológicos***

**Tabela 1 - Dados do NMR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  [500 MHz (1H) e 125 MHz (13C),  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), J (Hz)]..... 47**

**Tabela 2 - Dados cristalográficos da bergenina (Difração de RX)..... 48**

**Tabela 3 - Atribuições vibracionais de FT-IR da bergenina..... 50**

### ***CAPITULO 3 - Efeito preventivo da bergenina contra o desenvolvimento de colite aguda induzida por TNBS em ratos, estudo da inibição de mediadores inflamatórios e a modulação da via de sinalização do inflamassoma NLRP3 / ASC***

**Tabela 1 - Efeitos do tratamento com bergenina (12, 25 e 50 mg / kg) em parâmetros macroscópicos da colite em ratos induzida por TNBS..... 101**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azobis-2-amidinopropano
ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AINE	Anti-inflamatório não esteróide
ANOVA	Análise de Variância
CEEA	Comitê de ética em experimentação animal
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DII	Doença inflamatória intestinal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH <sup>•</sup>	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
E.P.M.	Erro padrão da média
EC <sub>50</sub>	concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERNS	Espécies reativas derivadas do nitrogênio
EROS	Espécies reativas derivadas do oxigênio
ET	Transferência de elétrons
GSH	Glutationa
HAT	Transferência de átomos
i.p.	Intraperitoneal
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-10	Interleucina - 10
IL-1 $\beta$	Interleucina - 1 $\beta$
IL-23	Interleucina - 23
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IV-TF	Infravermelho com Transformada de Fourier
L <sup>•</sup>	Radical lipídico
LPS	Lipopolissacarídeo

mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
RMN	Resonância magnética nuclear
SRB	Sulforronamida B
TBARS	Substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico
TNBS	Ácido 2,4,6-Trinitrobenzenesulfônico
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico

OLIVEIRA, G.A.L. **Bioprospecção da bergenina isolada de *Peltophorum dubium*, com ênfase nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias: aporte para o desenvolvimento de novos fitomedicamentos.** Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros. 2018. 165p. Tese de doutorado - Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí.

## RESUMO

A utilização de substâncias naturais e o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais têm aumentado substancialmente a cada ano em todo o mundo, levando a trocas interculturais e a difusão do uso de técnicas biotecnológicas e de produtos terapêuticos naturais. Uma substância promissora para ser usada na medicina é a bergenina, uma molécula derivada do ácido gálico. Ela é o componente majoritário do extrato etanólico das raízes de *Peltophorum dubium*, conhecida popularmente como angico amarelo, canafístula ou faveiro. As raízes dessa planta são muito utilizadas na medicina popular para tratar inflamações e também como anticoncepcional. O objetivo do estudo foi realizar a bioprospecção da bergenina em modelos experimentais de inflamação, além de determinar seu potencial antioxidante por meio de estudos da modulação por parâmetros *in vitro*. A estrutura molecular da substância foi elucidada por técnicas espectroscópicas utilizando RMN, Difração de Raio-X, IV-TF e DSC. Depois disso, foi avaliada a capacidade antioxidante *in vitro* da bergenina contra os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS•+), radical hidroxila (OH•), óxido nítrico (NO) bem como a sua capacidade de transferir elétrons pelo potencial redutor, a capacidade de quelar íon ferro e o potencial de inibir a peroxidação lipídica (TBARS). Depois a nível celular, foi avaliada a capacidade antioxidante contra o dano oxidativo produzido por AAPH em eritrócitos, sua propriedade hemolítica, o potencial de inibir a hemólise e a capacidade de conservar a glutatona intracelular. Assim, foi demonstrado a importância deste composto na proteção contra o estresse oxidativo. Também foi avaliado o efeito e o mecanismo de ação da bergenina na inflamação desencadeada por lipopolissacarídeos em macrófagos peritoneais de camundongos, através das dosagens de nitrito, expressão de iNOS, a fosforilação de STAT3 e de proteínas da família MAPK, a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17. Nessa etapa, foi possível perceber que a bergenina não exibe atuação pelas vias de sinalização MAPKs e NF- $\kappa$ B, sendo sensível à via Jak-STAT. Também foram explorados os efeitos da bergenina em um modelo de colite ulcerativa aguda induzida por TNBS. A administração de bergenina levou a diminuição dos danos macro e microscópicos da colite, diminuiu a mieloperoxidase, também foi capaz de diminuir a expressão das proteínas COX-2, iNOS, I $\kappa$ B- $\alpha$ , pSTAT3 e os níveis de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ , aumentou IL-10 e inibiu o inflamassoma-NLRP3/ASC por via canônica e não canônica. Sendo possível concluir que a bergenina pode ser um forte candidato a fármaco anti-inflamatório e antioxidante.

**Palavras-chaves:** Bergenina. Antioxidante. Anti-inflamatório. Colite. TNBS

OLIVEIRA, G.A.L. **Bioprospecting of bergenin from *Peltophorum dubium* with emphasis in the antioxidant and anti-inflammatory properties: contributions to the development of new phytomedicines** Supervisor: Doctor Jand Venes Rolim Medeiros. 2018. 165p. Doctoral Dissertation - Post-Graduation in Biotechnology, Northeast Network of Biotechnology, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí.

## ABSTRACT

The use of natural substances and the development of drugs from medicinal plants have increased substantially each year around the world, leading to intercultural exchanges and the diffusion of the use of biotechnological techniques and natural therapeutic products. A promising substance to be used in medicine is bergenin, a molecule derived from gallic acid. It is the major component of ethanolic extract from the roots of *Peltophorum dubium*, popularly known as angico amarelo, canafistula and faveiro. The roots of this plant are widely used in folk medicine to treat inflammation as well as a contraceptive method. The objective of this study was to perform bergenin bioprospecting in experimental models of inflammation and to determine its antioxidant potential through *in vitro* parameter modulation studies. The molecular structure of the substance was clarified by spectroscopic techniques using NMR, X-ray Diffraction, IV-TF and DSC. After that, the bergenin *in vitro* antioxidant capacity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS<sup>•+</sup>), Hydroxyl (OH<sup>•</sup>), nitric oxide (NO) was evaluated, as well as its ability to transfer electrons through the reducing potential, the capacity to chelate the iron ion and the possibility to inhibit lipid peroxidation (TBARS). Then, at the cellular level, it was investigated the antioxidant capacity against the oxidative damage produced by AAPH in erythrocytes, its hemolytic properties, the potential to inhibit hemolysis and the ability to conserve intracellular glutathione, thereby demonstrating the importance of this compound in the protection against oxidative stress. It was also evaluated the effect and the bergenin mechanism of action on the inflammation triggered by lipopolysaccharides in mice peritoneal macrophages through nitrite dosages, iNOS expression, phosphorylation of STAT3 and MAPK family proteins, degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ , production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-17. At this stage, it was possible to notice that bergenin does not exhibit MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathways, being sensitive to the via Jak-STAT signaling pathway. The effects of bergenin on an acute ulcerative colitis model induced by TNBS have also been explored. The administration of bergenin led to a decrease in the macro and microscopic colitis damage, decreased myeloperoxidase and the proteins expression of COX-2, iNOS, I $\kappa$ B- $\alpha$ , pSTAT3 and IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  levels, increased IL-10 and modulated the NLRP3/ASC-inflammasome at canonical and non-canonical pathways. It is possible to conclude that bergenin may be a strong candidate for anti-inflammatory and antioxidant drugs.

**KEYWORDS:** Bergenin. Antioxidant. Anti-inflammatory. Colitis. TNBS.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	21
2.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	21
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
3.1. <i>Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos provenientes de produtos naturais.....</i>	24
3.2. <i>Peltophorum dubium - aspectos botânicos.....</i>	24
3.2.1. <i>Propriedades medicinais .....</i>	25
3.3. <i>Substâncias isoladas com bioatividade: importância na P&amp;D de novos medicamentos .....</i>	26
3.4. <i>Substâncias com potencial antioxidante na P&amp;D de novos medicamentos</i>	28
3.5. <i>Inflamação e drogas anti-inflamatórias.....</i>	29
3.6. <i>Doenças inflamatórias intestinais.....</i>	29
3.6.1. <i>Etiopatogenia e fisiopatologia.....</i>	30
3.6.2. <i>Fatores genéticos.....</i>	31
3.6.3. <i>Fatores ambientais.....</i>	31
3.6.4. <i>Fatores microbiológicos.....</i>	33
3.6.5. <i>Fatores imunológicos.....</i>	33
3.7. <i>Bergenina (caracterização).....</i>	35
<b>4. CAPÍTULO 1 - Bergenina isolada de <i>Peltophorum dubium</i>: isolamento, caracterização e atividades antioxidantes em sistemas biológicos e não biológicos .....</b>	<b>38</b>

**5. CAPITULO 2 - Bergenina isolada de *Peltophorum dubium* diminui a resposta inflamatória em macrófagos peritoneais de murinos estimulados por LPS pela via de sinalização Jak-STAT..... 72**

**6. CAPITULO 3 - Efeito preventivo da bergenina contra o desenvolvimento de colite aguda induzida por TNBS em ratos, estudo da inibição de mediadores inflamatórios e a modulação da via de sinalização do inflamassoma NLRP3 / ASC..... 94**

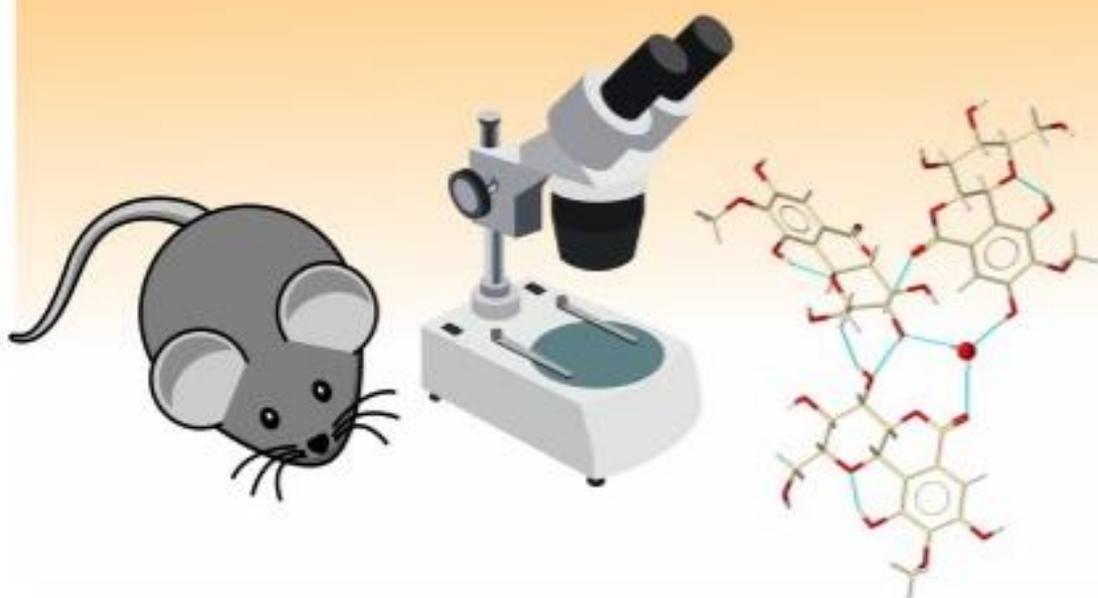
**7. CONCLUSÃO..... 124**

**REFERÊNCIAS..... 126**

**APÊNDICES..... 137**

**ANEXOS..... 148**

# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias medicamentosas naturais e o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais têm aumentado substancialmente a cada ano, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, levando a trocas interculturais e a difusão do uso de técnicas biotecnológicas e de produtos terapêuticos naturais (TENÓRIO et al., 2017; WIN et al., 2017; GIOVANNINI et al., 2016; DUTRA et al., 2016).

A pesquisa e desenvolvimento (P&D) de medicamentos exige uma série de etapas complexas que começa com a observação da necessidade de novos produtos para suprir ou complementar o tratamento de enfermidades, seguindo com a criação de ajustes em processos e/ou produtos já existentes e culmina no desenvolvimento de pesquisa experimental aplicada que corresponde à descoberta e síntese de moléculas com potencial farmacológico e a sua correlação com sítios biológicos específicos (STEELS et al., 2017; MOFFAT et al., 2017; TIGRE et al., 2016).

Dessa forma, o processo pode resultar em inovações terapêuticas, novos produtos e aprendizados. E com a bioprospecção incremental de moléculas provenientes de produtos naturais que visa gerar novos fins terapêuticos para substâncias com potencial farmacológico conhecido (GUIMARÃES et al., 2017) os avanços da biotecnologia passam a contribuir não somente na descoberta de novas substâncias mas também na descoberta de novas atividades farmacológicas para moléculas já conhecidas.

No Brasil, a legislação vigente exige que a segurança e eficácia de moléculas candidatas a fármacos sejam bem definidas antes da sua comercialização. Em fases iniciais são realizados estudos *in vitro* para descrever a interação das moléculas em meios não biológicos, também são realizados os estudos não clínicos *in vivo* para avaliar os efeitos biológicos das substâncias em animais, antes dos estudos clínicos (BONFANTI et al., 2016; WALLER et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2015).

Alguns fármacos presentes no mercado que estão sendo usados na clínica médica foram gerados a partir de produtos naturais ou desenvolvidos por síntese química a partir destes (BENJAMIN et al., 2016). Os produtos naturais podem ser provenientes de plantas, animais, organismos marinhos, insetos, fungos e bactérias que são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas para diversas

finalidades terapêuticas (NEWMAN, 2017). Nos últimos anos o empenho de pesquisadores também está voltado para modificações estruturais nas moléculas provenientes de produtos naturais com o objetivo de melhorar às fases de farmacocinética e farmacodinâmica além de minimizar seus efeitos adversos (MOODIE et al., 2017; RODNICK et al., 2017; JACOBO et al., 2016; TSOUH et al., 2015).

Nesse sentido, o Brasil possui grande biodiversidade de produtos naturais, somente de plantas, o número de espécies catalogadas supera 350 mil exemplares e isso representa apenas uma fração da biodiversidade da flora brasileira que tem o número estimado de espécies biológicas em 1,8 milhão (SOUSA et al., 2017). Trata-se de um grande potencial para a pesquisa e exploração visando o desenvolvimento de novos fármacos. Apesar da riqueza de produtos naturais encontrados no Brasil, ainda é pequeno o número de plantas estudadas quanto aos princípios biologicamente ativos (SOUSA et al., 2017). Tudo isso reitera a importância da pesquisa para a comprovação de atividades farmacológicas de produtos obtidos de plantas medicinais, dentre as quais se destacam as substâncias com atividade antioxidante e anti-inflamatória que podem melhorar a qualidade de vida de milhões de pessoas que sofrem com patologias advindas de processos inflamatórios.

Dos diversos processos patológicos onde a biotecnologia e o uso de moléculas com potencial terapêutico podem ser aplicados, as enfermidades causadas por processos inflamatórios têm ganhado grande importância devido as complicações orgânicas que afetam cerca de 30% dos portadores (RIBEIRO et al., 2017). E apesar do grande avanço tecnológico, muitos enfermos enfrentam severas complicações imunológicas decorrentes dos efeitos adversos dos medicamentos disponíveis no mercado que podem levar ao aparecimento de outras complicações como problemas cardiovasculares, câncer e doenças gástricas (TADIĆ et al., 2017; TERÁN, 2008).

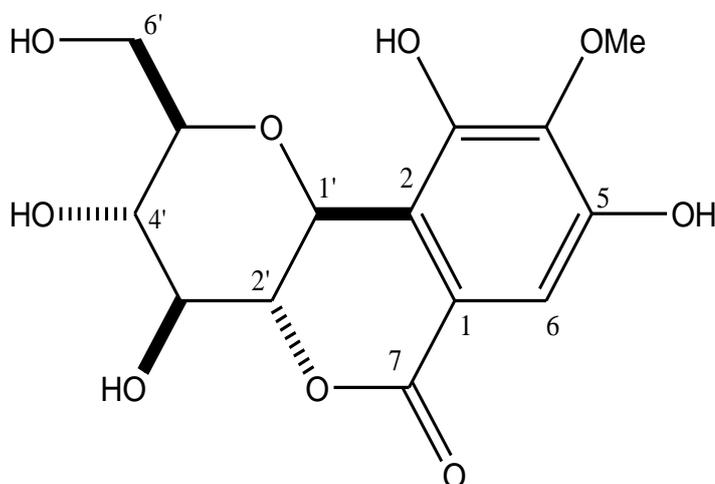
A *Peltophorum dubium* (Spreng) Taubert pertence a família Fabaceae e pode ser encontrada em grande parte do território brasileiro, principalmente nos domínios fitogeográficos de caatinga, cerrado, mata Atlântica e pantanal (SILVA et al., 2017; BAHIA et al., 2010), no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e norte do Uruguai. No Brasil é popularmente conhecida como “Canafistula”, “Faveiro”, “Angico amarelo”, “Tamboril”, “Canafrista branca” entre outras denominações a depender da

região. Possui raízes, caule, folhas e flores utilizadas na medicina popular para tratar inflamações e também como anticoncepcional (BAHIA et al., 2010).

Dentre as partes da *P. dubium* utilizadas é nas raízes que se concentram a maior incidência de bergenina, substância derivada do ácido gálico, composta de três anéis de seis membros: um anel aromático, um anel glucopiranosose e um anel δ-lactona (Figura 1). Possui atividade farmacológica comprovada como efeito hepatoprotetor (PAN et al., 2016), antiartrítico (EL-HAWARY et al., 2016), antibacteriano (DWIVEDI et al., 2017) e anti-inflamatório (AGGARWAL et al., 2016).

Ainda no contexto dos estudos bioprospectivos que visam a descoberta de novos produtos e a expansão da aplicabilidade terapêutica de produtos já conhecidos, este trabalho teve como intento contribuir para o desenvolvimento e aprimoramento de novos fármacos baseados no uso de bergenina como princípio ativo para o tratamento de enfermidades inflamatórias.

**Figura 1 - Estrutura química da bergenina**



Fonte: Autoria própria (2018).

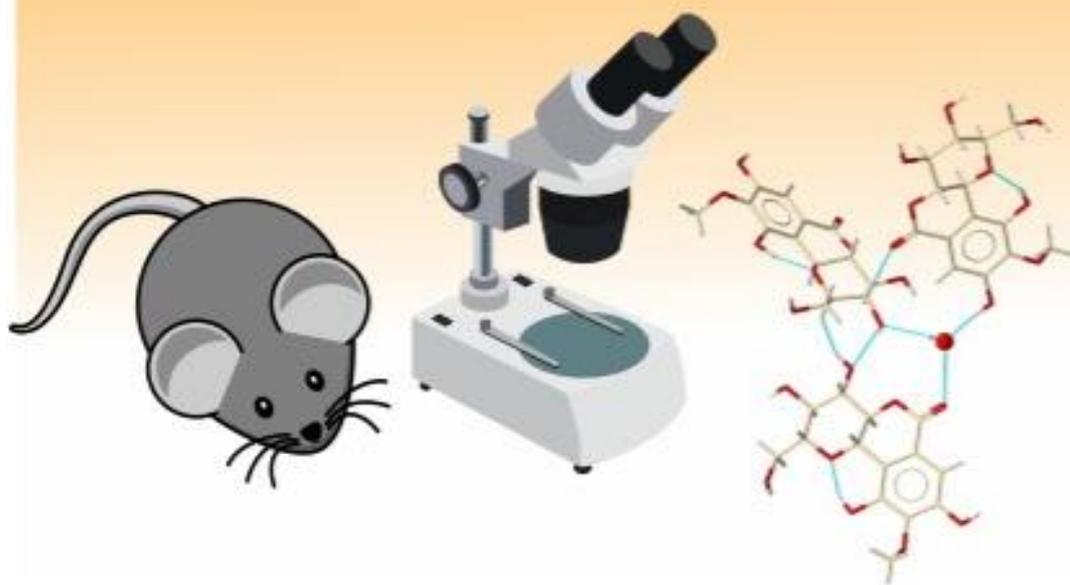
Dessa forma a tese intitulada “**Bioprospecção da bergenina isolada de *Peltophorum dubium*, com ênfase nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias: aporte para o desenvolvimento de novos fitomedicamentos**” foi dividida em capítulos baseados em artigos científicos submetidos ou publicados em revistas de caráter internacional com o objetivo de fornecer uma maior abrangência dos resultados encontrados e torná-los disponíveis a outros grupos de pesquisa.

O primeiro capítulo apresenta dados da propriedade antioxidante *in vitro* da bergenina em sistemas não biológicos e biológicos. Este capítulo foi baseado na magnitude dos efeitos maléficos causados pelo estresse oxidativo no organismo humano e a sua relação com processos inflamatórios.

O capítulo dois apresenta os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória da bergenina e a possível via de sinalização em modelo de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS). Por fim o capítulo três aborda os efeitos anti-inflamatórios da bergenina em um modelo *in vivo* de colite ulcerativa aguda, fazendo uma relação das vias de atuação e os mediadores inflamatórios envolvidos no início da inflamação.

Os resultados da presente tese servirão como base de pesquisa para o desenvolvimento de produtos utilizando a bergenina para fins anti-inflamatórios. E contribuirá para o desenvolvimento científico e tecnológico do Estado do Piauí.

# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

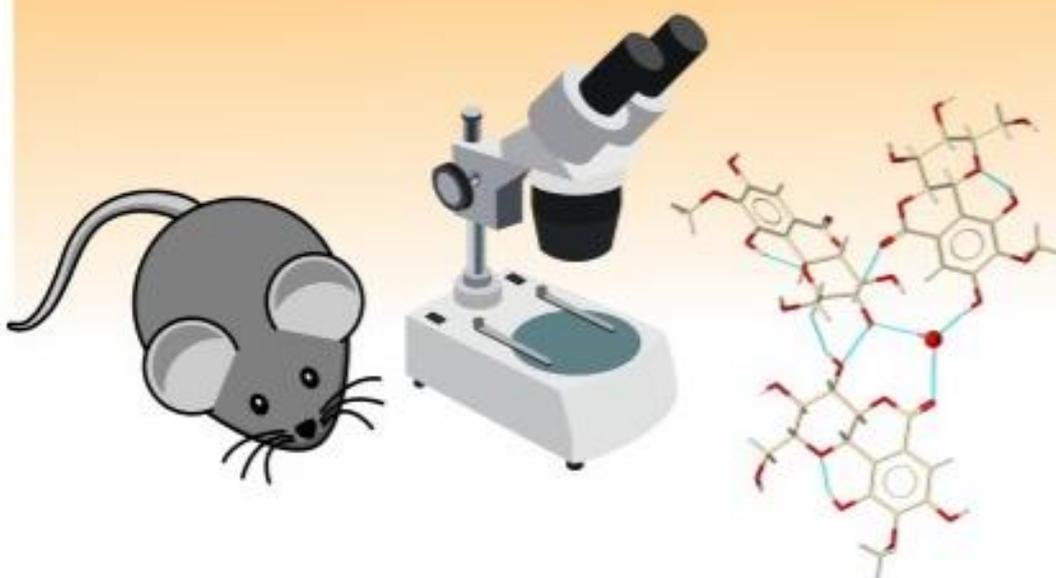
Realizar a bioprospecção da bergenina, um derivado do ácido gálico extraído de raízes da *Peltophorum dubium*, em modelos experimentais de inflamação *in vitro* e *in vivo*, além de determinar seu potencial antioxidante por meio de estudos da modulação de parâmetros *in vitro*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante da bergenina por meio dos métodos de inibição de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>), 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>), Nitrito, degradação de desoxirribose e a capacidade de reduzir e quelar íons ferro;
- Avaliar a capacidade de proteção contra dano oxidativo produzido por 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) em eritrócitos, a capacidade hemolítica, potencial de inibir a hemólise e a capacidade de preservar a homeostase da glutatona reduzida intracelular;
- Determinar os efeitos da bergenina sobre o metabolismo de macrófagos peritoneais de camundongos ativados por lipopolissacarídeos (LPS);
- Verificar os efeitos da bergenina sobre proteínas e citocinas inflamatórias em macrófagos estimulados por LPS e estudar alguns dos mecanismos de sinalização molecular do processo inflamatório de macrófagos estimulados por LPS e tratados com bergenina;
- Analisar os efeitos da bergenina na extensão e severidade da colite aguda experimental induzida por ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos;
- Avaliar de forma microscópica a mucosa do colón dos ratos, os danos associados a instalação do TNBS e a infiltração de células inflamatórias;

- Determinar os efeitos da bergenina sobre proteínas e citocinas presentes no colón dos ratos, além de estudar os mecanismos de sinalização molecular do inflamassoma-NLRP3 nas células epiteliais do cólon dos ratos;

# REVISÃO DE LITERATURA



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Pesquisa e Desenvolvimento de medicamentos provenientes de produtos naturais*

A utilização de produtos da natureza para tratar problemas de saúde é tão antiga quanto a civilização humana. O Brasil dispõe de uma diversidade genética vegetal que representa uma das maiores do mundo, existem mais de 50.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta) e destas espécies muitas apresentam atividades biológicas. Por conta do potencial terapêutico, as plantas são utilizadas tradicionalmente pela medicina popular e vem despertando o interesse de pesquisadores e indústrias farmacêuticas que tem objetivos de desenvolverem novas terapias medicamentosas provenientes de plantas medicinais (MÜGGE et al., 2016).

A geração e o aprimoramento de novos fármacos estão intimamente ligados a plantas medicinais. Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, neste contexto, vários fatores estimulam a busca de novos medicamentos originados de produtos naturais como o combate a doenças com tratamentos ainda limitados como o câncer e a falta de acesso econômico da maioria da população aos medicamentos modernos. Sendo necessário produzir novas vias terapêuticas economicamente acessíveis (MARQUES et al., 2017; PAZUCH et al., 2017).

Por outro lado é importante ressaltar que a comercialização de medicamentos provenientes de produtos naturais não condiz com a biodiversidade do Brasil devido ao baixo investimento em P&D de medicamentos no país. Além disso, as atividades de pesquisa e aplicações tecnológicas estão mais restritas ao setor acadêmico sem ligações diretas com empresas. Esse fato mostra a importância de haver uma interação entre empresas e universidades com o intuito de investir em conhecimento gerando novos produtos biotecnológicos para a população.

#### 3.2. *Peltophorum dubium: aspectos botânicos*

A espécie *Peltophorum dubium* (Spreng) Taub. popularmente conhecida como canafístula, angico amarelo ou faveiro pertence à família Fabaceae com cerca

de 19.325 espécies sendo a terceira maior família botânica existente. De forma mais específica a *P. dubium* está classificada na subfamília Caesalpinioideae, apresenta porte entre 15 e 40 metros, tronco com 50 a 120 cm de diâmetro, folhas bipinadas, com inflorescência no período de verão. O fruto é um legume achatado e seco que apresenta uma a duas sementes (MANTOVANI et al., 2017; CURTI et al., 2014).

De forma natural a *P. dubium* (**Figura 2**) está distribuída no Brasil em regiões de caatinga, cerrado, mata atlântica e pantanal. Ocorre preferencialmente em solos úmidos argilosos (MEDRI et al., 1998). É uma planta de crescimento rústico, heliófita e com fortes características de interesse econômico como a madeira pesada, de resistência mecânica média que pode ser utilizada na construção civil e fabricação de móveis (SILVA et al., 2017; MANTOVANI et al., 2017; MOREIRA; OLIVEIRA, 2006).

**Figura 2 - *Peltophorum dubium***



Fonte: Autoria própria (2018).

### 3.2.1. Propriedades medicinais

O uso de plantas para fins terapêuticos ou curativos é muito antigo e data dos primórdios da civilização, existem registros do cultivo e utilização de plantas medicinais de 2300 a.C. pelos egípcios, hebreus e assírios (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016). No Brasil, antes do seu descobrimento pelos portugueses, a população

indígena já utilizava plantas medicinais para a cura de doenças (BUENO et al., 2005).

As plantas medicinais despertam grande interesse dos pesquisadores de todo o mundo que buscam a cura de muitas enfermidades com o uso de extratos ou substâncias isoladas de plantas medicinais (FOGLIO et al., 2006). Pela grande diversidade de flora, o Brasil foi considerado o país com maior potencial de exploração vegetal para fins medicamentosos e biotecnológicos. Diante desse contexto a *P. dubium* é usada popularmente como anticoncepcional e anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2013), existem relatos também do uso de extratos e substâncias isoladas desta espécie como hepatoprotetor (PAN et al., 2016), antiartrítico (EL-HAWARY et al., 2016) e antibacteriano (DWIVEDI et al., 2017).

### 3.3. *Substâncias isoladas com bioatividade: importância na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos medicamentos*

O planejamento de um novo medicamento envolve estudos dos processos de evolução dos organismos e de reconhecimento molecular em sistemas biológicos, pois esses constituem a base fundamental para entender as propriedades das moléculas isoladas de produtos naturais com potencial de ação farmacológico, afinidade e seletividade de atuação. Diante desse paradigma complexo, as ferramentas biotecnológicas são essenciais no desenvolvimento e descoberta de novas moléculas bioativas (GUIDO, ANDRICOPULO; GLAUCIUS, 2010).

Os processos biotecnológicos são importantes na *P&D* de novos medicamentos e apresentam papéis de destaque nos setores social e econômico de um país. Na área da saúde mundial, inovar é considerado o primeiro degrau do sucesso, o setor farmacêutico investe milhões de dólares todo ano em pesquisas para o desenvolvimento e aprimoramento de produtos, incluindo as moléculas isoladas com bioatividade. Dessa forma, descobrir uma nova aplicação para moléculas bioativas já conhecidas ou descobrir novas moléculas com bioatividade pode induzir a introdução de novas opções de tratamento e até mesmo de cura para doenças complexas com alta incidência populacional, incluindo doenças inflamatórias, câncer, doenças neurodegenerativas, entre outras. O que pode proporcionar melhorias significativas na qualidade de vida de diversas populações do mundo. (MADEIRA, BORSCHIVER; PEREIRA, 2013).

As principais substâncias com atividade biológica que tem ganhado grande importância na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos estão classificadas entre ácidos carboxílicos, terpenoides e fenóis (AHMED et al., 2018). Existem dezenas de substâncias em cada uma dessas classes, que por sua vez, desempenham o papel de constituinte majoritário e pode ser o responsável pela maior característica farmacológica do produto natural (AL JUHAIMI et al., 2018; MUSZYNSKA et al., 2018; MACIEL et al., 2002).

Os ácidos carboxílicos naturais encontram-se em sua maioria esterificados com o glicerol formando os triglicerídeos que compõem as gorduras e óleos comestíveis (APARICIO-SOTO et al., 2017). Vários derivados de ácidos carboxílicos provenientes de plantas como ácido palmítico, linoleico e araquidônico são descritos na literatura como antifúngico (AWAAD et al., 2017), antimicrobiano (MAY et al., 2017) e protetor cardiovascular (SANG et al., 2017).

Os terpenoides, também chamados de terpenos ou isoprenoides, constituem a classe de maior variedade estrutural e funcional com mais de 55.000 substâncias oriundas de plantas. Essa classe apresenta grande variedade de hidrocarbonetos, aldeídos e álcoois sendo assim considerados importantes fontes para a produção biotecnológica (OZ et al., 2015). A maioria dessas substâncias são produtos do metabolismo secundário com função de intermediar a relação da planta com o ambiente (RODRIGUES, 2016; CHANG et al., 2010). A grande maioria dos terpenos são voláteis e constituintes básicos de óleos essenciais como o mentol, nerol, linalol, geraniol e tujona (NIKOLIC et al., 2014).

Os compostos fenólicos estão presentes nas plantas de forma livres ou ligados a açúcares e proteínas, englobam moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. As fontes principais de compostos fenólicos são as frutas cítricas como limão e laranja, outras frutas como a cereja e ameixa, também são encontrados em brócolis, alho, cebola e tomate (DOS SANTOS, et al., 2017). Os fenólicos possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, apresentam estrutura variável o que torna suas características mais diversificadas como antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-cancerígenos, anti-hiperglicêmicas e anti-fúngicos (HISTER et al., 2017; BOLDORI et al., 2017). Segundo Sharma e colaboradores (2018), existem cerca de 9.000 compostos fenólicos identificados e caracterizados e dentre estes, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis.

### *3.4. Substâncias com potencial antioxidante na P&D de novos medicamentos*

O organismo animal possui vários mecanismos que neutralizam o estresse oxidativo causado por radicais livres, são os antioxidantes endógenos que se apresentam em sistemas enzimáticos ou não-enzimáticos. Os antioxidantes também podem ser obtidos de fontes externas por meio de alimentos e suplementos medicamentosos.

Os antioxidantes enzimáticos como as enzimas catalase e superóxido dismutase agem diretamente catalizando a decomposição de espécies reativas de oxigênio em substâncias não tóxicas. Já os antioxidantes não enzimáticos removem contaminantes de metais de transição, sequestram elétrons e átomos de hidrogênios livres (KIRSCHWENG et al., 2017).

Os processos oxidativos são relacionados como a etiologia de várias doenças degenerativas e danos ao DNA que desempenham importante papel na carcinogênese e mutagênese. A função de uma substância antioxidante é neutralizar o excesso de radicais livres e proteger a célula contra o estresse oxidativo e conseqüentemente prevenir patologias relacionadas a esse desequilíbrio (PILONI et al., 2013).

A produção continuada de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento pelo organismo de muitos mecanismos de defesa antioxidantes, porém muitas vezes ainda faz-se necessário o uso de fontes exógenas de antioxidantes para combater o estresse oxidativo nas células. Uma definição ampla de antioxidante muito conhecida é “qualquer substância que, presente em pequenas concentrações em comparação ao do substrato oxidável, inibe ou atrasa a oxidação deste substrato de forma eficiente” (SIES; STAHL, 1995).

Por isso os antioxidantes são muito utilizados na medicina para prevenir e também tratar enfermidades relacionadas ao desequilíbrio de radicais livres. Enfermidades associadas ao estresse oxidativo muitas vezes necessitam de intervenções medicamentosas imediatas. Nesse sentido, é essencial a P&D de novos medicamentos com efeitos terapêuticos e o intuito de potencializar as defesas antioxidantes endógenas ou fornecer uma fonte exógena desses compostos. Naturalmente as substâncias antioxidantes são encontradas em raízes, caules, folhas, frutos e sementes de plantas e em minerais (KIRSCHWENG et al., 2017; MAJER et al., 2014; LAURIE et al., 2012).

### 3.5. *Inflamação e drogas anti-inflamatórias*

A inflamação é uma reação de proteção da microcirculação que ocorre em resposta a estímulos nocivos, lesão, trauma ou infecção. O objetivo do processo inflamatório é eliminar o estímulo nocivo, promover a reparação tecidual e cicatrização. O processo da inflamação se caracteriza pela produção de mediadores como aminas vasoativas, eicosanoides, citocinas, bradicininas, quimiocinas, com aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células imunológicas (MARELLI et al., 2017; FULLERTON; GILROY, 2016).

Os fármacos mais utilizados no tratamento de processos inflamatórias são os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) que atuam interferindo na síntese das prostaglandinas através da inibição da síntese de COX-1 e/ou COX-2. Contudo, estas substâncias estão associadas ao aparecimento de efeitos adversos já relatados anteriormente como hemorragias gastrointestinais, insuficiência cardíaca e renal (SILVA et al., 2015).

Esses efeitos adversos também representam uma importante limitação ao uso contínuo destes fármacos. Assim, pesquisas que busquem por alternativas mais eficazes no tratamento da inflamação são necessárias. Nesse contexto, as plantas medicinais constituem uma fonte importante para estudos que visam a descoberta de novas substâncias com atividade farmacológica que tenham maior segurança, melhor eficácia e menos efeitos adversos (DAMASCENO et al., 2014; DUTRA et al., 2016).

### 3.6. *Doenças inflamatórias intestinais*

O termo doenças inflamatórias intestinais (DII) é utilizado para designar as enfermidades inflamatórias do intestino, principalmente do intestino grosso, de etiologia desconhecida e evolução crônica que se apresentam com períodos de latências e reincidências. Dentre essas doenças estão a colite ulcerativa e a doença de Crohn que dividem aspectos epidemiológicos e apresentam sintomas clínicos e características anatomopatológicas comuns (ROGLER, 2017; ARGOLLO et al., 2017).

A colite ulcerativa afeta de forma difusa e superficial a parede intestinal, principalmente do cólon e reto. É caracterizada por uma inflamação crônica da

mucosa colônica com períodos recidivantes, com sintomas de sangramento retal e diarreia. Nesta enfermidade, a inflamação crônica pode levar a displasia e câncer, muitas vezes sendo necessário procedimento cirúrgico como a colectomia (UNGARO et al., 2017; RAY; SAGAR, 2017; PATIL et al., 2016).

A doença de Crohn é caracterizada por um processo inflamatório crônico que pode afetar todo o tubo digestivo, desde a boca até o ânus de forma segmentada e descontínua com mais frequência na porção terminal do íleo, colón e ânus, dessa forma encontram-se seguimentos saudáveis e áreas lesionadas que podem levar ao aparecimento do câncer. Essa patologia inclui complicações como obstrução intestinal (TORRES et al., 2017; SANTOS; BARBOSA, 2017; HARB, 2015).

### *3.6.1. Etiopatogenia e fisiopatologia*

As causas fisiopatológicas das doenças inflamatórias intestinais permanecem desconhecidas e conseqüentemente segue-se sem um tratamento que leve a cura (SPECA; DUBUQUOY, 2017). Nos últimos anos com o desenvolvimento da biotecnologia, a exploração de substâncias naturais com potenciais farmacológicos, o desenvolvimento de novas técnicas de pesquisa e o interesse de pesquisadores e indústrias tem-se investido em importantes avanços para o conhecimento do mecanismo patológico destas doenças. Neste sentido, pesquisadores consideram que estas enfermidades são conseqüências de complexas interações de fatores genéticos, ambientais, microbiológicos e imunológicos (SIEGMUND, 2017; KAPLAN; NG, 2016).

### *3.6.2. Fatores genéticos*

Já se sabe que a patogenia dessas enfermidades está associada a fatores genéticos, pois a prevalência destas doenças é muito mais elevada em membros de uma mesma família (PEYRIN-BIROULET et al., 2017). Os avanços biotecnológicos nas análises e sequenciamento do DNA possibilitou a identificação de regiões gênicas que aparentemente contem genes que podem contribuir para o risco do desenvolvimento de DII (HERNÁNDEZ-FLÓREZ et al., 2017).

Em 2001, Hugot e colaboradores descobriram a primeira mutação implicada com doenças inflamatórias intestinais no gene NOD2/CARD15 (domínio de

recrutamento de uma caspase C-terminal) responsável por codificar a proteína NOD2 que está presente nas células de defesa e no epitélio intestinal com a função de reconhecer um dos componentes da parede celular de bactérias, o MDP (dipeptídeo muramil). Quando os receptores desta proteína são ativados, induzem uma sinalização intracelular que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) (COSTA et al., 2016). A mutação no gene NOD2/CARD15 associada com a doença de Crohn tem sido relacionada com a eliminação defeituosa de bactérias do intestino (MARTINEZ et al., 2016) e também com uma ineficaz resposta imunológica (SINGH, PROCTOR; WILLING, 2016).

Outro gene implicado nas doenças inflamatórias intestinais é o IBD5 (inflammatory bowel disease 5) que codifica duas proteínas transportadoras, a OCTN1 e a OCTN2 (Carnitine/Organic Cation Transporter) presentes nas células epiteliais, nos macrófagos e linfócitos, um defeito nesse gene pode aumentar o transporte de antígenos bacterianos para o interior da célula e desregular a resposta imune (LU; DIETZ, 2004).

Um terceiro gene potencialmente associado a doenças inflamatórias intestinais é o IL23R (Interleukin 23 receptor) que codifica uma subunidade do receptor de interleucina 23 (IL-23) pró-inflamatória, enquanto que algumas variantes desse gene conferem proteção contra a doenças inflamatórias intestinais, outros aparentemente ajudam no desenvolvimento da patologia (OLIVER et al., 2007).

A literatura também relata a presença de polimorfismos de alguns genes envolvidos na resposta do organismo aos produtos bacterianos. Nesse sentido, os polimorfismos do gene que codifica o receptor TLR4 (*Toll-like* tipo 4) estão associados com um maior risco de desenvolver doença inflamatória intestinal. Também foram identificados polimorfismos nas células de Paneth responsáveis por controlar os níveis de microrganismos no intestino (SUN; LIN, 2017; STAPPENBECK; MCGOVERN, 2017; DUDAREWICZ et al., 2014).

### 3.6.3. Fatores ambientais

No último século, o número de enfermidades relacionadas a processos inflamatórios e autoimunes nos quais incluem as doenças inflamatórias intestinais (DII) tem aumentado de forma considerável em todo o mundo e esse crescimento

está estreitamente relacionado com o progresso econômico e social (KAPLAN; NG, 2016; MALIK, 2015). Os primeiros relatos sobre essas enfermidades foram registrados no norte da Europa e na América do Norte, mas depois da Segunda Guerra Mundial, começaram a aparecer no resto da Europa, no Japão, na América do Sul e Ásia (BURISCH et al., 2013).

Uma hipótese para explicar o rápido aparecimento mundial dessas enfermidades está relacionada com questões higiênicas. Essa hipótese propõe que o aumento de DII é devido a mudanças no estilo de vida que se tinha antes, com pouca higiene e alta exposição a microrganismos e depois passou a um estilo de vida com baixa exposição aos microrganismos causado pelo grande consumo de antibióticos, vacinas e o consumo de comidas totalmente livres de patógenos. Esses fatores resultam em uma grande melhora nas condições higiênicas e sanitárias da população (NG, 2014).

Dessa forma, essa hipótese propõe que a diminuição de enfermidades infecciosas nas primeiras etapas da vida, tem conduzido a um aumento no número de alergias, doenças autoimunes e DII devido a um sistema imunológico menos preparado, incapaz de eliminar antígenos estranhos ou responder a agentes comuns como os da própria microbiota intestinal em etapas avançadas da vida (WŁODARCZYK et al., 2016).

Outros fatores ambientais podem estar relacionados com o risco de desenvolver DII, como o hábito de fumar, o estresse, a dieta, o consumo de fármacos como os AINES e os anticoncepcionais orais. De todos estes, o hábito de fumar é o exemplo que mais se destaca entre os fatores ambientais relacionados à DII. Em estudos realizados por Yadav e colaboradores (2016; 2017) surpreendentemente, o tabaco mostrou ter um efeito completamente oposto nas DII. Existem várias evidências de que o hábito de fumar é um fator de risco para DII ao aumentar a frequência de reincidivas da doença e muitas vezes a necessidade de cirurgias. Dessa forma, se pensa que deixar de fumar melhoraria o curso da doença, porém estes pesquisadores dizem que o abandono do cigarro incrementa o risco de desenvolver DII, e sugerem que o fumo tem um papel protetor contra a DII.

#### 3.6.4. Fatores microbiológicos

Entre os fatores microbiológicos pode-se dizer que existem numerosas evidências que a microbiota intestinal tem um papel chave no desenvolvimento da DII (SHEEHAN et al., 2017). Estudos mostram que existem elevados números de bactérias em contato com a mucosa intestinal do paciente com DII e que as maiores lesões ocorrem preferencialmente nas regiões com maior concentração de bactérias (SINGH; PROCTOR; WLLING, 2016).

Dessa forma, foi visto que os pacientes com DII perdem a tolerância imunológica da mucosa contra a microbiota normal do intestino, o que faz com que aconteça uma resposta imune anormal que leva a processos inflamatórios crônicos típicos da DII (JACOBS et al., 2016).

#### 3.6.5. Fatores imunológicos

A literatura mostra estudos imunológicos da mucosa intestinal de pacientes com DII onde consideram que as células T (células do sistema imune adaptativo) são as mediadoras da inflamação intestinal. Por outro lado, existem estudos que mostram o papel da imunidade inata diretamente relacionada com a inflamação e que as células T se manifestam dependendo de defeitos da resposta imune inata (KIM et al., 2017; HEILMANN; SUCHODOLSKI, 2015).

Nessas enfermidades, a permeabilidade da barreira intestinal está alterada devido a mudanças na união intercelular e a diminuição da produção de muco, permitindo a livre passagem de antígenos (MOURA; GOULART, 2017).

As células epiteliais e imunológicas desempenham importantes ações para manter a homeostase do intestino, essas células são mediadas por receptores tipo *Toll-like* (TLR), localizados na superfície celular e por proteínas NOD2. Existem evidências de que o comportamento das células envolvidas na imunidade inata e na expressão e função do TLR e NOD2 se encontram alteradas na DII, dessa forma contribuem para a patogênese da doença. Assim a sinalização errada de TLR e NOD2 pode estimular diversas respostas inflamatórias e conduzir a uma inflamação intestinal aguda ou crônica (UDDEN et al., 2017). WANG e colaboradores (2017) relatam que as expressões de TLR2 e TLR4 estão diminuídas na mucosa colônica de pessoas saudáveis e aumentadas em pacientes com DII.

A imunidade adaptativa demora mais tempo para se desenvolver e depende do tipo e número de células T envolvidas (KMIEĆ et al., 2017). As duas formas principais de DII (colite ulcerativa e doença de Crohn) geram distintas respostas imunes baseadas no tipo de citocina predominantemente produzida. Assim, na doença de Crohn se observa uma clássica resposta imune mediada por linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) que se originam da exposição de linfócitos T imaturos a diferentes interleucinas, com a IL-12, IL-18 ou IL-23 (MOURA; GOULART, 2017).

As células Th1 produzem IL-2 e interferon gamma (IFN- $\gamma$ ); o IFN- $\gamma$  aumenta a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, facilita o recrutamento de células inflamatórias e a ativação dos macrófagos, estes últimos, por sua vez, produzem radicais livres e grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ ) que contribuem para a destruição tecidual. Existem relatos de que os linfócitos T da mucosa intestinal de pacientes com doença de Crohn são resistentes a apoptose, por isso ficam acumulados e aumentam a resposta inflamatória (PETERS et al., 2016; YADAV et al., 2016).

Já na colite ulcerativa, a resposta inflamatória produzida não está totalmente clara, a literatura relata que parece ser uma resposta mediada por linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) caracterizada pela produção de IL-4 e IL-13. A resposta Th2 implica na ativação de linfócitos com atividade citotóxica inata ou *natural killer* (NK) que podem ser responsáveis pela inflamação através da produção de IL-13 (HELLER et al., 2002).

Também existem os linfócitos T *helper* tipo 17 (Th17) que requer IL-23, fator de crescimento transformador  $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1) e IL-6 para sua diferenciação e amadurecimento. O principal produto das Th17 é a IL-17. As Th17 estão envolvidas na mediação de respostas inflamatórias e danos teciduais nas infecções, processos inflamatórios e condições autoimunes (ROSEN et al., 2017).

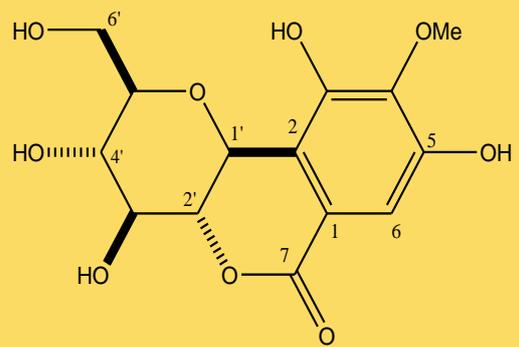
Por outro lado, os linfócitos T reguladores (Treg) são especializados em suprimir a ativação do sistema imune, manter a homeostase do sistema e favorecer a auto tolerância imunológica. Existem diferentes populações de Treg entre as que se incluem as células T CD4<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> que exercem principalmente a função de supressores imunológicos através da secreção de IL-10, se incluem também as células T CD4<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>FOXP3 que necessitam entrar em contato com células e citocinas para desempenhar a função de supressora da imunidade. Lim e colaboradores (2016) afirmam que existe uma diminuição no número de Treg na

mucosa de pacientes com DII e em experimentos que envolvem modelos animais de colite ulcerativa mostram que a administração destas células pode ajudar na cura da colite experimental.

### 3.7. Caracterização da bergenina

Estruturalmente, a bergenina (**Figura 3**), ou (2R,3S,4S,4aR,10bS) - 3,4,8,10-tetrahydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-3,4,4a,10b-tetrahydro-2H-pyrano [3,2 - c]isochromen-6-one (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>) é um C-glicosídeo derivado do ácido 4-O-metil gálico (BAJRACHARYA, 2015). Sendo um dos principais constituintes ativos das plantas do gênero *Peltophorum*, este composto apresenta propriedades farmacológicas já comprovadas (**Tabela 1**). Além disso, a bergenina têm apresentado atividade antioxidante frente às EROs, influenciando ou evitando o dano oxidativo em sistema biológicos e não biológicos (SINGH; BARIK; PRIYADARSINI, 2009; ZAMARRUD et al., 2011; MU; FENG; LIU, 2012). Diante do exposto a bergenina pode ser um potencial precursor de novas terapias para uso na medicina.

**Figura 3 - Estrutura química e aspectos físico-químicos da bergenina**

 <p>Estrutura química</p> <p>Bergenina (2R,3S,4S,4aR,10bS)-3,4,8,10-tetrahydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-3,4,4a,10b-tetrahydro-2H-pyrano [3,2 -c]isochromen-6-one</p>	<b>Parâmetros físico-químicos da bergenina</b>	
	<b>Ponto de fusão:</b>	149,8°C
	<b>Estrutura molecular</b>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
	<b>Massa molecular</b>	328,27 g mol <sup>-1</sup>
	<b>Solubilidade</b>	1,22 mg/mL <sup>-1</sup> de PBS
<b>Aspecto e Cor:</b>	Pó laranja cristalino	

Fonte: Autoria própria (2018).

Tabela 1 - Principais atividades da bergenia descritas na literatura

Atividade avaliada	Espécie vegetal	Objetivo do estudo	Modelo Experimental	Dose / Concentração	Via de adm.	Referência
Antidiabético (Tipo 2)	<i>Caesalpinia digyna</i> (Rottler)	Avaliar o potencial antidiabético tipo 2 da bergenia ( <i>in vivo</i> ).	Indução de diabetes tipo 2 em ratos albinos machos com estreptozotocina.	2,5; 5 e 10 mg/kg	via oral	KUMAR R.; PATEL, D.K.; PRASAD, S.K.; LALOO, D.; KRISHNAMURTHY, S.; HEMALATHA, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of <i>Caesalpinia digyna</i> Rottler, <b>Fitoterapia</b> , v. 83, n. 2, p. 395-401, 2012.
Antihepatotóxico	<i>Mallotus japonicus</i> (Mull. Arg.)	Examinar os possíveis efeitos e mecanismos de hepatoproteção da bergenia em culturas primárias de hepatócitos de ratos.	( <i>in vitro</i> ) Cultura de hepatócitos de ratos	1 µM a 1 mM		KIM, H.S.; LIM, H.K.; CHANG, M.W.; KIM, Y.C. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of <i>Mallotus japonicus</i> , on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. <b>Journal of Ethnopharmacology</b> , v. 69, p. 79–83, 2000.
Anti-arrítmico/ Antioxidante	<i>Fluggea virosa</i> (Roxb.)	Investigar possível potencial para o tratamento de arritmias cardíacas e efeitos antioxidantes da bergenia em ratos e coelhos.	Indução de arritmias em ratos e coelhos por BaCl <sub>2</sub> . (Machos e Fêmeas)	0,2; 0,4 e 0,8 mg/kg	via intra venosa	PU, H.L.; HUANG, X.; ZHAO, J.H.; HING, A. Bergenin is the Antiarrhythmic Principle of <i>Fluggea virosa</i> . <i>Planta Medica</i> , v. 68, p.372, 2002.
Antifúngica	<i>Flueggea microcarpa</i> (Willd.)	Avaliar a possível atividade antifúngica da bergenia.	Cultura de esporos fúngicos	500, 1000, 1500, 2000 µg/mL		PRITHIVIRAJ, B.; SINGH, U.P.; MANICKAM, M.; SRIVASTAVA, J.S.; RAY, A.B. Antifungal activity of bergenin, a constituent of <i>Flueggea microcarpa</i> . <b>Plant Pathology</b> , v.46, p. 224, 1997.
Antibacteriana / antifúngica	<i>Endopleura uchi</i> (Huber)	Avaliação da atividade antimicrobiana da bergenia.	Cultura de bactérias	14,9, 14,9 e 29,8 µM		SILVA, S.L.; OLIVEIRA, V.G.; YANO, T.; NUNOMURA, R.C.S. Antimicrobial activity of bergenin from <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. <b>Acta Amazonica</b> , v. 39, n. 1, 2009.
Antimalárica	<i>Rodgersia aesculifolia</i> (Batal)	Avaliar a atividade antimalárica de bergenia em ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Aplicação em camundongos infectados e efeito antiplasmódico <i>in vitro</i>	<i>In vivo</i> 800 mg/kg 0,1; 1; 10; 40 e 50 µg/mL	via oral	LIANG, J.; LI, Y.; LIU, X.; HUANG, Y.; SHEN, Y.; Wang, J.; LIU, Z.; ZHAO, Y. <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> antimalarial activity of bergenin. <b>Biomedical Reporter</b> , v. 2, n. 2, p. 260-264, 2014.
Anti- inflamatório / anti-narcótico	<i>Bergenia crassifolia</i> (Fritsch)	Avaliar o potencial anti-inflamatório.	Indução de síndrome inflamatória e narcótica em camundongos	10 e 20 mg/kg	via oral	JUNG, J.C.; LIM, E.; KIM, S.H.; JUNG, K.M.; OH, S. Practical Synthesis and Biological Evaluation of Bergenin Analogs. <b>Chemical Biology &amp; Drug Design</b> , v. 78, p. 725–729, 2011.
Anti-artrítico / imunomodulação das citocinas Th1 e Th2	<i>Bergenia stracheyi</i> (Saxifragaceae)	Avaliar a modulação das citocinas Th1 e Th2 e o efeito contra artrite.	Indução de artrite subplantar em ratos	5, 10, 20, 40 e 80 mg/kg	via oral	NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M.A.; TANEJA, S.C.; AHMAD, S.F.; BANI, S.; QAZI, G.N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis-A flow cytometric study. <b>Journal of Ethnopharmacology</b> , v. 112, p. 401–405, 2007.

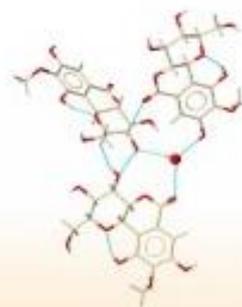
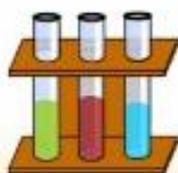
Fonte: Autoria própria (2018).

# CAPÍTULO 01

## **Bergenia isolada de *Peltophorum dubium*: isolamento, caracterização e atividades antioxidantes em sistemas biológicos e não biológicos**

Guilherme A.L. de Oliveira, George L. da Silva Oliveira, Lucas A.D. Nicolau, Ana C. Mafud, Larissa F. Batista, Yvonne P. Mascarenhas, Luan K.M. de Sousa, Jorge M. David, Larissa S. Pinto, Clayton Q. Alves, Jand V.R. Medeiros. Bergenin from *Peltophorum dubium*: Isolation, Characterization and Antioxidant Activities in Non-Biological Systems and Erythrocytes. **Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 6, 2017. doi: 10.2174 / 1573406413666170306120152.

**Artigo publicado na revista *Medicinal Chemistry*  
Fator de Impacto: 2.331  
Qualis-Capes: B1 para Biotecnologia**



## **Bergenina isolada de *Peltophorum dubium*: isolamento, caracterização e atividades antioxidantes em sistemas biológicos e não biológicos**

### **Resumo**

A bergenina, um composto derivado do ácido gálico é um dos constituintes ativos da planta *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., esta substância apresenta propriedades farmacológicas pouco estudadas, dentre elas a capacidade antioxidante. A estrutura molecular da substância foi elucidada por técnicas espectroscópicas utilizando RMN, Difração de Raio-X, IV-TF e DSC. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* da bergenina contra os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>), hidroxila (OH<sup>•</sup>), óxido nítrico (NO) bem como a sua capacidade de transferir elétrons pelo potencial redutor, a capacidade de quelar íon ferro e o potencial de inibir a peroxidação lipídica (TBARS). Depois em nível celular, avaliar a capacidade antioxidante contra o dano oxidativo produzido por 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) em eritrócitos, avaliação da propriedade hemolítica e seu potencial de inibir a hemólise além de avaliar a capacidade de conservar a glutatona intracelular, demonstrando assim, a importância deste composto natural na proteção contra o estresse oxidativo. De acordo com os resultados obtidos, é possível sugerir que esta substância pode ser uma alternativa no desenvolvimento de novos produtos com potencial antioxidante.

**Palavras chaves:** *Peltophorum dubium*, bergenina, antioxidante, eritrócitos, radicais livres.

## 1. Introdução

O estresse oxidativo ocasiona dano de forma deletéria a vários processos celulares e desempenham importantes papéis no desenvolvimento de várias doenças. Dessa forma, muitos são os estudos que visam pesquisar novas estratégias de tratamento usando compostos com efeitos antioxidantes, uma vez que, estes apresentam a capacidade de proteger um organismo dos danos oxidativos causados por espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (PISOSCHI; POP, 2015). Dentre os grupos de substâncias de origem natural com grandes efeitos antioxidantes, podem ser destacados os ácidos orgânicos que compreendem um grande grupo de compostos com estrutura química muito variada (ASNAASHARI et al., 2014).

Estruturalmente, a bergenina, ou (2R,3S,4S,4aR,10bS) - 3,4,8,10-tetrahydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-3,4,4a,10b-tetrahydro-2H-pyrano [3,2 - c]isochromen-6-one (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>) é um C-glicosídeo derivado do ácido 4-O-metil gálico (BAJRACHARYA, 2015). Sendo um dos principais constituintes ativos das plantas do gênero *Peltophorum*, este composto apresenta propriedades farmacológicas como atividade antibacteriana (RAJ et al., 2012), anti-inflamatória (GAO et al., 2014), antinarcótico (YUN et al., 2014), antilitiásico (AGGARWAL et al., 2014), antiartrítico (JAIN et al., 2014), antimalárico (LIANG et al., 2014), antitumoral (ZHANG et al., 2013), antidiabético (KUMAR et al., 2012), imunomodulatório (NAZIR et al., 2007), hepatoprotetor (LIM et al., 2000), e antinociceptivo (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Além disso, a bergenina têm apresentado atividade antioxidante frente às EROs evitando o dano oxidativo (SINGH; BARIK; PRIYADARSINI, 2009; ZAMARRUD et al., 2011; MU; FENG; LIU, 2012; KASHIMA; MIYAZAWA, 2013). Entretanto, esses estudos sobre a ação antioxidante da bergenina são incompletos e apresentam evidência de seus efeitos protetores apenas em sistemas não biológicos. Sendo assim, um contínuo desenvolvimento de novas pesquisas com a bergenina é essencial para um melhor conhecimento de suas propriedades antioxidantes em vários modelos de estudos.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e fornecer informações sobre o potencial antioxidante da bergenina em sistemas não biológicos pela eliminação dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS<sup>•+</sup>), hidroxila (OH<sup>•</sup>) e óxido nítrico (NO), bem

como a sua capacidade de transferir elétrons pelo potencial redutor e de inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS e também por um sistema biológico utilizando eritrócitos, no qual foi possível avaliar as propriedades protetivas da bergenina pela inibição do dano oxidativo induzido em eritrócitos junto a conservação dos níveis de glutathiona que é um dos principais parâmetros de estresse oxidativo celular.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material vegetal

As cascas das raízes de *P. dubium* Taub foram coletadas no *Campus Ondina* da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil. Uma amostra foi depositada no herbário Alexandre Leal da Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob o número de catalogação 69237.

### 2.2. Isolamento e caracterização da bergenina

As cascas das raízes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. foram secas e trituradas e, em seguida, submetidas à maceração em MeOH por 48h. Posteriormente, o extrato bruto foi submetido à partição com diclorometano, onde observou-se a formação de precipitado que foi separado por filtração. O material precipitado foi purificado em cromatografia de coluna utilizando sílica gel 60, eluída com os solventes CHCl<sub>3</sub>/MeOH na proporção (9:1), sendo então obtido um sólido cristalino que foi identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) e <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

A técnica de caracterização por difracção de raios X foi utilizada para compreender melhor a estrutura da bergenina. O produto purificado foi cristalizado em meio aquoso. O solvente foi submetido a lenta evaporação a 25 °C e os cristais obtidos foram secos numa estufa de vácuo a 323 K durante 8h. Foram observados cristais incolores, com dimensões aproximadas de 0,1 mm x 0,1 mm x 0,1 mm que foram selecionados as demais análises. Os dados foram coletados usando um difratômetro Bruker Super-Duo APEX II CCD. A difracção foi medida por um monocromador de grafite [ $\mu$  (MoK $\alpha$ ) = 0,71073 Å a 290 K] com técnica de varredura

$\omega$ -2 $\theta$  à temperatura ambiente (MADSON, 2002). A estrutura foi elucidada por métodos diretos usando o conjunto de programas WINGX (FARRUGIA, 2012). Todos os átomos não hidrogenionicos foram refinados com  $F^2$  anisotrópico usando o método SHELXL97 (SHELDRICK, 2008).

A difração de raios-X foi realizada em um difratômetro Rigaku Ultima IV usando o modo de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , na faixa de 5-60° por um tempo de exposição de 5 segundos. O refinamento Rietveld, realizado pelo software MAUD [LUTTEROTTI et al., 1997; SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998]; O espectro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foi determinado usando um espectrômetro Shimadzu IRAffinity-1, na faixa de ondas espectral 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , comum para a identificação espectrométrica de compostos orgânicos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998). Os estudos térmicos foram conduzidos usando um calorímetro de varredura diferencial Perkin-Elmer de 25-300 °C usando uma célula de alumínio sob atmosfera de argon e uma taxa de fluxo de 30 mL/min, em atmosfera de nitrogênio.

### *2.3. Ensaios de atividade antioxidante*

#### *2.3.1. Determinação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH'*

A avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH' foi realizado pela metodologia descrita por De Freitas et al. (2014). Uma mistura reacional da bergenina em várias concentrações (0,1-3 mM) com o radical DPPH' (0,1 mM) foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente na ausência da luz por 30 minutos. A avaliação antioxidante foi realizada em duplicata e os valores das absorvâncias (517 nm) foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH' em relação ao Sistema (100% de radical DPPH'). Foi determinada a concentração efetiva ( $\text{CE}_{50}$ ) da bergenina necessária para inibir 50% do radical DPPH' e para comparação, o mesmo procedimento experimental foi utilizado com o Trolox (0,1-3 mM).

#### *2.3.2. Determinação da capacidade antioxidante contra o cátion radical ABTS<sup>•+</sup>*

Para avaliar a capacidade antioxidante contra o radical ABTS<sup>•+</sup>, (RE et al., 1999), foi formado o cátion radical ABTS<sup>•+</sup> a partir da reação de 5 mL da solução de

ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) com 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (2,45 mM), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até obter uma solução com absorvância de 1,00 (± 0,05) em 734 nm. Em ambiente escuro e a temperatura ambiente, foi feita uma mistura reacional da bergenina (0,1-3 mM) com a solução de ABTS<sup>•+</sup>. O experimento foi realizado em duplicata e as leituras das absorvâncias foram realizadas transcorrido o tempo de 6 minutos em espectrofotômetro (734 nm). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> em relação ao Sistema (100% de radical ABTS<sup>•+</sup>). Foi determinada a CE<sub>50</sub> da bergenina e o mesmo procedimento foi realizado com o Trolox (0,1-3 mM) para comparações.

### 2.3.3. *Determinação da capacidade antioxidante contra o óxido nítrico (NO)*

Para avaliar a capacidade antioxidante contra o óxido nítrico produzido a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) (MACHADO et al., 2015) foi preparado uma mistura reacional contendo NPS em tampão fosfato (20 mM, pH 7,4) e a bergenina (0,1-3 mM). Depois de 60 minutos de reação a 37 °C foi adicionado 500 µL de reagente de Griess e as absorvâncias medidas usando um espectrofotômetro em 540 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da formação de íons nitrito em relação ao NPS (100 % de íons nitritos). Foi determinada a CE<sub>50</sub> necessário para inibir em 50% a formação de íons nitritos e como controle positivo foi utilizado Trolox (0,1-3 mM).

### 2.3.4. *Determinação da capacidade antioxidante contra a degradação da desoxirribose*

Para avaliar a capacidade antioxidante contra o radical hidroxila gerado pelo sistema de Fenton (Li et al., 2013), as soluções de bergenina (0,1-3 mM) foram adicionadas ao meio reacional contendo 2-desoxirribose, 3,2 mM de FeCl<sub>3</sub> (50 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) e tampão fosfato (20 mM, pH 7,4). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 40 minutos. Após isto, foi adicionado ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 1% (ATB, NaOH 50 mM). Depois, a mistura foi aquecida durante 15 minutos a 95 °C e as absorvâncias medidas em 532 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da degradação da 2-desoxirribose em

relação ao Sistema (100% de radical hidroxila) também foi possível determinar a  $CE_{50}$  da bergenina necessário para inibir em 50% a degradação da 2-desoxirribose. Como controle positivo foi utilizado o Trolox (0,1-3 mM).

### *2.3.5. Determinação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica*

Para avaliar da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica, o método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) descrito por De Freitas et al (2014) foi usado, homogenato de gema de ovo (40% p/v em tampão fosfato, 50 mM, pH 7,4) misturado com as soluções de bergenina (0,1-3 mM) e a peroxidação lipídica foi induzida pela adição de AAPH 200 mM (Dihidrocloridrato de 2,2' -azobis 2-metilpropinamida) pelo tempo de 60 minutos a 37 °C. Depois, foi adicionado ácido tricloroacético (15%) e ácido tiobarbitúrico (0,67%) e a mistura foi aquecida a 97 °C por 15 minutos. Após isto, a mistura foi centrifugada (2500 rpm) e a absorbância do sobrenadante medido em 532 nm. A extensão da peroxidação lipídica foi estimada pelos níveis de TBARS induzido pelo APPH (100% de TBARS) e a  $CE_{50}$  foi medida. O Trolox foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM.

### *2.3.6. Determinação do Potencial Redutor*

Foi preparado uma mistura reacional contendo bergenina (0,1-3 mM), 500 µL de ferricianeto de potássio 1% e 500 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6.6). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 20 minutos, seguido pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético 10%, 500 µL de água destilada e 125 µL de cloreto férrico 0,1% (CANABADY et al., 2015). A absorbância da mistura reacional foi medida a 700 nm contra branco que continham apenas tampão fosfato. Foi medido a  $CE_{50}$  e como controle positivo foi utilizado o Trolox.

### *2.3.7. Determinação da capacidade quelante do íon ferro ( $Fe^{2+}$ )*

Foi preparado uma mistura reacional contendo bergenina (0,1-3 mM), 100 µL de  $FeCl_2$  (2 mM) e 100 µL de Ferrozina (5 mM) incubada por 10 min a 37 °C,

passado isto a absorvância do complexo Ferrozina-Fe<sup>2+</sup> foi medida a 562 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da formação do complexo Ferrozina-Fe<sup>2+</sup> em relação ao Sistema (100% do complexo Ferrozina-Fe<sup>2+</sup>) e foi determinada a CE<sub>50</sub> da bergenina necessário para quelar 50% dos íons Fe<sup>2+</sup>.

#### *2.4. Determinação da capacidade antioxidante contra o dano oxidativo induzido em eritrócitos de ratos*

##### *2.4.1. Obtenção dos eritrócitos*

Amostras de sangue foram coletadas de Camundongos *Swiss* fêmeas pesando entre 25-30g. Os eritrócitos foram separados por centrifugação com PBS (Tampão fosfato salino: NaCl = 8 g/L, KCl = 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 1,44 g/L, e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0,24 g/L; pH 7,4) o procedimento foi repetido três vezes para a completa separação das células (DE FREITAS et al., 2014). O material obtido foi diluído a 10% com PBS. O uso do animal utilizado nesse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI #220/16).

##### *2.4.2. Avaliação da capacidade hemolítica da bergenina*

Para avaliar a capacidade hemolítica pela interação da bergenina com eritrócitos foi utilizado 300 µL da solução de eritrócitos misturada com 500 µL da solução de bergenina (0,1-3 mM) incubado a 37 °C por 120 minutos. Após o tempo de reação, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm e a absorvância do sobrenadante foi medida a 540 nm. Como controle positivo o mesmo procedimento foi utilizado com Triton X-100 (0,1-3 mM).

##### *2.4.3. Avaliação da capacidade de inibição da hemólise*

A metodologia descrita por Zhang et al (2014) foi utilizada para avaliar a capacidade antioxidante pela inibição da hemólise oxidativa induzida por radical peroxila gerado pela decomposição térmica do AAPH. Em resumo, várias concentrações da bergenina (0,1-3 mM) foram misturadas com 300 µL da

suspensão de eritrócitos, foi adicionado 500 µL da solução de AAPH (200 mM em PBS, pH 7,4). A mistura reacional foi incubada a 37 °C por 120 minutos. Após o intervalo de reação, foi adicionado 2400 µL de PBS seguida por centrifugação para determinar a taxa de hemólise em 540 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da hemólise em relação a hemólise completa da suspensão de eritrócitos induzido pelo AAPH (100% de hemólise) sem a bergenina. O mesmo procedimento experimental foi realizado com o controle positivo Trolox (0,1-3 mM).

#### *2.4.4. Determinação da capacidade de inibir a peroxidação lipídica em eritrócitos*

A peroxidação lipídica induzida por AAPH foi avaliada pela formação de TBARS (CHISTÉ et al., 2014). Foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético a 28%, para precipitar as proteínas antes da centrifugação. Em seguida o sobrenadante foi misturado com 500 µL de ácido tiobarbitúrico 20% e incubado por 30 minutos a 94 °C. Após o esfriamento, a absorbância a 532 nm e os resultados foram expressos em µmol de TBARS por grama de hemoglobina (µmol de TBARS / g de hemoglobina).

#### *2.4.5. Determinação dos níveis de glutathiona nos eritrócitos*

A glutathiona intracelular (GSH) foi determinada usando DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) (VAN DEN BERG et al., 1992). Foi adicionado água destilada à suspensão de eritrócitos para induzir a lise celular. O material obtido foi precipitado com ácido tricloroacético a 20% e centrifugado. Depois foi adicionado 100 µL de DTNB (solução diluído em citrato 1%) e a absorbância das amostras medidas em 412 nm. O teor de GSH foi expressa em µmol de glutathiona por grama de hemoglobina (µmol de GSH/g de hemoglobina).

#### *2.4.6. Determinação da hemoglobina em eritrócitos*

O conteúdo de hemoglobina foi determinado pelo método colorimétrico usando o reagente de Drabkin (Drabkin; Austin, 1935).

### 2.5. Análise estatística

Os dados numéricos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A Análise estatística foi realizada utilizando *one way* ANOVA, seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls* como *post hoc*. Os valores de  $CE_{50}$  foram calculados por regressão não linear com um intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram considerados estatisticamente significante quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism* 6.02 (San Diego, CA, USA).

## 3. Resultados

O presente trabalho descreve pela primeira vez o isolamento de bergenina em raízes de *P. dubium* com rendimento excelente ( $R = 5,10\%$  / extrato bruto). Os dados de RMN, IV-TF e DSC permitiram elucidar e mensurar a estabilidade da substância. Desta maneira, esta espécie vegetal é uma excelente fonte deste derivado do ácido gálico, uma vez que a síntese enantioseletiva é complicada devido a presença dos 4 centros assimétricos.

A análise do espectro de RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) indicou a presença de um singleto em  $\delta$  7,07 (1H), típico de hidrogênio ligado a anel aromático. Além disso, foram observados sinais na região entre  $\delta$  3,35-4,09 – característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados – e um dubleto em  $\delta$  4,94 (1H;  $J=10$  Hz), sugerindo a existência de um açúcar na estrutura deste composto. Ainda neste espectro, observou-se um sinal em  $\delta$  3,90 (3H; s) caracterizando a existência do grupo metoxila na molécula (**Tabela 1**).

**Tabela 1 - Dados do NMR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  [500 MHz (1H) e 125 MHz (13C),  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$  (ppm), J (Hz)].**

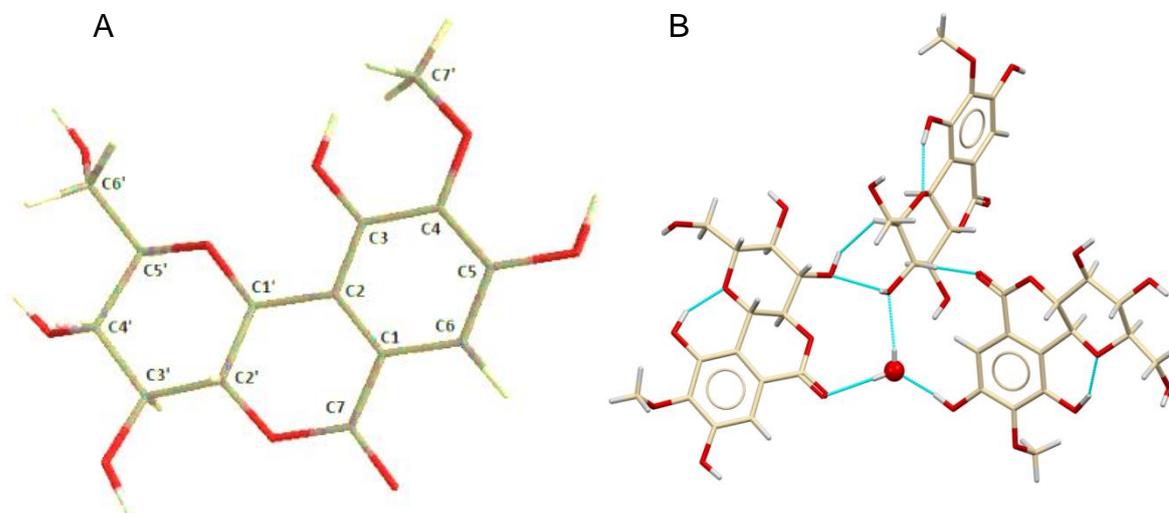
Nº	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	119.4
2	-	117.3
3	-	152.3
4	-	142.2
5	-	149.3
6	7.7 (s)	111.0
7	-	165.7
1'	4.94 (d;10)	74.2
2'	3.69-4.04 (m)	75.6
3'	3.69-4.04 (m)	81.4
4'	3.69-4.04 (m)	71.9
5'	3.69-4.04 (m)	83.0
6'	3.69-4.04 (m)	62.6
7'	3.90 (s)	60.9

Fonte: Autoria própria (2018).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) verificou-se a presença de sinais referentes a quatorze carbonos. O sinal em  $\delta$  165,7 caracterizou a presença de um carbono do grupo acila típico de éster, e os sinais em  $\delta$  111,0 (C-6),  $\delta$  117,3 (C-2),  $\delta$  119,4 (C-1),  $\delta$  142,2 (C-4),  $\delta$  149,3 (C-5) e  $\delta$  152,3 (C-3) foram atribuídos ao anel aromático pentassubstituído. O sinal em  $\delta$  60,9 confirmou a presença de um grupo metoxila na molécula, e os sinais de carbonos oxigenados em  $\delta$  83,0-62,6 confirmaram a presença de uma unidade glicosídica.

A estrutura molecular da bergenina foi determinada e analisada por difração de raios X. A projeção ORTEP é mostrada na **Figura 1A**. Os detalhes experimentais da coleta de dados de raios-X são apresentados (**Tabela 2**). Os cristais de bergenina foram apresentados no sistema cristalino ortorrômbico, o solvente de hidratação da molécula foi ligado ao composto através da interação com três ligações de hidrogênio O-H...O, com operações de simetria  $[-x, 1/2 + y, 1/2 - z]$ ,  $[1 + x, y, z]$ , e  $[1/2 - x, -y, 1/2 + z]$  (**Figura 1B**). Esses resultados confirmam a estrutura obtida no RMN.

**Figura 1 - Projeção da bergenina por ORTEP**



Molécula vista em perspectiva (A). Interação intermolecular da bergenina (B). Fonte: Autoria própria (2018).

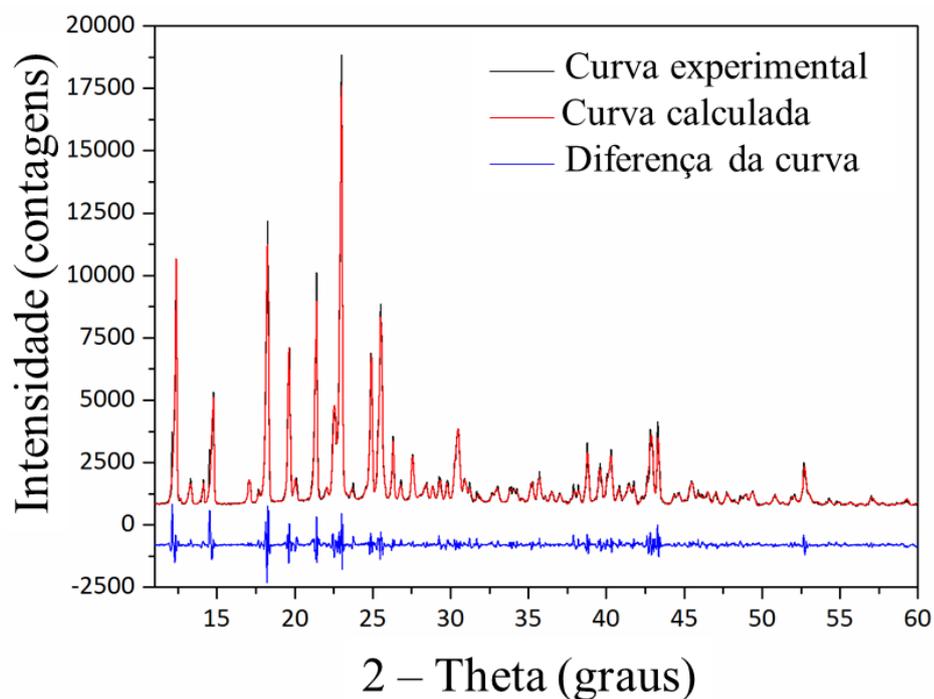
**Tabela 2 - Dados cristalográficos da bergenina (Difração de RX).**

<b>Fórmula química</b>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>
<b>Sistema de cristal</b>	Ortorrômbico
<b>a/Å</b>	7.498831
<b>b/Å</b>	13.93911
<b>c/Å</b>	14.29879
<b>α = β = γ/ °</b>	90
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Tamanho do cristal / Å</b>	9748.345
<b>R<sub>exp</sub></b>	3.15281
<b>R<sub>wp</sub></b>	7.49722
<b>Qualidade de ajuste, χ<sup>2</sup></b>	2.37795

Fonte: Autoria própria (2018).

A **Figura 2** mostra o ajuste após o refinamento de Rietveld. O método convergiu com uma curva de diferença suave e baixos valores de R. Nenhuma alteração foi encontrada na molécula de bergenina.

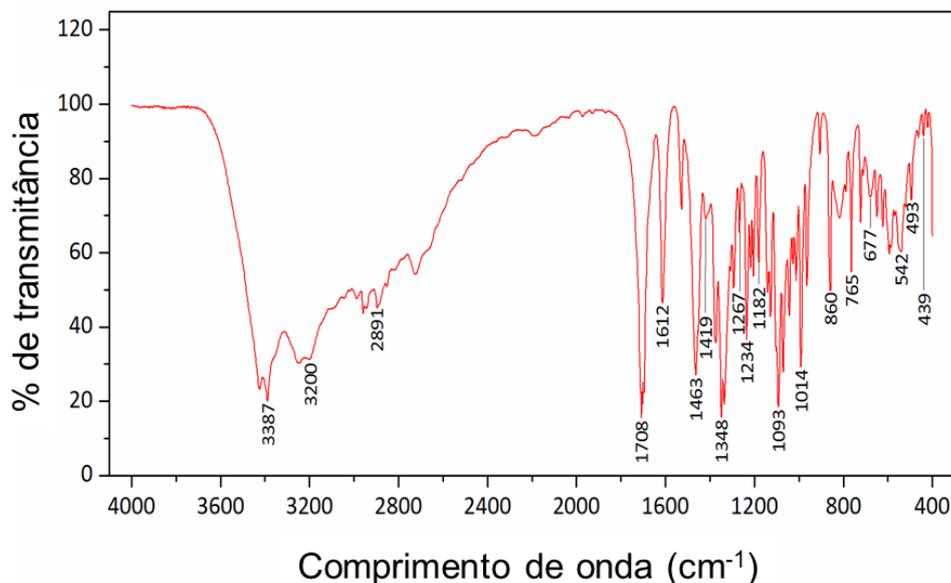
**Figura 2 - Difração de Raio X com refinamento pelo método Rietveld.**



Os dados experimentais são mostrados como uma primeira linha e a curva de diferença como a segunda linha abaixo. Fonte: Autoria própria (2018).

Os espectros infravermelhos de transformação de Fourier (FT-IR) da bergenina são mostrados na **figura 3** e as atribuições vibratórias descritas na **tabela 3**. A banda de absorção de alta intensidade entre  $3000$  e  $3600\text{ cm}^{-1}$  é referente à molécula de água na estrutura.

**Figura 3 - Espectro de Infravermelho com transformada de Fourier da bergenia**



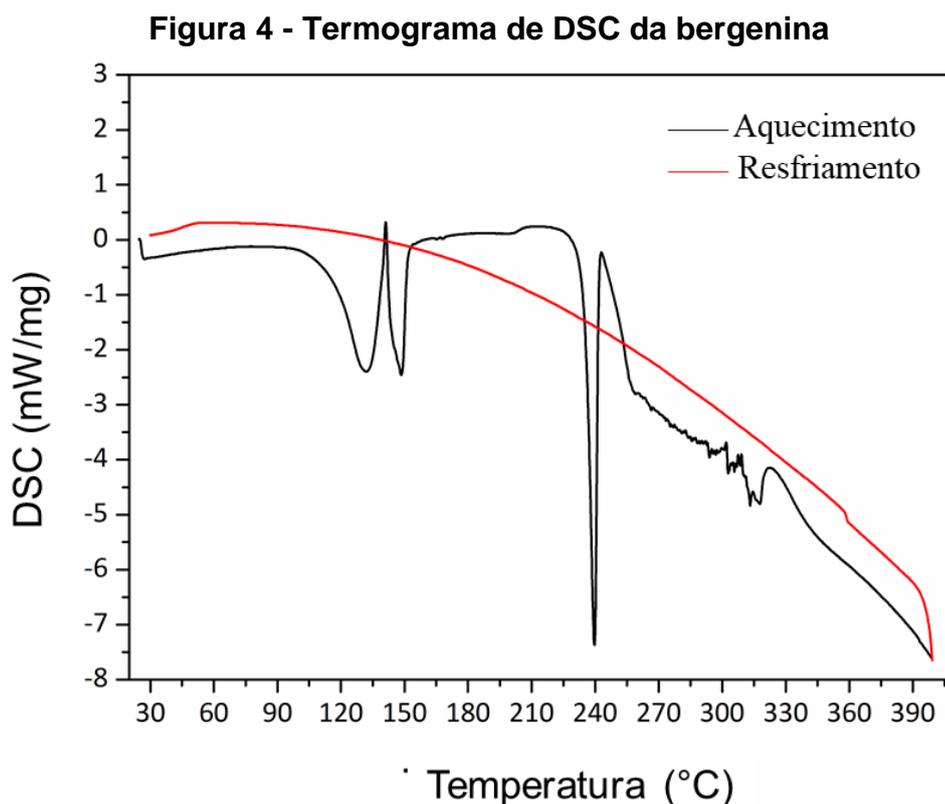
Fonte: Autoria própria (2018).

**Tabela 3 - Atribuições vibracionais de FT-IR da bergenia**

<b>FT-IR comp. de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>
439	Dobramento – estrutura completa
493	Dobramento (C-C-C) fora do plano – Benzeno
542	Dobramento (C-C-C) no plano – Benzeno
677	Dobramento (C-H) fora do plano – Benzeno
765	Dobramento (C-H) fora do plano – Benzeno
860	Dobramento (C-H) fora do plano – Benzeno
1014	Dobramento (C-H) no plano - Benzeno
1072	Alongamento (C-O) – Eter
1093	Dobramento (C-H) no plano – Benzeno
1182	Alongamento (C-O) – Hidroxila
1234	Dobramento (C-H) Benzeno / alongamento – C-O – Eter
1267	Alongamento (C-O) – Ester
1348	Dobramento (O-H) - Hidroxila
1419	Dobramento (C-H) – CH <sub>3</sub> (C12/ C15)
1463	Alongamento (C=C) – Benzeno
1612	Alongamento (C=C) – Benzeno
1708	Alongamento (C=O) – Cetona
2891	Alongamento (C-H) – CH <sub>3</sub> (C12/ C15)
3200	Alongamento (O-H) – Hidroxila
3387	Água

Fonte: Autoria própria (2018).

A curva de aquecimento na calorimetria exploratória diferencial (termograma DSC; **Figura 4**) mostra dois picos entre 132 e 148 °C devido à cristalização do composto. Outro pico é observado a 240 °C e representa a transição da fase sólida para a fase líquida. A curva de resfriamento indica que a bergenina sofre uma transformação irreversível.



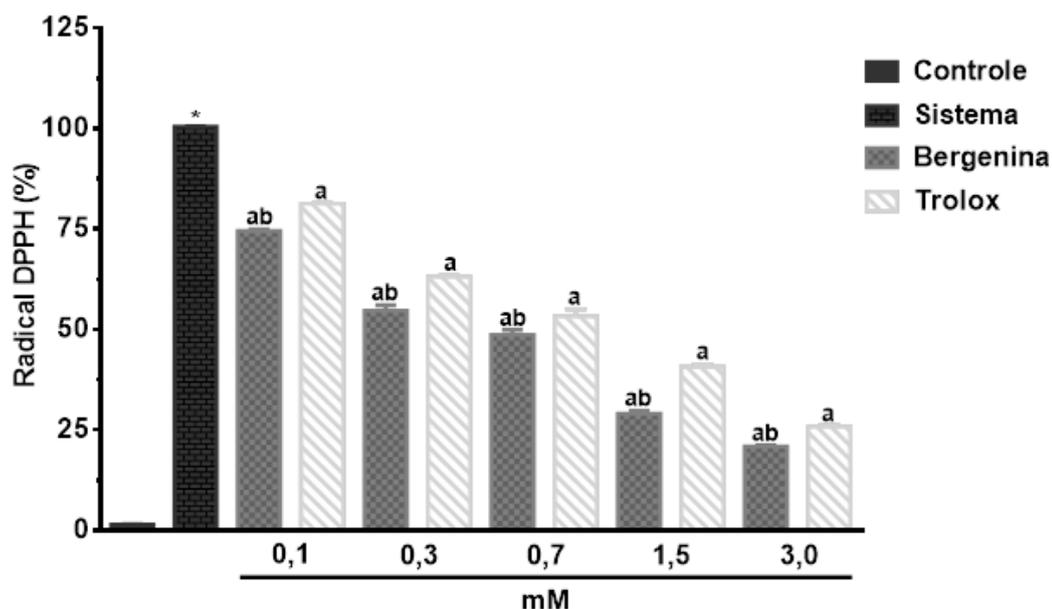
Fonte: Autoria própria (2018).

### 3.1. Capacidade antioxidante contra o DPPH<sup>•</sup>

O resultado correspondente a capacidade antioxidante da bergenina contra o radical DPPH<sup>•</sup> nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,7, 1,5 e 3,0 mM foram de 25,83 ± 0,21, 45,56 ± 1,32, 51,55 ± 1,22, 71,14 ± 0,75 e 79,24 ± 0,35%, respectivamente, na qual reduziu ( $p < 0,05$ ) o radical DPPH<sup>•</sup> em relação ao Sistema (**Figura 5**). Nas mesmas condições experimentais, o Trolox nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,7, 1,5 e 3,0 mM reduziu ( $p < 0,05$ ) a concentração do radical DPPH<sup>•</sup> apresentando capacidade antioxidante de 19,11 ± 0,18, 37,17 ± 0,40, 46,94 ± 1,72, 59,46 ± 0,67 e 74,36 ± 0,51%, respectivamente. De acordo com os resultados da capacidade antioxidante

na inibição do radical DPPH<sup>•</sup>, o valor da CE<sub>50</sub> foi de 0,59 ± 0,09 mM para a bergenina e de 0,76 ± 0,11 mM para o Trolox.

**Figura 5 - Capacidade antioxidante da bergenina contra o radical DPPH**

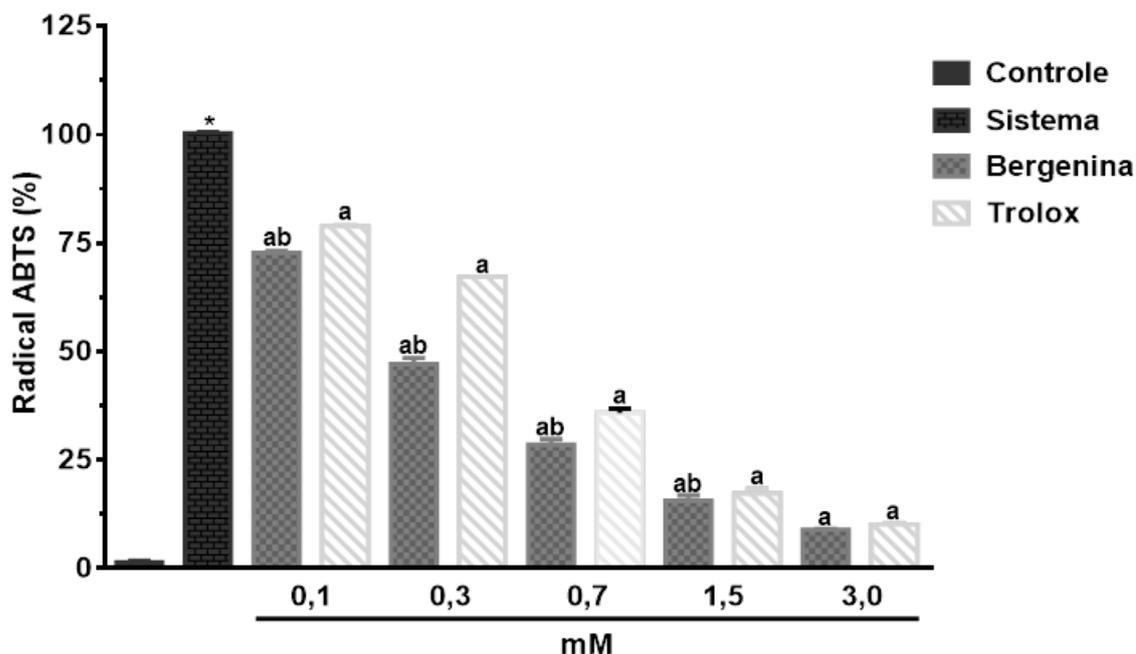


Os valores representam a média ± E.P.M. das porcentagens de neutralização *in vitro*, n = 5. \*p < 0,05 VS. controle (PBS, pH 7,4). <sup>a</sup>p < 0,05 VS. radical DPPH. <sup>b</sup>p < 0,05 VS. Trolox (ANOVA e *Student Newman-Keuls*).

### 3.2. Capacidade antioxidante contra o radical ABTS<sup>•+</sup>

Os resultados da capacidade antioxidante da bergenina contra o radical ABTS<sup>•+</sup> nas concentrações de 0,1, a 3,0 mM foram de 27,54 ± 0,19; 53,04 ± 0,80; 71,59 ± 0,72; 84,48 ± 0,76 e 91,08 ± 0,08%, respectivamente, na qual reduziu (p<0,05) o radical ABTS<sup>•+</sup> quando comparado ao Sistema (**Figura 6**). Nas mesmas condições experimentais, o Trolox nas concentrações de 0,1, a 3,0 mM reduziu (p<0,05) a concentração do radical ABTS<sup>•+</sup> em 21,49 ± 0,12, 33,06 ± 0,05, 64,27 ± 0,54, 82,80 ± 0,68 e 89,87 ± 0,17%, respectivamente. De acordo com os resultados da capacidade antioxidante na inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, o valor da CE<sub>50</sub> foi de 0,36 ± 0,05 mM para a bergenina e de 0,57 ± 0,04 mM para o Trolox.

**Figura 6 - Capacidade antioxidante da bergenina contra o radical ABTS**

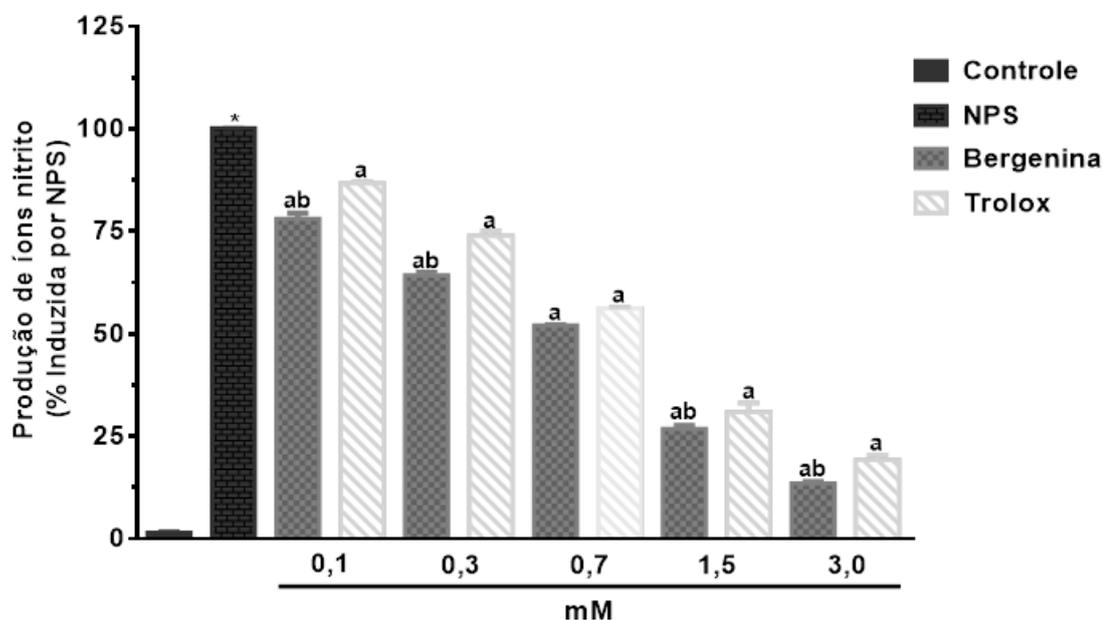


Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens de neutralização *in vitro*, n = 5. \* $p < 0,05$  VS. controle (PBS, pH 7,4). <sup>a</sup> $p < 0,05$  VS. radical ABTS. <sup>b</sup> $p < 0,05$  VS. Trolox (ANOVA e *Student Newman-Keuls*).

### 3.3. Capacidade antioxidante contra a produção de íons nitrito

O resultado correspondente à inibição da produção de íons nitrito pela bergenina nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM foram de  $22,04 \pm 0,81$ ,  $35,80 \pm 0,46$ ,  $48,02 \pm 0,16$ ,  $73,19 \pm 0,98$  e  $86,49 \pm 0,58\%$ , respectivamente, na qual reduziu ( $p < 0,05$ ) a formação de íons nitritos em relação ao NPS (**Figura 7**). Nas mesmas condições experimentais, o Trolox reduziu ( $p < 0,05$ ) a formação de íons nitritos em  $13,39 \pm 0,20$ ,  $26,21 \pm 0,65$ ,  $43,82 \pm 0,13$ ,  $69,20 \pm 1,31$  e  $80,79 \pm 1,28\%$ , respectivamente. De acordo com os resultados antioxidante, o valor da  $CE_{50}$  foi de  $0,71 \pm 0,06$  mM para a bergenina e de  $0,88 \pm 0,07$  mM para o Trolox.

**Figura 7 - Capacidade antioxidante da bergenina contra a produção de íons nitrito**

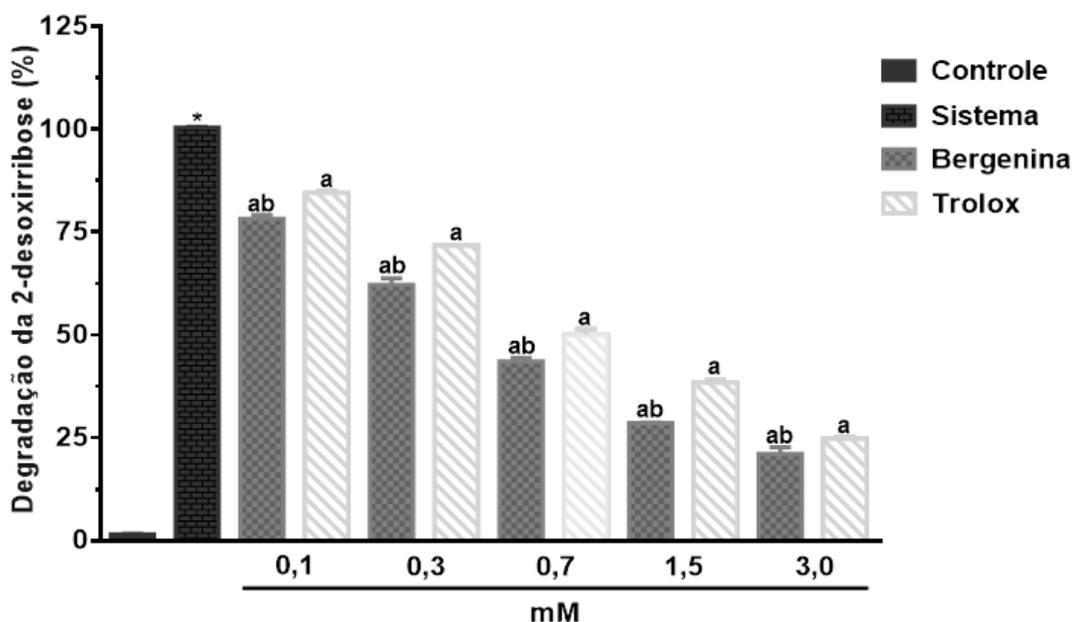


Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens de neutralização *in vitro*,  $n = 5$ . \* $p < 0,05$  VS. controle (PBS, pH 7,4). <sup>a</sup> $p < 0,05$  VS. NPS. <sup>b</sup> $p < 0,05$  VS. Trolox (ANOVA e *Student Neuman-Keuls*).

#### 3.4. Capacidade antioxidante contra o radical hidroxila

No presente estudo, os radicais hidroxilas foram gerados a partir da reação de Fenton e como mostrado na **Figure 8**, a bergenina conseguiu atuar na inibição da degradação da 2-desoxirribose pelo sequestro de radicais hidroxilas ( $p < 0,05$ ) em relação ao sistema. Nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM, a bergenina apresentou capacidade antioxidante de  $22,16 \pm 0,69$ ,  $38,11 \pm 1,54$ ,  $56,72 \pm 2,00$ ,  $71,58 \pm 0,11$  e  $79,07 \pm 1,65\%$ , respectivamente. O Trolox também inibiu a degradação de 2-desoxirribose em relação ao Sistema ( $p < 0,05$ ) apresentando  $15,84 \pm 0,43$ ,  $28,58 \pm 0,19$ ,  $50,27 \pm 1,48$ ,  $61,85 \pm 0,94$  e  $75,37 \pm 0,38\%$  de capacidade antioxidante respectivamente. De acordo com os resultados de inibição da degradação da 2-desoxirribose, o valor da  $CE_{50}$  foi de  $0,62 \pm 0,08$  mM para a bergenina e de  $0,83$  mM  $\pm 0,11$  para o Trolox.

**Figura 8 - Capacidade antioxidante da bergenina contra o radical hidroxila**

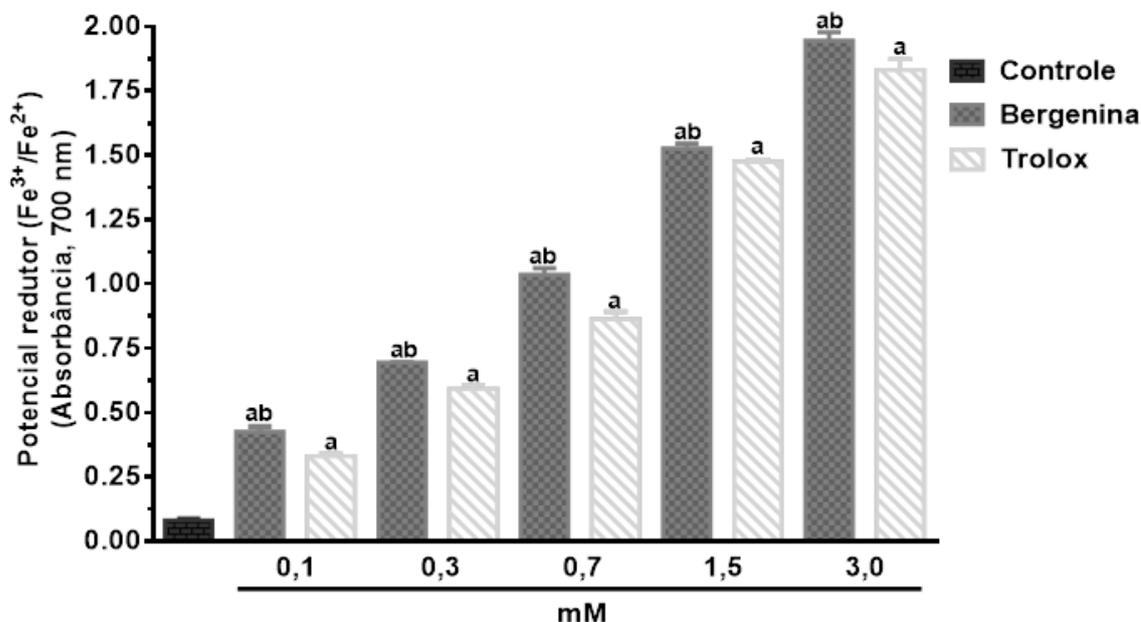


Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens de inibição *in vitro*,  $n = 5$  \* $p < 0,05$  VS. controle (PBS, pH 7,4). <sup>a</sup> $p < 0,05$  VS. sistema. <sup>b</sup> $p < 0,05$  VS. Trolox (ANOVA e Student Neuman-Keuls).

### 3.5. Potencial redutor da bergenina

O resultado correspondente a capacidade antioxidante da bergenina para o seu potencial redutor está representado na **Figura 9**. O aumento da absorvância em 700 nm nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM demonstra o potencial redutor da bergenina de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. O Trolox nas mesmas concentrações também apresentou significativo ( $p < 0,05$ ) potencial redutor em relação ao controle negativo. De acordo com esses resultados, os valores da  $CE_{50}$  da bergenina e do Trolox necessárias para reduzir ferricianeto de potássio ( $Fe^{3+}$ ) à ferrocianeto de potássio ( $Fe^{2+}$ ) em 50% da sua absorvância inicial foi de  $0,73 \pm 0,09$  mM e  $0,81 \pm 0,07$  mM, respectivamente.

**Figura 9 - Potencial redutor da bergenia**

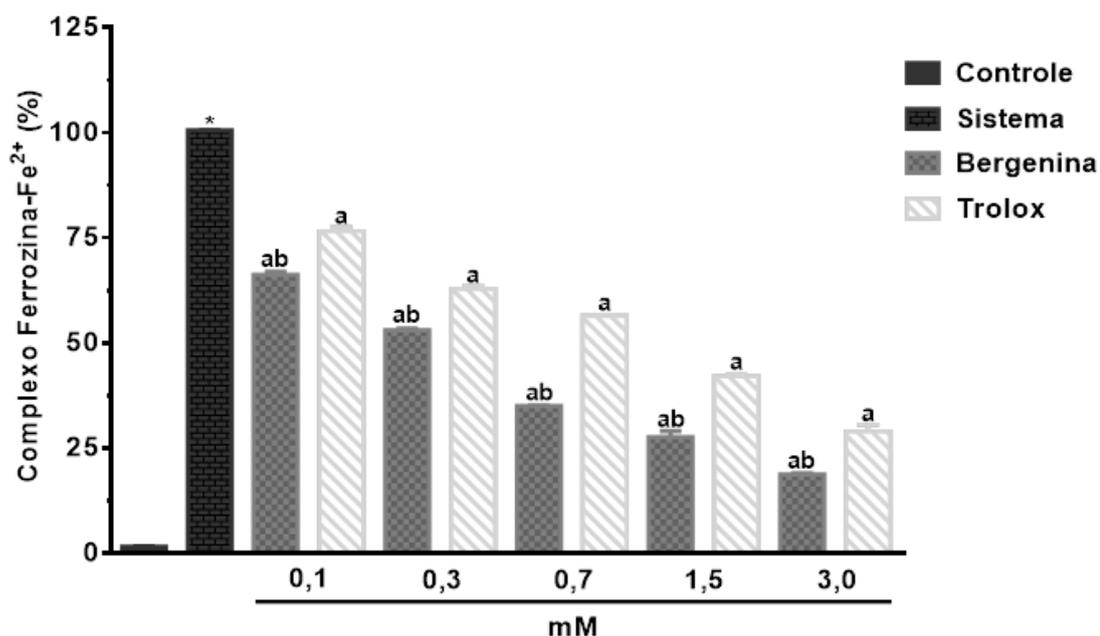


Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens de neutralização *in vitro*,  $n = 5$ . <sup>a</sup> $p < 0,05$  VS. controle. <sup>b</sup> $p < 0,05$  VS. Trolox (ANOVA e Student Neuman-Keuls).

### 3.6. Capacidade quelante do $Fe^{2+}$

O resultado antioxidante correspondente a capacidade quelante da bergenia nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM foram de  $34,20 \pm 0,63$ ,  $47,30 \pm 0,43$ ,  $65,27 \pm 0,17$ ,  $72,57 \pm 1,46$  e  $81,43 \pm 0,27\%$ , respectivamente, na qual reduziu ( $p < 0,05$ ) a formação do complexo Ferrozina- $Fe^{2+}$  em relação ao Sistema (**Figura 10**). O Trolox também apresentou capacidade quelante em relação ao Sistema ( $p < 0,05$ ) de  $23,85 \pm 1,01$ ,  $37,48 \pm 0,81$ ,  $43,88 \pm 0,22$ ,  $58,11 \pm 0,30$  e  $71,24 \pm 1,52\%$  respectivamente. De acordo com os resultados da capacidade quelante, o valor da  $CE_{50}$  foi de  $0,42 \pm 0,07$  mM para a bergenia e de  $0,81 \pm 0,13$  mM para o Trolox.

Figura 10 - Capacidade da bergenina de quelar o  $Fe^{2+}$



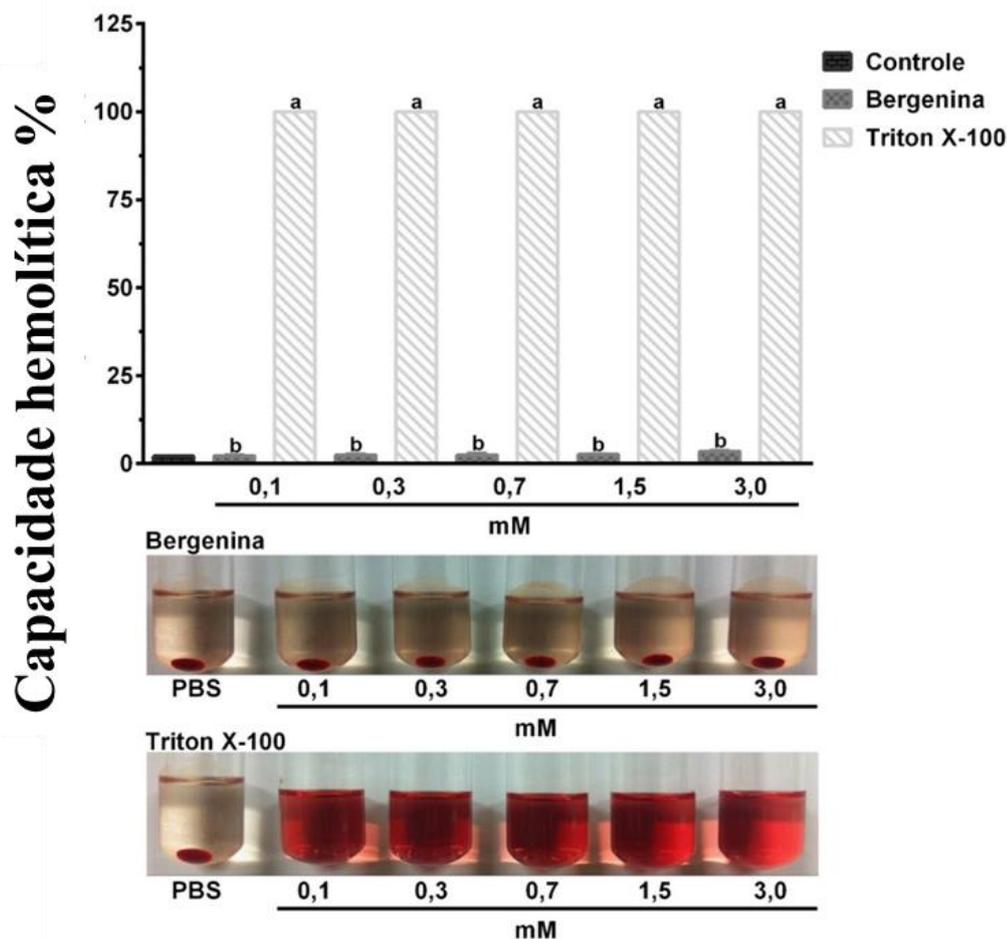
Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens de neutralização *in vitro*,  $n = 5$ . \* $p < 0,05$  VS. controle (PBS, pH 7,4). <sup>a</sup> $p < 0,05$  VS. sistema. <sup>b</sup> $p < 0,05$  VS. Trolox (ANOVA e *Student Neuman-Keuls*).

### 3.7. Capacidade antioxidante contra o dano oxidativo induzido em eritrócitos

#### 3.7.1. Capacidade de inibição da hemólise

Os resultados correspondentes a capacidade de inibir a hemólise em eritrócitos para a bergenina e para o Triton X-100 estão representados na **Figura 11**. Foi observado que a taxa de hemólise foi inferior a 2% mesmo com o aumento das concentrações da bergenina, na qual houve diferença significativa apenas em relação aos resultados do Triton X-100 [ $F = (9, 20) 1,04, p < 0,05$ ]. O Triton X-100 nas mesmas concentrações que a bergenina apresentou 100% de hemólise em relação ao controle a partir da concentração de 0,1 mM [ $F = (5, 12) 1,00, p < 0,05$ ].

Figura 11 - Capacidade da bergenia em inibir a hemólise



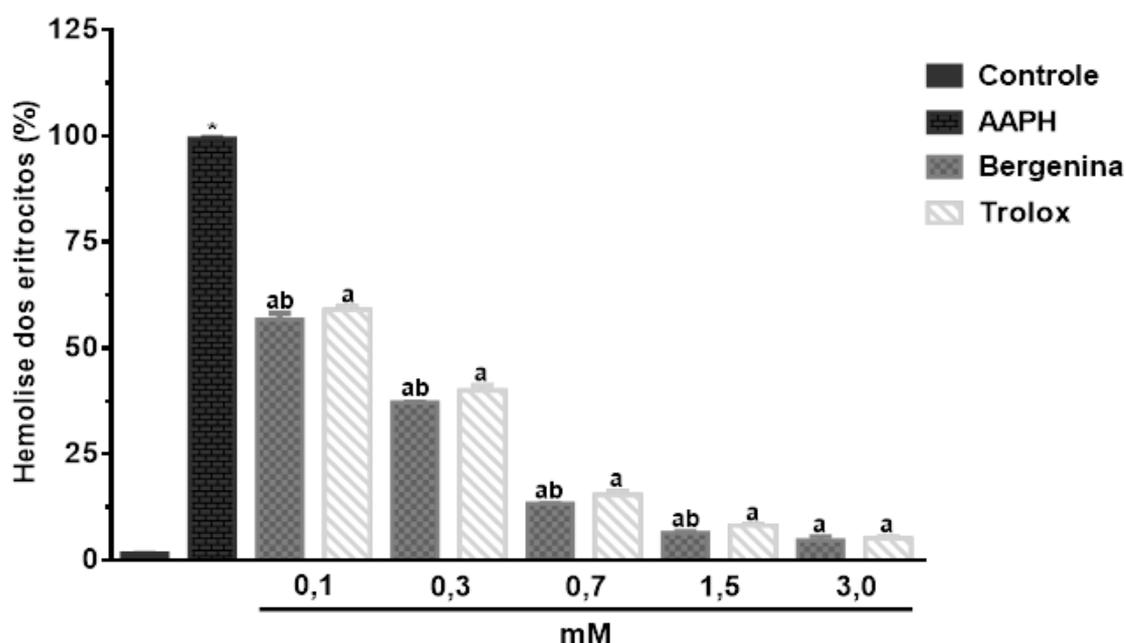
Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. da hemólise *in vitro*,  $n = 5$ , dos experimentos em duplicata. <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao controle (PBS) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao Triton X-100 (0,1-3,0 mM) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

### 3.7.2. Capacidade antioxidante pela inibição da hemólise oxidativa

O resultado antioxidante da bergenia pela inibição da hemólise induzido pelo AAPH em suspensão de eritrócitos está representado na **Figura 12**. Os valores da capacidade antioxidante nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM foram de  $42,93 \pm 0,84$ ,  $62,67 \pm 0,14$ ,  $86,66 \pm 0,08$ ,  $93,60 \pm 0,24$  e  $95,31 \pm 0,56$  %, na qual, a bergenia reduziu de forma significativa [ $F = (5, 12) 1,52, p < 0,05$ ] a hemólise quando comparado somente com o APPH. O Trolox também reduziu a hemólise de forma significativa [ $F = (6, 14) 0,92, p < 0,05$ ] em comparação ao APPH, apresentando

40,72 ± 0,53, 59,85 ± 0,71, 84,62 ± 0,57, 91,72 ± 0,13 e 94,87 ± 0,25% de capacidade antioxidante, respectivamente. De acordo com os resultados da capacidade antioxidante pela inibição da hemólise em eritrócitos, o valor da CE<sub>50</sub> foi de 0,16 ± 0,01 mM para a bergenia e de 0,19 ± 0,02mM para o Trolox.

**Figura 12 - Expressão da capacidade antioxidante da bergenia pela inibição da hemólise oxidativa**



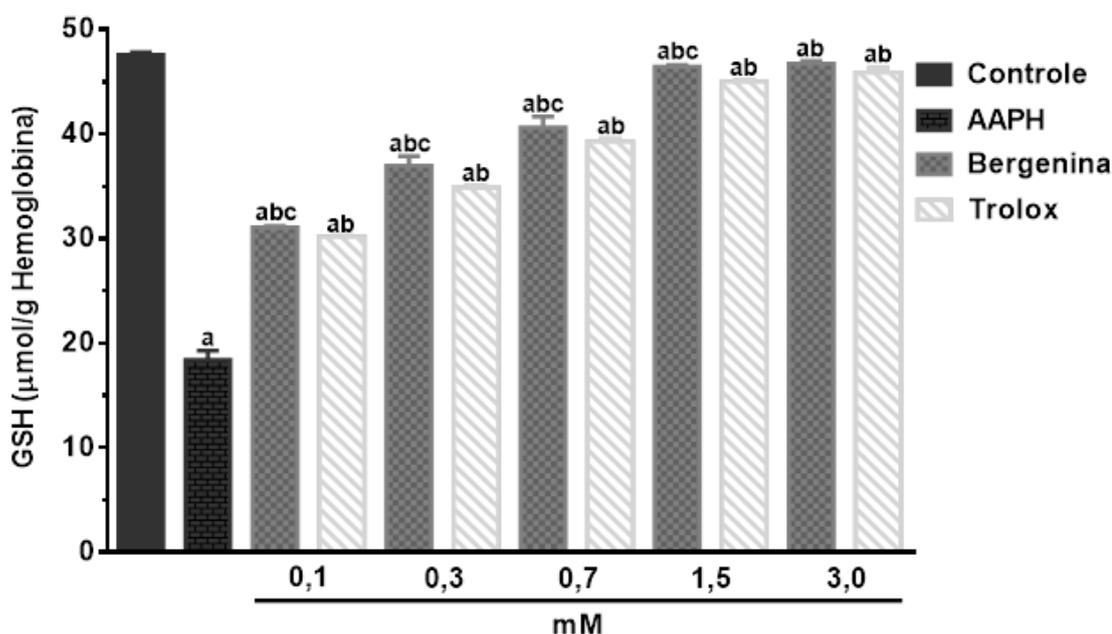
Capacidade antioxidante da bergenia em diferentes concentrações (0,1-3,0 mM) pela inibição da hemólise de eritrócitos induzida pelo AAPH. Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 5. \*p<0,05 versus controle (PBS, pH 7,4); <sup>a</sup>p<0,05 em relação ao AAPH (100% de hemólise); <sup>b</sup>p<0,05 em relação ao Trolox (0,1-3,0 mM) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

### 3.7.3. Determinação dos níveis de GSH em eritrócitos

O nível de GSH quantificado em suspensão de eritrócitos no controle foi de 47,56 ± 0,14 µmol/g hemoglobina, sendo que este valor diminuiu para 18,41 ± 0,51 µmol/g hemoglobina após adição de AAPH. Nas concentrações de 0,1 a 3,0 mM, os níveis de GSH foram de 31,09 ± 0,04, 36,95 ± 0,54, 40,64 ± 0,58, 46,45 ± 0,09 e 46,74 ± 0,15 µmol/g hemoglobina, na qual, a bergenia inibiu a depleção [F = (5, 12) 0,62, p<0,05] dos níveis de GSH quando comparado somente com o AAPH (**Figura 13**). O Trolox também apresentou capacidade antioxidante e proporcionou um aumento dos níveis de GSH [F = (5, 12) 0,54, p<0,05] em relação ao AAPH em

30,19 ± 0,08, 34,87 ± 0,13, 39,26 ± 0,15, 45,00 ± 0,12 e 45,89 ± 0,24 mol/g hemoglobina nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,7, 1,5 e 3,0 mM, respectivamente. De acordo com estes resultados, a bergenina e o Trolox aumentaram os níveis de GSH proporcionalmente ao aumento da concentração.

**Figura 13 - Determinação dos níveis de GSH em eritrócitos após o tratamento com bergenina**



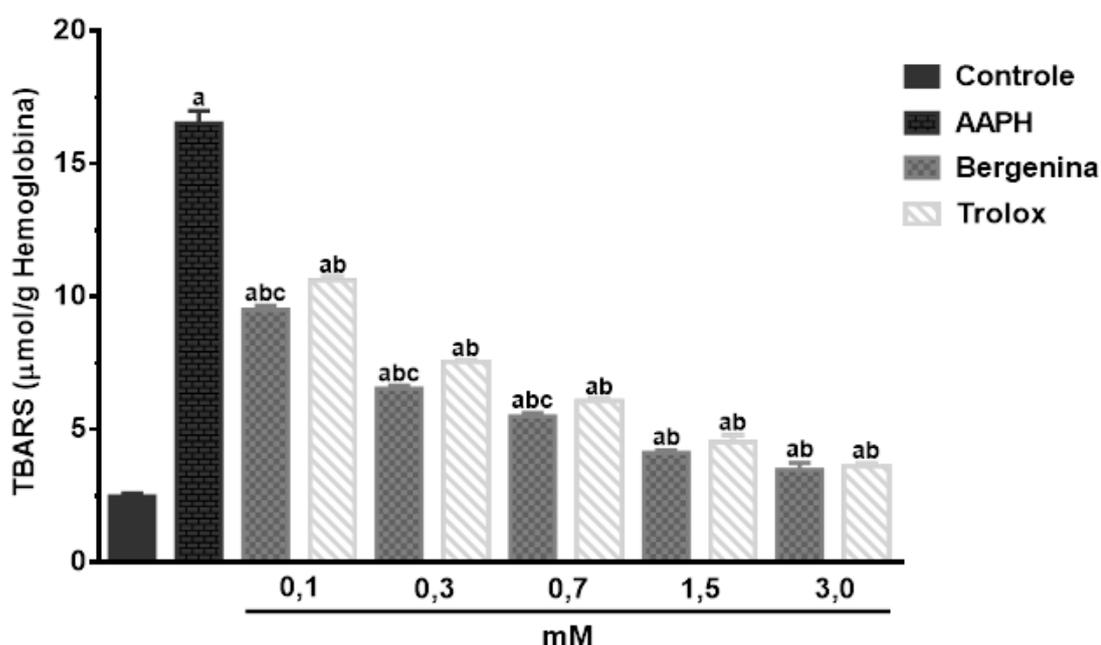
Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 5, dos experimentos em duplicata. <sup>a</sup>p < 0,05 em relação ao controle (PBS, pH 7,4); <sup>b</sup>p < 0,05 em relação ao AAPH; <sup>c</sup>p < 0,05 em relação ao Trolox (0,1-3,0 mM) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

#### 3.7.4. Peroxidação lipídica em eritrócitos

O resultado antioxidante da bergenina no teste de inibição da peroxidação lipídica induzido pelo AAPH em suspensão de eritrócitos está representado na **Figura 14**. A quantidade de TBARS encontrado no controle foi de 1,52 µmol/g de hemoglobina, sendo observado um aumento para 16,51 ± 0,47 µmol/g de hemoglobina no grupo que foi adicionado AAPH. As concentrações de bergenina avaliadas (0,1 a 3,0 mM), os níveis de TBARS foram de 9,49 ± 0,07, 6,52 ± 0,06, 5,48 ± 0,08, 4,11 ± 0,53 e 3,61 ± 0,05 µmol/g de hemoglobina, nas quais, a bergenina reduziu de forma significativa [F = (5, 12) 0,74, p < 0,05] os níveis de TBARS quando comparado com o grupo AAPH. O Trolox também reduziu os níveis

de TBARS [ $F = (5, 12) 0,69, p < 0,05$ ] em comparação ao AAPH, apresentando  $10,59 \pm 0,17, 7,53 \pm 0,04, 6,05 \pm 0,07, 4,49 \pm 0,16$  e  $3,61 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$  hemoglobina nas concentrações de 0,1, 0,3, 0,7, 1,5 e 3,0 mM, respectivamente. Tanto a bergenia quanto o Trolox inibiram a formação de TBARS proporcionalmente ao aumento da concentração.

**Figura 14 - Análise da peroxidação lipídica em eritrócitos após o tratamento com bergenia**

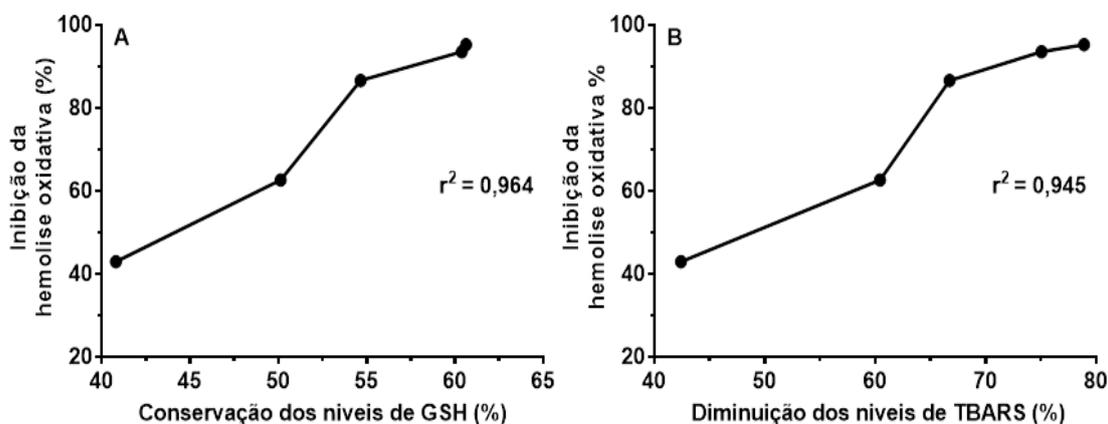


Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ . <sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação ao controle (PBS, pH 7,4); <sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação ao AAPH; <sup>c</sup> $p < 0,05$  em relação ao Trolox (0,1-3,0 mM) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

### 3.8. Correlação antioxidante

A estatística do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) obtido para o resultado antioxidante da bergenia demonstrou a existência de uma relação positiva entre a inibição da hemólise oxidativa e o aumento dos níveis de GSH ( $r = 0,982, p < 0,05$ , **Figura 15A**) e a diminuição dos níveis de TBARS ( $r = 0,972, p < 0,05$ , **Figura 15B**).

**Figura 15 - Análise da correlação de Pearson para avaliar o parâmetro antioxidante da bergenina**



Análise de correlação de Pearson usado para estabelecer a relação entre a capacidade antioxidante da bergenina e os parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos. (A) Correlação entre a inibição da hemólise oxidativa e os níveis de GSH; (B) Correlação entre a inibição da hemólise oxidativa e os níveis de TBARS. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ , dos experimentos em duplicata.

#### 4. Discussão

Para confirmar a ação antioxidante da bergenina, foi realizado o método de DPPH $\cdot$ . Essa técnica envolve o sequestro do radical livre estável DPPH $\cdot$  e a capacidade antioxidante é analisada pela diminuição da absorbância da solução de DPPH $\cdot$  em 517 nm, na qual o radical DPPH $\cdot$  de cor púrpura é reduzido para formar DPPH $_2$  de cor amarela (MUSA; ABDULLAH; AL-HAIQI, 2015). Com base neste princípio, o resultado obtido no presente estudo demonstrou que a bergenina apresenta elevada capacidade antioxidante. Resultado semelhante foi obtido para a bergenina no estudo de Zamarrud et al (2011), no qual foi demonstrado que este composto tem a capacidade de inibir o radical DPPH $\cdot$  em mais de 80% na concentração usada. De acordo com esse método (MUSA; ABDULLAH; AL-HAIQI, 2015), a ação antioxidante da bergenina contra o radical DPPH $\cdot$  pode ocorrer pela transferência de átomo de hidrogênio formando uma molécula estável de DPPH $_2$ .

Outro teste utilizado foi inibição do radical ABTS $^{+\cdot}$ , que é um método antioxidante convencional, simples e extensivamente utilizado junto com o radical DPPH $\cdot$  para avaliar a capacidade antioxidante de várias substâncias (MACHADO et al., 2015; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). Neste método, o radical ABTS $^{+\cdot}$  de coloração azul/verde é produzido por meio da oxidação da solução de ABTS $^+$  pelo persulfato de potássio e a reação com um composto antioxidante é monitorada pela diminuição

da absorvância da reação em 734 nm. Desta forma e similarmente aos resultados obtidos no método DPPH<sup>•</sup>, o presente estudo demonstrou que a bergenina é um potente antioxidante pela inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>.

Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Kumar et al (2012), no qual foi demonstrado que a bergenina apresenta elevada capacidade antioxidante contra o radical ABTS<sup>•+</sup> a partir da concentração de 0,2 mM. De acordo com este método (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015), a inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> pela bergenina pode ocorrer pela transferência de átomo de hidrogênio ou principalmente por elétron formando uma molécula de ABTS<sup>+</sup>. Quando os resultados antioxidantes do DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> são comparados, é possível observar um melhor potencial antioxidante da bergenina contra o radical ABTS<sup>•+</sup>, sugerindo que o mecanismo da ação antioxidante deste composto pode ocorrer principalmente pela transferência de elétron. Um melhor potencial antioxidante contra o radical ABTS<sup>•+</sup> e em relação ao radical DPPH<sup>•</sup> também foi observado no estudo *in vitro* realizado por Srinivasan et al (2007) com a bergenina.

Posteriormente, foi medida a capacidade antioxidante pela inibição do óxido nítrico, que é baseada no princípio de que o nitroprussiato de sódio numa solução aquosa em pH fisiológico gera espontaneamente o óxido nítrico, na qual interage com o oxigênio para produzir íons nitrito (NO<sup>2-</sup>), que podem ser medidos pela reação com o reagente de Griess (DE FREITAS et al., 2014). De acordo com o resultado obtido, a bergenina reagiu com óxido nítrico e conseguiu inibir a produção de íons nitrito. Essa capacidade antioxidante foi proporcional ao aumento da concentração e quando os resultados são comparados com o Trolox, foi observado que a bergenina foi mais efetiva na diminuição da produção de íons nitrito.

Segundo o estudo realizado por Singh et al. (2009), a capacidade antioxidante da bergenina contra o radical hidroxila pode ocorrer com a adição eletrofílica ao anel aromático, pela abstração de átomo de hidrogênio a partir de  $\beta$ -carbono do grupo CH<sub>2</sub>OH e pela transferência de elétrons. Como observado em nossos resultados, a capacidade antioxidante da bergenina foi proporcional ao aumento da concentração e quando os resultados são comparados com o Trolox, é observado que a bergenina nas concentrações iguais ao Trolox inibiu a degradação da 2-desoxirribose pelo possível sequestro de radicais hidroxilas de forma superior ao Trolox.

O potencial redutor da bergenina foi demonstrado pela transformação do ferricianeto de potássio [Fe<sup>3+</sup>(CN<sup>-</sup>)<sub>6</sub>] de cor amarela à ferrocianeto de potássio

$[\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6]$  de cor verde. Essa mudança de cor ocorre por meio da capacidade de transferência de elétrons, que serve como um importante indicador da capacidade antioxidante apresentado pela bergenina, demonstrado anteriormente no estudo de Singh et al (2009) pela formação do cátion radical clorpromazina ( $\text{CPZ}^{\bullet+}$ ) em 530 nm.

Processos como eliminação de radicais livres e/ou inibição da peroxidação lipídica é mediada pela reação redox e de acordo com o resultado obtido no presente estudo, a bergenina apresentou elevado potencial redutor de acordo com o aumento da concentração, sendo que, esse resultado foi superior ao apresentado pelo Trolox. No contexto do potencial de redução, o resultado obtido no presente estudo demonstrou que a capacidade quelante da bergenina pela inibição da formação do complexo Ferrozina- $\text{Fe}^{2+}$  foi mais eficiente que o Trolox.

A capacidade antioxidante de uma determinada substância pode ser avaliada com mais precisão através da inibição da oxidação em fluídos biológicos. Desta forma, a fácil acessibilidade dos eritrócitos torna-os um modelo atraente para estudar o estresse oxidativo *in vitro*. No presente estudo, a inibição do dano oxidativo induzido pelo AAPH em suspensão de eritrócitos de ratos foi realizado e de acordo com os resultados obtidos, a bergenina conseguiu proteger os eritrócitos de forma proporcional ao aumento da concentração em comparação com os danos induzidos apenas pelo AAPH.

Quando os resultados foram comparados com o Trolox, ficou demonstrado que a bergenina é mais efetiva na proteção contra os danos oxidativos. Essa elevada capacidade antioxidante da bergenina resultou em um baixo nível de depleção da enzima GSH, na qual atua como o primeiro mecanismo de defesa celular contra os radicais livres.

Desta forma, processos oxidativos que ocorrem na membrana dos eritrócitos provoca uma rápida redução do nível de GSH intracelular e como observado no presente estudo, a bergenina preveniu a redução da GSH quando comparado ao APPH. Este resultado está em concordância com os estudos realizados por Lim et al. (2000) e Kim et al. (2000), na qual foi demonstrado que a bergenina previniu a depleção dos níveis de GSH em fígados de ratos intoxicados com Tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ).

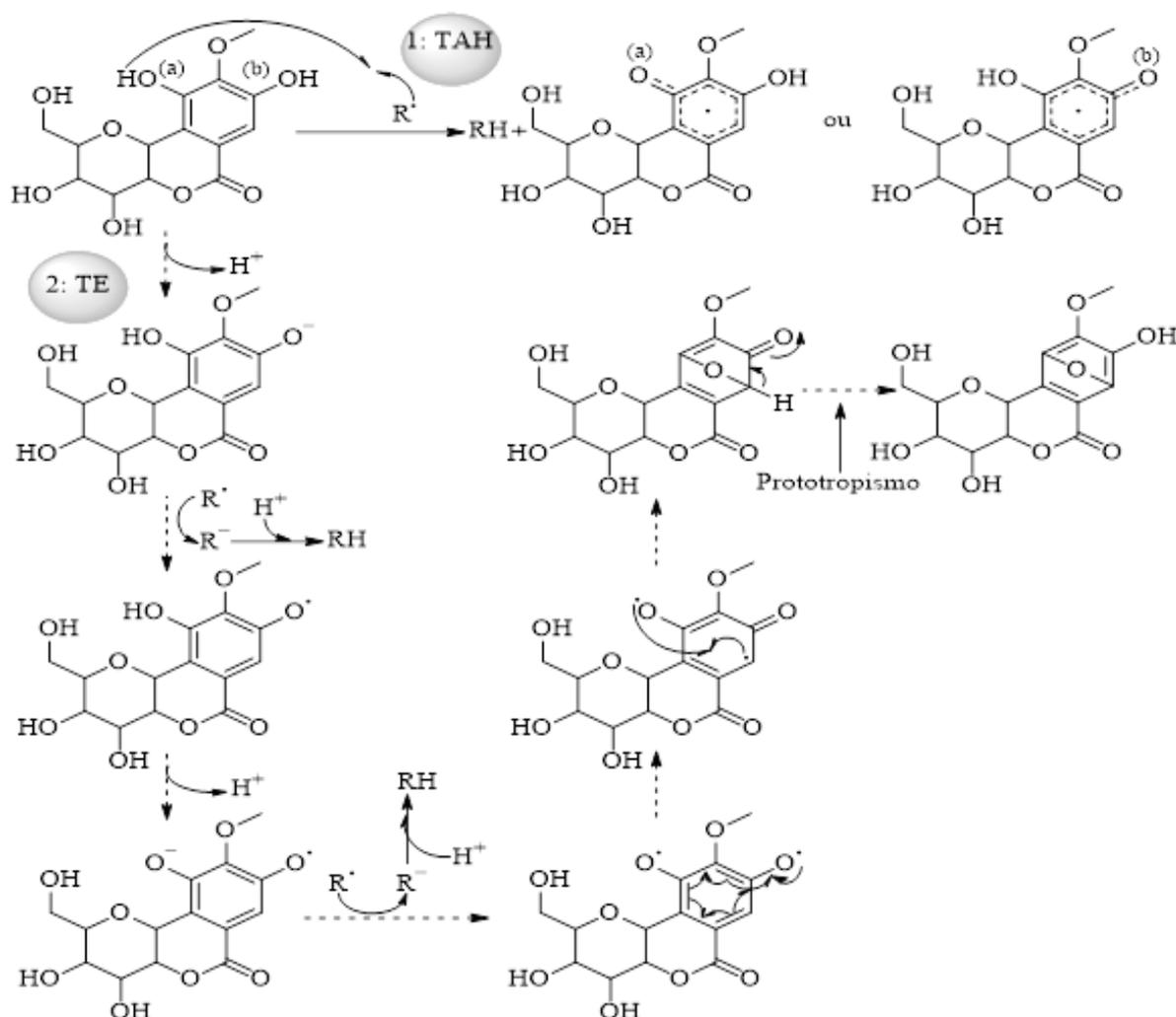
De acordo com os resultados do teste de hemólise oxidativo, os eritrócitos apenas em contato com o APPH apresentaram um elevado nível de peroxidação lipídica, o qual pode estar associada com o aumento da depleção de GSH

demonstrado no agente oxidante APPH. Quando os eritrócitos foram tratados com a bergenina, os níveis de TBARS foram prevenidos. Este resultado demonstrou que a bergenina atuou na neutralização de radicais peroxilas gerados a partir da decomposição do APPH. Os principais mecanismos que provocam a hemólise de eritrócitos envolvem a interação com agentes oxidantes como os radicais livres e pela penetração na membrana celular. No presente estudo, a bergenina apresentou capacidade antioxidante sem induzir hemólise dos eritrócitos quando comparado ao controle. Assim, é possível sugerir que a bergenina no teste de hemólise não atua como um agente oxidante ao interagir com as membranas dos eritrócitos, demonstrando uma possível segurança a nível celular.

O resultado estabelecido sobre os níveis de TBARS em eritrócitos está de acordo com a capacidade antioxidante observado no estudo realizado por Lim et al (2000) e Kim et al (2000), na qual foi demonstrado uma diminuição dos níveis de TBARS em fígados de ratos intoxicados com Tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Kumar et al (2012) destacou a prevenção da peroxidação lipídica junto com o aumento do sistema de defesa antioxidante celular em fígados de ratos diabéticos.

Os dois principais possíveis mecanismo pela qual a bergenina exerce efeito antioxidante está representado na **Figura 16**. No primeiro mecanismo, os dois grupamentos hidroxilas podem doar hidrogênio radicalar (TAH) para o elétron desemparelhado do radical ( $\text{R}^{\bullet}$ ), gerando depois um radical estabilizado por ressonância. No segundo mecanismo proposto, na transferência de elétrons (TE) pode ser formado um birradical que vai gerar por ciclização com um dos oxigênios dois anéis heterocíclicos de cinco membros, sendo um deles aromático.

**Figura 16 - Possíveis mecanismos da ação antioxidante da bergenina na neutralização do radical  $R^\bullet$  ( $DPPH^\bullet$ ,  $ABTS^{+\bullet}$ ,  $OH^\bullet$  e  $L^\bullet$ )**



Fonte: Autoria própria (2018).

## 5. Conclusão

Em todos os resultados obtidos no presente trabalho observou-se que a bergeniina possui grande capacidade antioxidante *in vitro* em modelos biológicos e não biológicos sendo comparado com as propostas de mecanismo de ação, assim, a bergeniina pode representar uma nova fonte alternativa de substancias bioativas principalmente com potencial antioxidante para diversas aplicações nas indústrias de fármacos, cosméticos, alimentos e outras.

## Referências

- AGGARWAL, D.; KAUSHAL, R.; KAUR, T.; BIJARNIA, R. K.; PURI, S.; SINGLA, S. K. The most potent antilithiatic agent ameliorating renal dysfunction and oxidative stress from *Bergenia ligulata* rhizome. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, Part A, p. 85-93, 2014.
- ASNAASHARI, M., FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v.159, p. 439-444, 2014.
- BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; REZENDE, L. C.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P., A C-glucoside benzoic acid derivative from the leaves of *Peltophorum dubium*. **Phytochemistry Letters** 2010, 3, 168-170.
- BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133-152, 2015.
- CANABADY-ROCHELLE, L. L. S.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; KESSLER, V.; AYMES, A.; FOURNIER, F.; GIRARDET, J.-M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. **Food Chemistry**, v. 183, p. 129-135, 2015.
- CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A. Z.; FERNANDES, E. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. **Life Sciences**, v. 99, n. 1–2, p. 52-60, 2014.
- DE FREITAS, R.; DA SILVA, O. G.; DE FREITAS, R.; BARREIROS, A.; DAVID, J.; ALVES, C.; PINTO, C.; DAVID, J. In Vitro Effects of Arylhydrocoumarin on Free Radicals and Oxidative Stress in Erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae*. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 11, p. 1069-82, 2014.
- DE OLIVEIRA, C. M.; NONATO, F. R.; DE LIMA, F. O.; COUTO, R. D.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Antinociceptive Properties of Bergenin. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2062-2068, 2011.
- DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 51-65, 1935.
- FARRUGIA, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: an update. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, p. 849–854, 2012.
- GAO, X.-J.; GUO, M.-Y.; ZHANG, Z.-C.; WANG, T.-C.; CAO, Y.-G.; ZHANG, N.-S. Bergenin Plays an Anti-Inflammatory Role via the Modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways in a Mouse Model of LPS-Induced Mastitis. **Inflammation**, p. 1-9, 2014.

JAIN, S. K.; SINGH, S.; KHAJURIA, A.; GURU, S. K.; JOSHI, P.; MEENA, S.; NADKARNI, J. R.; SINGH, A.; BHARATE, S. S.; BHUSHAN, S.; BHARATE, S. B.; VISHWAKARMA, R. A. Pyrano-isochromanones as IL-6 Inhibitors: Synthesis, in Vitro and in Vivo Antiarthritic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7085-7097, 2014.

KASHIMA, Y.; MIYAZAWA, M. Synthesis, antioxidant capacity, and structure–activity relationships of tri-O-methylnorbergenin analogues on tyrosinase inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 24, p. 6580-6584, 2013.

KIM, H.-S.; LIM, H.-K.; CHUNG, M.-W.; KIM, Y. C. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 79-83, 2000.

KUMAR, R.; PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; LALOO, D.; KRISHNAMURTHY, S.; HEMALATHA, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 395-401, 2012.

LI, X. Solvent effects and improvements in the deoxyribose degradation assay for hydroxyl radical-scavenging. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2083-2088, 2013.  
LIANG, J.; LI, Y.; LIU, X.; HUANG, Y.; SHEN, Y. A. N.; WANG, J. U. N.; LIU, Z.; ZHAO, Y. A. In vivo and in vitro antimalarial activity of bergenin. **Biomedical Reports**, v. 2, n. 2, p. 260-264, 2014.

LIM, H.-K.; KIM, H.-S.; CHOI, H.-S.; OH, S.; CHOI, J. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 469-474, 2000.

LUTTEROTTI, L.; MATTHIES, S.; WENK, H. R.; SCHULTZ, A. S.; RICHARDSON JR., J. W. Combined texture and structure analysis of deformed limestone from time-of-flight neutron diffraction spectra. **Journal of Applied Physics**, v. 81, n. 2, p. 594-600, 1997.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; DE SOUSA, É. B. V.; COSTA, I. H. F.; MACHADO, K. C.; DE SOUSA, D. P.; SATYAL, P.; DE FREITAS, R. M. Spectroscopic studies on the in vitro antioxidant capacity of isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, n. 0, p. 47-53, 2015.

MADISON, B. A. I. **SADABS**. USA. 2002.

MCCUSKER, L. B.; VON DREELE, R. B.; COX, D. E. LOUËR D. SCARDI, P. Rietveld refinement guidelines. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 36-50, 1999.

MU, L.-H.; FENG, J.-Q.; LIU, P. A new bergenin derivative from the rhizome of *Ardisia gigantifolia*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 14, p. 1242-1245, 2012.

MUSA, K. H.; ABDULLAH, A.; AL-HAIQI, A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: application of artificial neural networks. **Food Chemistry**, *In press*, 2015.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; AHMAD, S. F.; BANI, S.; QAZI, G. N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis—A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 401-405, 2007.

OLIVEIRA, A. L.; POZZA, L. N. L.; SANTOS, D. N.; KAMIMURA, E. S.; VICENTE, E.; CABRAL, F. A. Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. **Journal Supercrit. Fluids**, v. 83, n. 2013, p. 65-71, 2013.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

RAJ, M. K.; DURAI PANDIYAN, V.; AGUSTIN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of bergenin isolated from *Peltophorum pterocarpum* DC. flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, Supplement, p. S901-S904, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 1999.

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

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. Spectrometric identification of organic compounds. 6<sup>a</sup> ed.; **Wiley**; New York, 1998.

SINGH, U.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I. Reactions of hydroxyl radical with bergenin, a natural poly phenol studied by pulse radiolysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 6008-6014, 2009.

SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; SURESH, B. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 284-291, 2007.

VAN DEN BERG, J. J. M.; OP DEN KAMP, J. A. F.; LUBIN, B. H.; ROELOFSEN, B.; KUYPERS, F. A. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, n. 6, p. 487-498, 1992.

YUN, J.; LEE, Y.; YUN, K.; OH, S. Bergenin decreases the morphine-induced physical dependence via antioxidative activity in mice. **Archives of Pharmacal Research**, p. 1-7, 2014.

ZAMARRUD; ALI, I.; HUSSAIN, H.; AHMAD, V. U.; QAISER, M.; AMYN, A.; MOHAMMAD, F. V. Two new antioxidant bergenin derivatives from the stem of *Rivea hypocrateriformis*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 722-725, 2011.

ZHANG, J.; HOU, X.; AHMAD, H.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; WANG, T. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. **Food Chemistry**, v. 145, n. 0, p. 57-65, 2014.

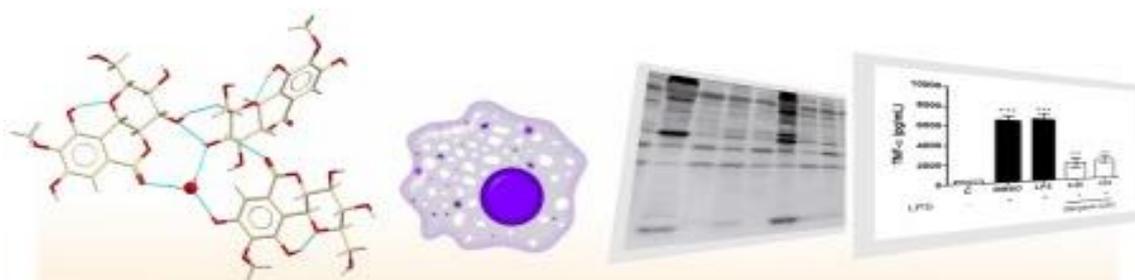
ZHANG, J.; NISHIMOTO, Y.; TOKUDA, H.; SUZUKI, N.; YASUKAWA, K.; KITDAMRONGTHAM, W.; AKAZAWA, H.; MANOSROI, A.; MANOSROI, J.; AKIHISA, T. Cancer Chemopreventive Effect of Bergenin from *Peltophorum pterocarpum* Wood. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 10, p. 1866-1875, 2013.

# CAPÍTULO 02

**Bergenina isolada de *Peltophorum dubium* diminui a resposta inflamatória em macrófagos peritoneais de murinos ativados por LPS pela via de sinalização Jak-STAT**

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Catalina Alarcón de la Lastra, Maria Ángeles Rosillo, María Luisa Castejon Martínez, Isabel Villegas, Jand Venes Rolim Medeiros, Marina Sánchez-Hidalgo

**Artigo submetido na revista *International immunopharmacology*  
Fator de Impacto: 2.956  
Qualis-Capes: B1 para Biotecnologia**



**Bergenina isolada de *Peltophorum dubium* diminui a resposta inflamatória em macrófagos peritoneais de murinos ativados por LPS pela via de sinalização Jak-STAT**

**RESUMO**

A bergenina é um importante componente ativo do gênero *Peltophorum* e possui diversas propriedades farmacológicas. A imunidade natural ou inata é o primeiro sistema de proteção do corpo contra lesões ou patógenos e os macrófagos são os principais componentes deste sistema e estão intimamente relacionados às células fagocíticas que desempenham um papel fundamental ao longo da inflamação e sua resolução, produzem citocinas e quimiocinas que sinalizam e atraem outras células para atuar na resolução do processo inflamatório. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da bergenina na resposta inflamatória de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e determinar o mecanismo de ação pelo qual essa molécula age. Foi analisado a produção de nitrito pelo método de Griess, além disso, foram determinados por Western blot, a expressão da enzima iNOS, a ativação das proteínas da família MAPK, a fosforilação de STAT3 e a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , a produção de citocinas pró-inflamatórias foi avaliada por ELISA. Os resultados revelaram que a bergenina foi capaz de reduzir a expressão de iNOS e Nitrito. Da mesma forma, a bergenina reduziu a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 em macrófagos peritoneais murinos tratados com LPS, a bergenina diminuiu a fosforilação de STAT3 de forma significativa e não exibiu propriedades anti-inflamatórias pelas vias de sinalização MAPK e NF- $\kappa$ B. O estudo fornece evidências de que a bergenina desempenha um papel importante como anti-inflamatório e pode ser um complemento atraente no tratamento de doenças inflamatórias diminuindo o processo inflamatório pela via Jak-STAT.

**Palavras-chave:** Bergenina. Macrófagos. LPS. Jak-STAT. MAPKs. NF- $\kappa$ B

## 1. Introdução

A imunidade natural ou inata é o primeiro sistema de proteção do corpo contra lesões ou patógenos (SPALLANZANI et al., 2015). Os macrófagos são os principais componentes deste sistema, estas células estão intimamente ligadas a função fagocitária e desempenham um papel fundamental ao longo do processo inflamatório. Elas produzem citocinas e quimiocinas que sinalizam e atraem outras células para atuar na resolução do processo inflamatório (YANG et al., 2016; SOEHNLEIN et al., 2010).

Os macrófagos quando são expostos ao lipopolisacarídeo bacteriano (LPS), tem o seu equilíbrio intracelular modificado, esse lipopolisacarídeo causa elevado nível de estresse oxidativo, dessa forma o macrófago começa a produzir mediadores pró-inflamatórios e a liberá-los no meio extracelular, tais como espécies reativas de oxigênio (EROS), as prostaglandinas cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (YAN et al., 2016; AKIYAMA et al., 2000), esses mediadores amplificam a resposta inflamatória o que causa mais danos celulares, por tanto, estão fortemente associados a importantes doenças relacionadas à inflamação (BULUA et al., 2011). Dessa forma, um forte alvo terapêutico para reduzir os processos inflamatórios patológicos deve inibir adequadamente os mediadores pró-inflamatórios (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016; CÁRDENO et al., 2013).

Nos últimos anos os pesquisadores vêm conduzindo pesquisas de novos agentes anti-inflamatórios a partir de produtos naturais (ZAMAN et al., 2015; CHA et al., 2017). A bergenina é um importante constituinte ativo das plantas do gênero *Peltophorum* e tem uma gama de propriedades farmacológicas já descritas como antibacteriano (SILVA et al., 2015), anti-inflamatório (RONG-HUA et al., 2016), antinarcótico (YUN et al., 2015), antilíticas (AGGARWAL et al., 2015), antiartrítico (JAIN et al., 2014), antimalárico (KHAN et al., 2016), antitumoral (ZHANG et al., 2013), antidiabético (KUMAR et al., 2012) e hepatoprotetor (LIM et al., 2001), também possui potente atividade antiartrítica modulando Th1 / Th2 (NAZIR et al., 2007) que geram citocinas e ativam a produção e migração de células inflamatórias (ZHANG et al., 2016).

Em um estudo recente descrito por Gao e colaboradores (2015) mostra que a bergenina é um potente inibidor de mediadores pró-inflamatórios na mastite, porém

o exato mecanismo molecular anti-inflamatório desta substância ainda não está completamente esclarecido.

Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito da bergenina na resposta inflamatória em macrófagos peritoneais de camundongos estimulados por LPS e descrever o mecanismo de ação dessa molécula.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Obtenção e caracterização química da bergenina*

As cascas das raízes de *P. dubium* Taub foram coletadas no *Campus Ondina* da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil. Uma amostra foi depositada no herbário Alexandre Leal da Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob o número de catalogação 69237. A extração, isolamento e caracterização foi descrita por Oliveira e colaboradores (2017). Em resumo, as cascas das raízes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. foram secas e trituradas e, em seguida, submetidas à maceração em MeOH por 48h. Posteriormente, o extrato bruto foi submetido à partição com diclorometano, onde observou-se a formação de precipitado que foi separado por filtração.

O material precipitado foi purificado em cromatografia de coluna utilizando sílica gel 60, eluída com os solventes CHCl<sub>3</sub>/MeOH na proporção (9:1), sendo então obtido um sólido cristalino que foi identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) e <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD), depois disso o material sólido cristalino foi submetido a técnicas de difração de raios X, infravermelho por transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial.

### *2.2. Animais*

Foram usados camundongos *Swiss* machos (Harlan Interfauna Ibérica<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha) pesando de 20 a 30 g. Os animais foram colocados em gaiolas e mantidos em condições constantes de temperatura (20-25 °C) e umidade (40 - 60%) com ciclo de claro/escuro de 12 h, alimentação padrão para roedores (Panlab<sup>®</sup>, Sevilha, Espanha) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Todos os cuidados com animais e procedimentos experimentais foram realizados seguindo os

protocolos aprovados Comitê de Ética Animal da Universidade de Sevilha, e todas as experiências foram de acordo com as recomendações da União Europeia sobre experimentação animal (Diretório do Conselho Europeu 2010/630 / UE).

### 2.3. Preparo das soluções

Foi preparado uma solução de reserve com bergenina a uma concentração de 50 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha) e feito diluições até as concentrações desejadas no meio de cultura. As concentrações finais de DMSO foram  $\leq 1\%$  descartando a possibilidade de influencias do DMSO na resposta celular.

### 2.4. Isolamento e cultura dos macrófagos peritoneais de murinos

Foi administrado via intraperitoneal (i.p.) 1 mL de meio tioglicolato estéril (10% p/v) (Scharlau<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha) em 10 camundongos. Após 4 dias, o exsudato peritoneal com as células foi colhido por lavagem da cavidade peritoneal com PBS estéril gelado (APARICIO-SOTO et al., 2014). O material coletado foi submetido a centrifugação e após isso, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (PAA<sup>®</sup>, Pasching, Áustria) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (PAA<sup>®</sup>, Pasching, Áustria), L-glutamina (2 mM), glicose (4,5 g/L) e tampão HEPES (10 mM), 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (PAA<sup>®</sup>, Pasching, Áustria) e, em seguida, semeados em placas de cultura ( $1 \times 10^6$  células/mL) durante 2 h a 37 °C numa atmosfera humidificada com CO<sub>2</sub> a 5%. Após 2 h, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS e adicionou-se um novo meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB. Trinta minutos depois, os macrófagos peritoneais murinos ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram tratados com LPS 5 µg/mL de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, EUA) na presença ou ausência de bergenina em diferentes concentrações por 18 h.

### 2.5. Viabilidade celular

Os macrófagos foram semeados em placas de 96 poços ( $1 \times 10^6$  células por poço) depois foram incubadas na presença ou ausência de bergenina em diferentes

concentrações (3,15 a 200  $\mu\text{M}$ ) durante 18 h. No final do tempo de exposição, o efeito da bergenia no crescimento / viabilidade celular foi analisado pelo ensaio de Sulforodamina B (SRB) (CARDENO et al., 2014). Após o tempo de incubação, as culturas de células foram fixadas *in situ* por adição de 50  $\mu\text{L}$  ácido tricloroacético 50% (p/v) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, EUA) e incubadas por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas cinco vezes com água deionizada. Foram adicionados a cada poço 50  $\mu\text{L}$  de solução SRB (0,4% p/v) em ácido acético a 1% (Panreac<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha) e incubados durante 30 min à temperatura ambiente. As placas contendo solução de SRB foram lavadas cinco vezes com solução de ácido acético a 1%. Em seguida, as placas foram secas ao ar e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  por poço de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de Tris base pH 10,5 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, EUA) e a absorvância de cada poço foi lida em um leitor ELISA a 510 nm (BioTek<sup>®</sup>, Bad Friedrichshall, Alemanha). Finalmente, a sobrevida celular foi medida como a porcentagem de absorvância em comparação com as células do controle (células não tratadas).

## 2.6. Avaliação da produção de nitrito

Os macrófagos foram semeados em placas de 24 poços e foram tratados (grupos testes) ou não (grupo controle) com diferentes concentrações de bergenia (3,15 a 200  $\mu\text{M}$ ) e incubados por 30 minutos a 35 °C, depois foram estimuladas com LPS por 18h. Os sobrenadantes das culturas (100  $\mu\text{L}$ ) foram transferidos para uma placa de ensaio de 96 poços misturada com 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, EUA) e incubada por 15 min à temperatura ambiente. A quantidade de nitrito, como índice de geração de óxido nítrico (NO), foi determinada e obtida por extrapolação a partir de uma curva padrão com nitrito de sódio. A absorvância a 540 nm foi medida por um leitor ELISA (BioTek<sup>®</sup>, Bad Friedrichshall, Alemanha). Os resultados foram expressos como a porcentagem de produção de nitrito em comparação com células de controle de DMSO-LPS (células estimuladas com LPS e não tratadas com bergenia).

## 2.7. Isolamento e detecção por imunotransferencia das proteínas citoplasmáticas pró-inflamatórias

As células ( $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) dos tratamentos com bergeninas e as células dos controles foram raspadas e recolhidas com solução inibidora de proteases e fosfatases em PBS como descrito por Sánchez-Fidalgo et al. (2013). A concentração de proteína foi determinada para cada amostra usando um reagente de teste de proteína (Bio-Rad<sup>®</sup>, München, Alemanha) de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e como padrão foi usado  $\gamma$ -globulina. Alíquotas contendo quantidades iguais de proteína (30  $\mu\text{g}$ ) foram submetidas a técnica de Western blot para separação das proteínas por eletrofose em gel de poliacrilamida (10%).

No passo seguinte, as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos primários específicos: rabbit anti-iNOS (160862; Cayman<sup>®</sup>, Ann Arbor, MI, USA, 1:1000), mouse anti-pSTAT3, mouse anti-pJNK, rabbit-JNK, mouse anti-pp38, rabbit p38 (sc-8059, sc-6254, sc474; sc-7973 e sc-535 respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1:1000), rabbit anti-IkBa (1:1000), rabbit anti-pERK e mouse anti-ERK (1:2500) (4812, 4370, 9107 respectivamente; Cell Signalling<sup>®</sup>, Danvers, MA, USA) por uma noite a 4 °C. As membranas foram lavadas e incubadas com solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário específico anti-rabbit (Cayman<sup>®</sup>, 1:5000) ou anti-mouse (Dako<sup>®</sup>, Atlanta, GA, EUA; 1:2000) por 2h à temperatura ambiente. Para normalizar o carregamento das proteínas no sistema, foi analisado a expressão de  $\beta$ -actina com um anticorpo anti- $\beta$ -actina (A5316; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, EUA).

A imunodeteção foi realizada utilizando um kit de detecção de luz de quimioluminescência (Thermo Scientific<sup>™</sup>, Rockford, IL, EUA). As bandas de proteínas nas membranas foram capturadas usando o sistema de captura Amersham Imaging 600 da GE<sup>®</sup> Healthcare. Os sinais foram analisados e quantificados por um processador de imagem em Java (Image J, Softonic<sup>®</sup> Barcelona, Espanha) e expressos em relação às células controles tratadas com DMSO-LPS.

## 2.8. Avaliação dos níveis de citocinas

Para determinar as concentrações de citocinas foram utilizados kits comerciais (ELISA) de TNF- $\alpha$ , IL-6 (Diaclone<sup>®</sup>, Besancon Cedex, França), IL-1 $\beta$  (R & D Systems<sup>®</sup>, Abingdon, Reino Unido) e IL-17A (PeproTech<sup>®</sup>, Rocky Hill, EUA)

apropriados para camundongos. As análises foram realizadas utilizando o sobrenadante das cultura de macrófagos. A intensidade de cor de cada amostra foi lida a 450 nm em um leitor ELISA (BioTek®, Bad Friedrichshall, Alemanha) e foram expressas em pg/mL

### 2.9. Análises estatísticas

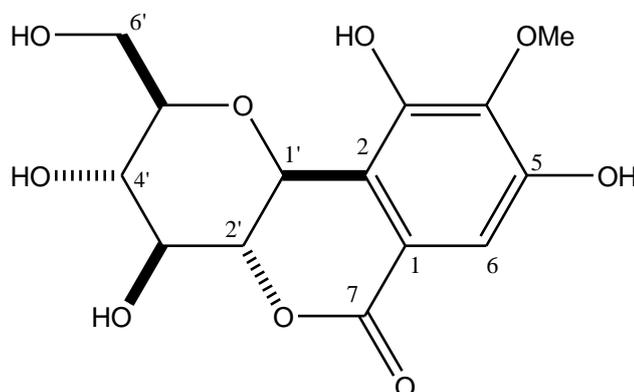
Todos os dados numéricos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A Análise estatística foi realizado utilizando *one way* ANOVA, seguido pelo teste *Student-Newman-Keuls* como *post hoc*. Os resultados foram considerados estatisticamente significante quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism*® versão 6.02 (San Diego, CA, USA).

## 3. Resultados

### 3.1. Isolamento e caracterização da bergenina extraída de *Peltophorum dubium*

Oliveira et al. (2017) descreve o isolamento de bergenina (**Figura 1**) a partir de raízes de *P. dubium* com excelente rendimento ( $R = 5,10\%$  / extrato bruto). As técnicas de RMN, FT-IR e DSC foram empregadas para caracterizar sua estrutura e estabilidade. Concluimos que *P. dubium* é uma excelente fonte natural de bergenina, um derivado de ácido gálico.

**Figura 1 - Estrutura química da bergenina isolada de *P. dubium***

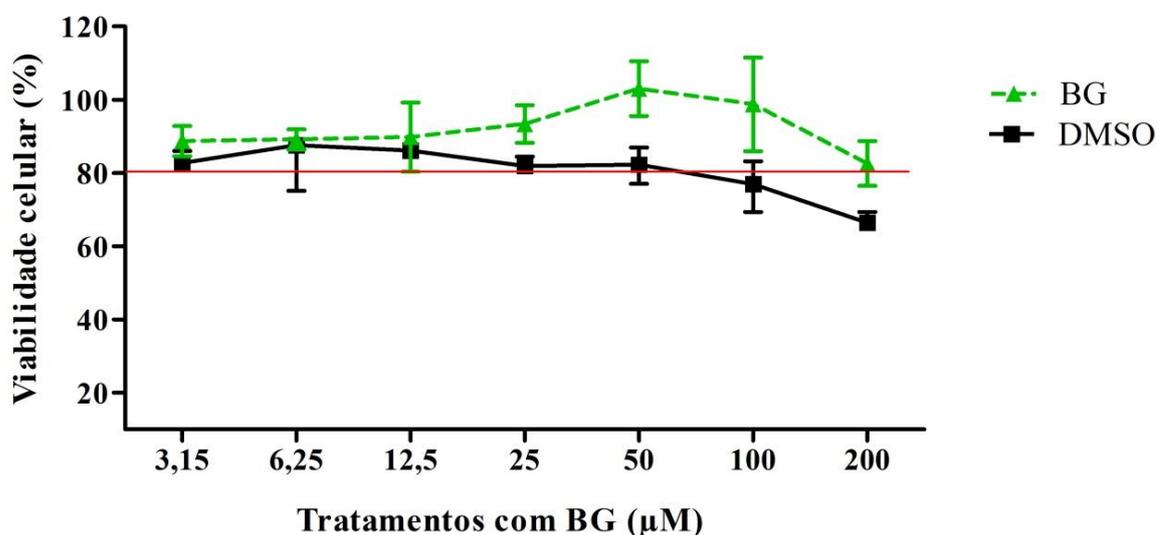


Fonte: Autoria própria (2018).

### 3.2. Efeitos da bergenia na viabilidade celular de macrófagos peritoneais de murinos estimulados por LPS

Para avaliar o efeito anti-inflamatório da bergenia (BG), determinamos seu efeito sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais de murinos por meio do teste SRB. Após 18 h, nossos dados demonstraram que a bergenia não interfere na viabilidade das células submetidas aos tratamentos com bergenia nas concentrações de 3,15 a 200  $\mu\text{M}$  (**Figura 2**).

**Figura 2 - Viabilidade celular em macrófagos peritoneais por SRB após o tratamento com bergenia e DMSO**

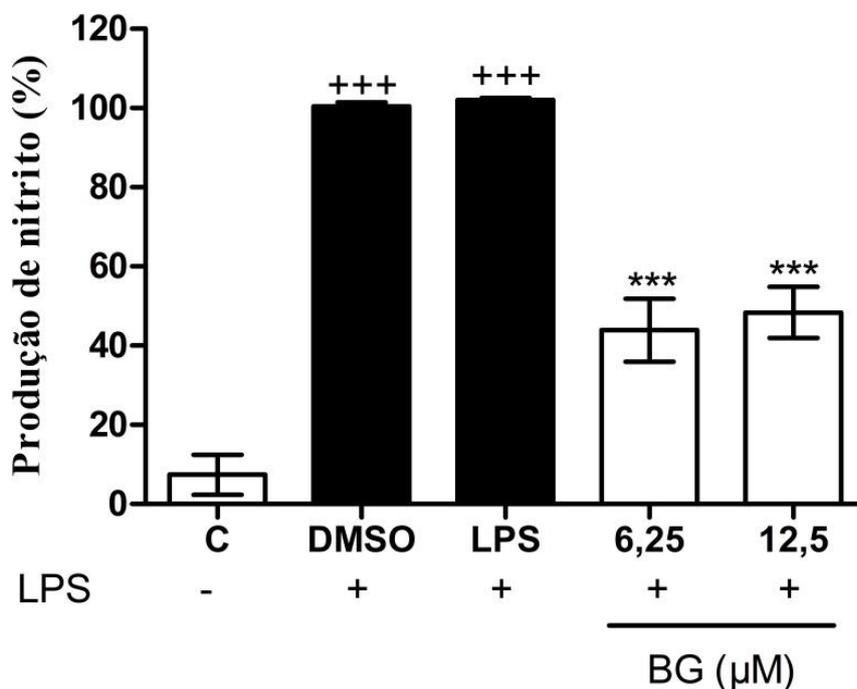


A sobrevivência celular foi medida como a porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo DMSO-LPS (ANOVA e Student Neuman-Keuls).

### 3.3. Efeitos da bergenia sobre a produção de nitrito e expressão de iNOS em macrófagos peritoneais de murinos estimulados por LPS

Pode ser observado uma elevada quantidade de nitrito proveniente da expressão da enzima iNOS em resposta ao LPS (SEGHATOLESLAM et al., 2016). Assim, analisamos se a bergenia inibe a liberação de NO pelos macrófagos estimulados por LPS. Conforme mostrado na **Figura 3**, a bergenia nas concentrações de 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$  reduziu a quantidade de nitrito produzido em 56,3 e 51,8% respectivamente quando comparado ao controle DMSO-LPS ( $p < 0,001$ ).

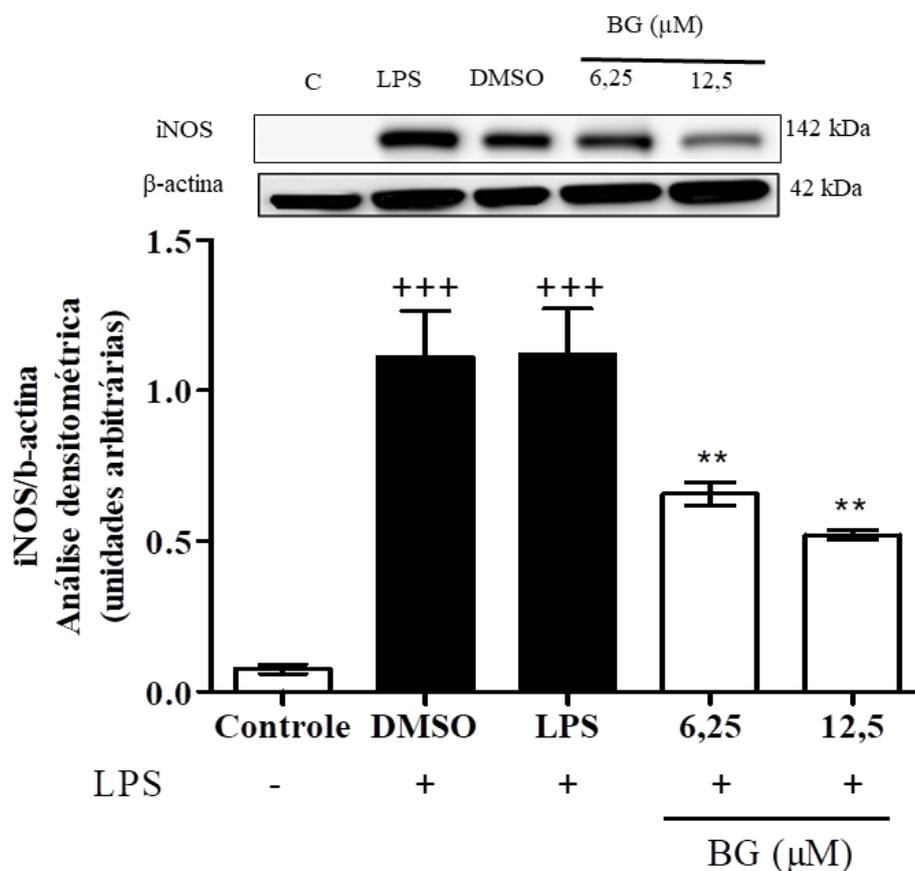
**Figura 3 - Efeitos da bergenia na produção de nitrito**



Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 3). +++p < ; vs. controle (PBS); \*\*\* p < 0.001 vs. DMSO-LPS.

Essa diminuição na produção de nitrito sugere uma possível regulação da atividade da enzima iNOS. Assim, esta hipótese foi avaliada pela medida dos níveis de iNOS por *Western blot*. A análise de imunotransferência demonstrou que a diminuição nos níveis de nitrito foi paralela à significativa diminuição nos níveis da proteína iNOS (**Figura 4**) que teve sua produção reduzida em 41,4% no grupo tratado com bergenia na concentração de 6,25  $\mu$ M e 53,1% no grupo tratado com com a concentração de 12,5  $\mu$ M em comparação com o controle DMSO-LPS (p < 0,01).

**Figura 4 - Análise densitométrica de iNOS**

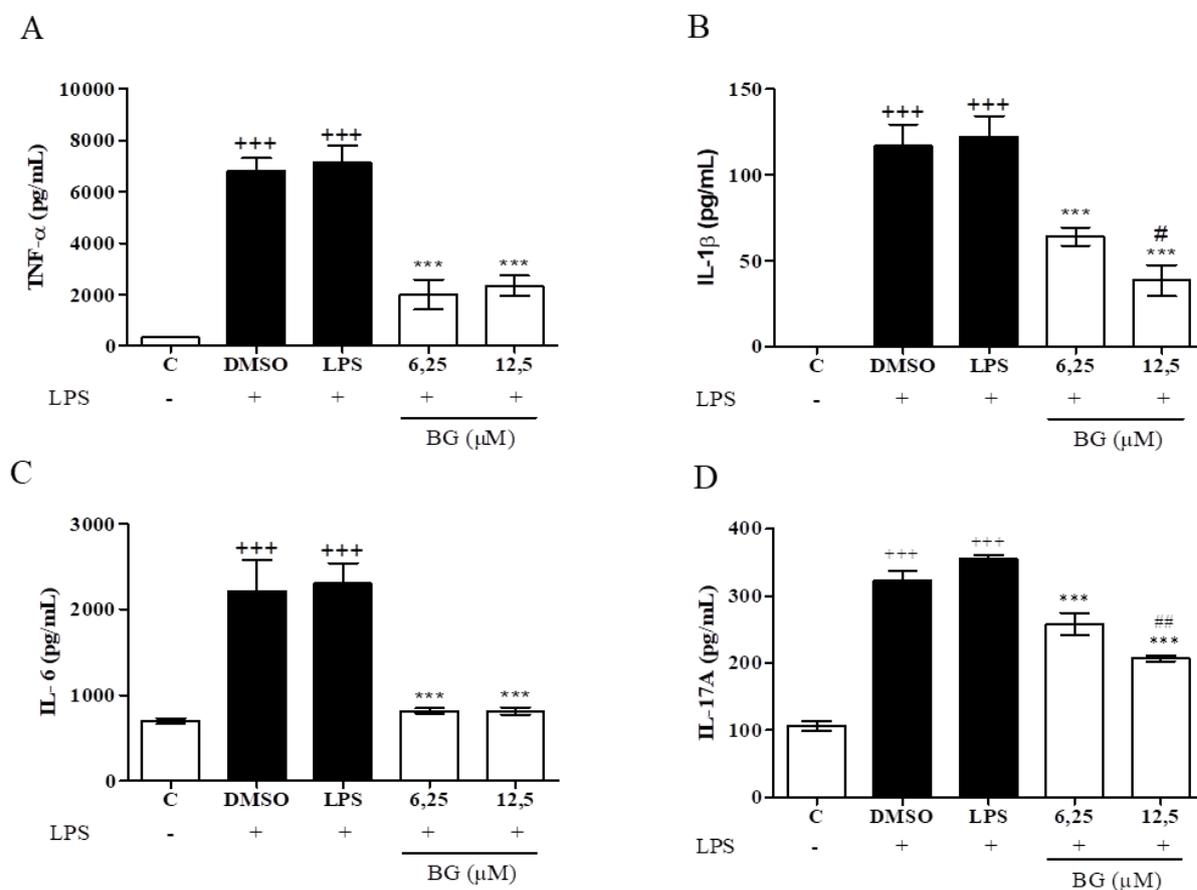


Os plots representam a intensidade das bandas mensuradas pelo programa Image J.  $\beta$ -Actina foi usada como controle normalizador. As colunas representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 3$ ).  $+++p < 0.001$ ;  $**p < 0.01$  vs. controle (PBS);  $**p < 0,01$  vs. DMSO-LPS (ANOVA e Student Neuman-Keuls).

#### 3.4. Efeitos da bergenina na citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS

A técnica de ELISA foi realizada para confirmar se a bergenina nas concentrações de 6,25 e 12,5  $\mu$ M inibe os mediadores pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17A. Como resultado, a produção de TNF- $\alpha$  foi reduzida em 70,6 e 65,6% respectivamente (Figura 5A), os níveis de IL-1 $\beta$  foram reduzidos em 45 e 67% respectivamente (Figura 5B), os níveis de IL-6 apresentaram diminuição de 63% nas duas concentrações testadas (Figura 5C). Os níveis de IL-17A diminuíram 20 e 36% respectivamente (Figura 5D) em comparação com o grupo controle DMSO-LPS. ( $p < 0,001$  vs. DMSO-LPS).

**Figura 5 - Diminuição dos níveis de citocinas após o tratamento com bergenia em macrófagos estimulados por LPS**



(A) Níveis de Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). (B) Níveis de IL-1 $\beta$ . (C) Níveis de IL-6. (D) Níveis de IL-17A. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 3). <sup>+++</sup>p < 0.001 vs. controle (PBS), <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001 vs. LPS-DMSO, # p < 0.05 vs. a concentração de 6,25.

### 3.5. Efeitos da bergenia sobre as vias de sinalização pró-inflamatórias NF- $\kappa$ B, MAPK e STAT3 em macrófagos peritoneais de murinos estimulados por LPS

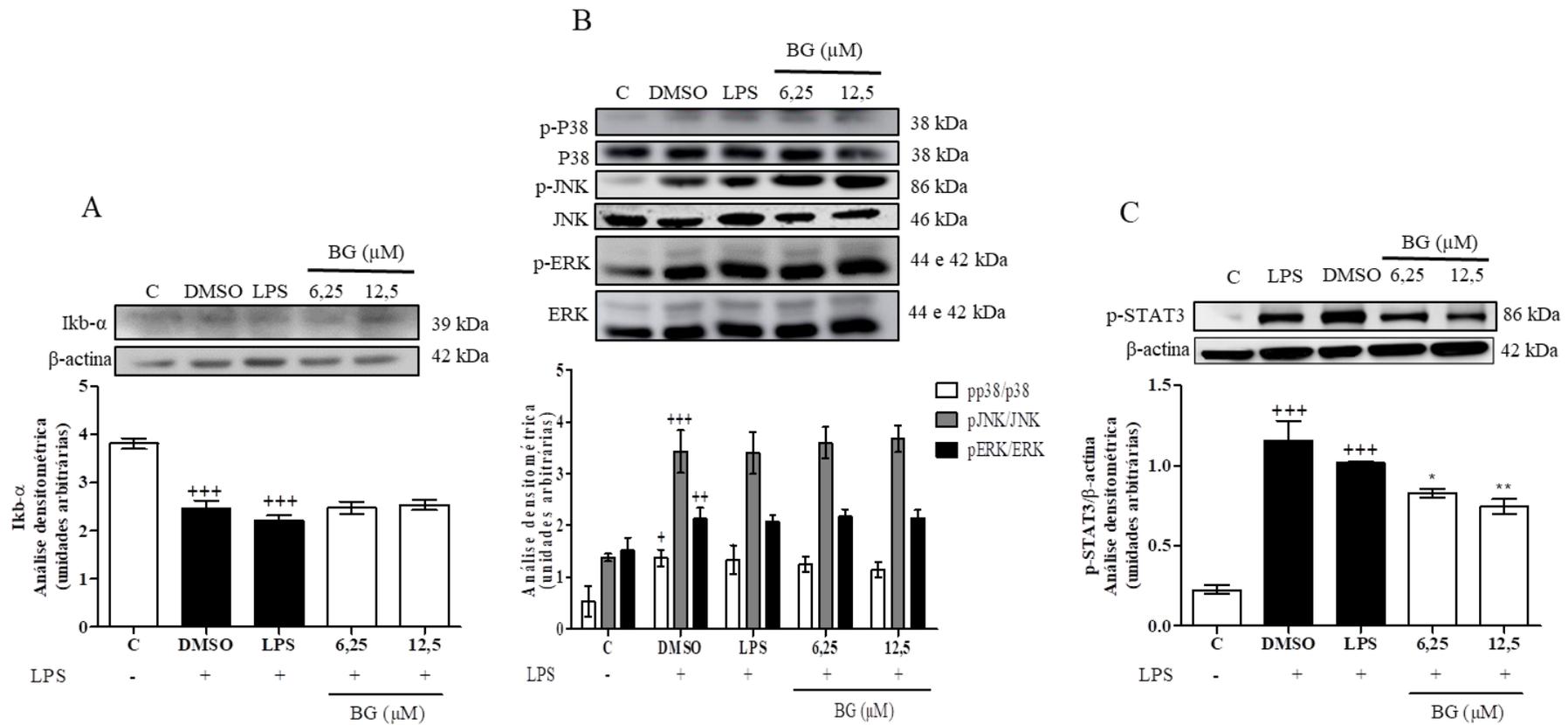
Uma vez que a via de sinalização NF- $\kappa$ B é controlada pelo nível de I $\kappa$ B (MATHES, 2008), investigamos a liberação de I $\kappa$ B- $\alpha$  em macrófagos peritoneais murinos. Conforme mostrado na **Figura 5A**, a bergenia nas concentrações de 6,25 e 12,5  $\mu$ M não foi capaz de inibir a liberação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , o que consiste numa regulação ascendente da atividade de NF- $\kappa$ B. O mesmo efeito pode ser observado no grupo controle DMSO-LPS, a estimulação LPS produziu uma degradação de I $\kappa$ B, o que é consistente com uma regulação ascendente da atividade de ligação NF- $\kappa$ B.

A regulação da sinalização das proteínas da família MAPK (ERK, JNK e p38), também foi investigada. Conforme mostrado na **Figura 5B**, a fosforilação induzida

por LPS de MAPKs não foi alterada pela bergenia nas concentrações de 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$  sugerindo que a bergenia não exerce atividade pela via de sinalização MAPKs.

Também foi analisado a fosforilação de STAT3 nos macrófagos peritoneais de murinos estimulados por LPS após o tratamento com bergenia. O LPS induz a fosforilação de STAT3 nestas células, por sua vez, a bergenia nas concentrações de 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$  foi capaz de reduzir significativamente os níveis dessa fosforilação em 28,7 e 35,6% respectivamente em relação ao controle DMSO-LPS ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  vs. controle DMSO-LPS) (**Figura. 5C**). Este resultado sugere que a regulação diferencial das citocinas pró-inflamatórias pela bergenia é devido à capacidade da bergenia em inibir a fosforilação de STAT3.

**Figura 6 - Efeito da bergenina na expressão proteica de (A) I $\kappa$ B- $\alpha$ ; (B) MAPKs (ERK, JNK and p38) e (C) STAT3 em macrófagos estimulados por LPS**



(A) I $\kappa$ B- $\alpha$ ; (B) MAPKs (ERK, JNK and p38) e (C) STAT3. Análise de densitometria da expressão de I $\kappa$ B- $\alpha$ , ERK, JNK and STAT3. Os plots representam a intensidade das bandas mensuradas pelo programa Image J.  $\beta$ -Actina foi usada como controle normalizador. As colunas representam a média  $\pm$  EPM (n = 3). <sup>+++</sup>p < 0.001; <sup>++</sup>p < 0.01 e <sup>+</sup>p < 0.05 vs. controle (PBS); <sup>\*\*</sup>p < 0,01 e <sup>\*</sup>p < 0,05 vs. DMSO-LPS.

#### 4. Discussão

A inflamação é uma reação estereotipada, homeostática e geralmente benéfica do corpo a uma lesão (KIRWAN et al., 2017). Em excesso, a inflamação pode destruir tecidos e causar danos graves ao organismo (ARGOLLO et al., 2017), a partir daí surge a necessidade de se utilizar um fármaco anti-inflamatório (RATCHFORD et al., 2017).

A grande maioria das opções terapêuticas anti-inflamatórias são esteroides como os glicocorticoides, porém possuem graves efeitos adversos que impossibilitam o seu uso contínuo (NICHOLSON et al., 2017). Existem também outros fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) como os inibidores seletivos da COX-2 que podem elevar o grau de doenças cardiovasculares (BATLOUNI, 2010). Devido a essas preocupações, plantas medicinais e seus constituintes ativos estão recebendo grande atenção, uma vez que existem evidências quanto ao uso tradicional como anti-inflamatórios que apresentam efeitos colaterais relativamente menores (CASTEJON et al., 2017; PRUDENTE et al., 2017; BORGES et al., 2017). Muitas moléculas já foram identificadas como candidatas a anti-inflamatórios e estão sob investigação para uso clínico (STEBBINGS et al., 2016; HUSEINI et al., 2016; PORTINCASA et al., 2016).

No presente estudo, elucidamos pela primeira vez os efeitos anti-inflamatórios e os mecanismos subjacentes da bergenina obtida de *P. dubium*, em macrófagos peritoneais de murinos ativados por LPS. Os macrófagos ativados por LPS sofrem perturbações que desequilibram o estado de oxirredução intracelular, o que leva ao estresse oxidativo (REILING et al., 2017). Após a estimulação dos macrófagos o gene iNOS induz a produção de grande quantidade de NO que age como um mensageiro intracelular e modula a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) como nitrito e peróxido de hidrogênio o que resulta em uma resposta inflamatória (ESPIRITO-SANTO et al., 2017) também são capazes de provocar desordens patológicas que envolvem a oxidação de proteínas, lipídeos e DNA (YOON et al., 2017).

Dessa forma, os moduladores da produção de EROS e as vias de sinalização ativada por EROS, podem ser potenciais alvos para intervenção anti-inflamatórias especialmente em macrófagos (RASHID et al., 2017). Como visto na **Figura 3**, a bergenina exerceu potente capacidade antioxidante inibindo a produção de nitritos

de forma significativa nos macrófagos ativados por LPS e da mesma forma, a bergenina reduziu a expressão de iNOS (**Figura 4**) de maneira dose dependente. Em estudo recente de nosso grupo (OLIVEIRA, et al., 2017) a bergenina também apresentou significativo potencial antioxidante em mecanismos *in vitro* contra íons nitrito. Vários componentes de plantas como acetato de hidroxitirosil e 3,4-dihidroxifenilglicol diminuem a expressão de iNOS em macrófagos peritoneais ativados por LPS confirmando o efeito regulador de produtos naturais sobre a produção de NO (APARICIO-SOTO et al., 2015).

De acordo com a literatura, a ativação de NF- $\kappa$ B e MAPKs é iniciada quando partículas de LPS se ligam aos receptores do tipo Toll (TLRs) (ALLETTE et al., 2017). As vias NF- $\kappa$ B e MAPKs são eixos críticos essenciais para induzir e propagar uma resposta inflamatória em macrófagos ativados por LPS (PARK et al., 2016). A atividade da NF- $\kappa$ B são reguladas por quinases como I $\kappa$ A e I $\kappa$ B, as MAPKs incluem cinases extracelulares (ERKs), as c-Jun N-terminais (JNKs) e a p38 (ILIEV et al., 2013). O aumento da atividade dessas proteínas envolvidas na regulação e síntese de mediadores inflamatórios as tornam potenciais alvos para atuação de anti-inflamatórios. Nosso estudo mostrou (**Figura 6A e B**) que a via NF- $\kappa$ B não foi sensível à bergenina, não foi possível observar mudanças significativas nos níveis expressos de I $\kappa$ B- $\alpha$ , da mesma forma, o tratamento com bergenina não alterou a expressão das proteínas envolvidas na via MAPKs quando comparadas ao controle DMSO-LPS.

Estudos anteriores mostram que vários componentes de plantas como curcumina, resveratrol e quercetina inibem a ERK e aumentam a produção de TNF- $\alpha$  através do fator de transcrição AP-1 pela via MAPKs (WANG et al., 2012; BURK et al., 2009; LIN et al., 2008; MIN et al., 2010). Dessa forma, como demonstrado na **Figura 5A** o tratamento com LPS induziu a produção de TNF- $\alpha$  nos macrófagos enquanto que o tratamento com bergenina reduziu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  nas células apesar da não modulação das proteínas da via MAPKs. Ainda não está claro a razão pela qual houve a inibição da produção de TNF- $\alpha$  sem que houvesse alterações nas proteínas da via MAPKs.

Conforme mostrado na **Figura 6C** o efeito da bergenina na regulação de STAT3 foi notavelmente diferente, a bergenina diminuiu a fosforilação de STAT3 nos macrófagos ativados por LPS, sugerindo que a via STAT3 é mais sensível à bergenina do que a MAPKs. A expressão das citocinas pró-inflamatórias IL1- $\beta$ , IL-6

e IL-17A foram aumentadas pela ação do LPS nos macrófagos peritoneais. Um estudo prévio, mostrou que a bergenina inibe mediadores inflamatórios (SHAH et al., 2012), no presente estudo como mostrado na **Figura 5B - D**, a bergenina reduziu significativamente a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 nas doses testadas. Estas citocinas estão envolvidas na defesa do organismo contra doenças infecciosas e inflamatórias. Resultados parecidos são observados no estudo de Gao e colaboradores (2015), onde a bergenina foi capaz de reduzir a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17 em células do tecido mamário sem influenciar as vias NF- $\kappa$ B e MAPKs.

De forma coletiva, os achados do presente estudo sugerem que a bergenina diminuem seletivamente a produção de vários mediadores inflamatórios, agindo mais sensivelmente pela via STAT3 em macrófagos peritoneais de murinos ativados por LPS.

## 5. Conclusão

Em conclusão, nosso estudo mostrou que a bergenina reduziu a expressão da proteína pro-inflamatória iNOS, bem como reduziu a produção de NO, diminuiu os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL17A e mostrou atuar com mais sensibilidade pela via STAT-3. Portanto, a bergenina tem potencial para ser aplicado em novas terapias anti-inflamatórias.

## Referencias

AGGARWAL, D.; GAUTAM, D.; SHARMA, M.; SINGLA, S. K. Bergenin attenuates renal injury by reversing mitochondrial dysfunction in ethylene glycol induced hyperoxaluric rat model. **European journal of pharmacology**, v. 791, p. 611-621, 2016.

AKIYAMA, Y.; WATANABE, M.; MARUYAMA, K.; RUSCETTI, F. W.; WILTROUT, R. H.; YAMAGUCHI, K. Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. **Gene therapy**, v. 7, n. 24, p. 2113, 2000.

ALLETTE, Y. M.; KIM, Y.; RANDOLPH, A. L.; SMITH, J. A.; RIPSCH, M. S.; WHITE, F. A. Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active

metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3741, 2017.

AMBRIZ-PÉREZ, D. L.; BANG, W. Y.; NAIR, V.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HEREDIA, J. B. Protective role of flavonoids and lipophilic compounds from *Jatropha platyphylla* on the suppression of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 9, p. 1899-1909, 2016.

APARICIO-SOTO, M.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; CÁRDENO, A.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; SANCHEZ-HIDALGO, M. Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 1, p. 134-144, 2014.

APARICIO-SOTO, M.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; GONZÁLEZ-BENJUMEA, A.; MAYA, I.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.G.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Naturally occurring hydroxytyrosol derivatives: hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol modulate inflammatory response in murine peritoneal macrophages. Potential utility as new dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 3, p. 836-846, 2015.

ARGOLLO, M. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. **Journal of autoimmunity**, 2017.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BORGES, R. S.; LIMA, E. S.; KEITA, H.; FERREIRA, I. M.; FERNANDES, C. P.; CRUZ, R. A. S.; FERREIRA, J. V. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, p. 1-13, 2017.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BULUA, A. C.; SIMON, A.; MADDIPATI, R.; PELLETIER, M.; PARK, H.; KIM, K. Y.; SIEGEL, R. M. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **Journal of Experimental Medicine**, p. jem. 20102049, 2011.

BURK, D. R. Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 397-405, 2009.

CARDENO, A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; APARICIO-SOTO, M.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Extra virgin olive oil polyphenolic extracts downregulate inflammatory responses in LPS-activated murine peritoneal

macrophages suppressing NF $\kappa$ B and MAPK signalling pathways. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1270-1277, 2014.

CÁRDENO, A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; CORTES-DELGADO, A.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C. Mechanisms involved in the antiproliferative and proapoptotic effects of unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil on HT-29 cancer cells. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 6, p. 908-918, 2013.

CASTEJÓN, M. L.; ROSILLO, M. Á.; MONTOYA, T.; GONZÁLEZ-BENJUMEA, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. M.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Oleuropein down-regulated IL-1 $\beta$ -induced inflammation and oxidative stress in human synovial fibroblast cell line SW982. **Food & function**, v. 8, n. 5, p. 1890-1898, 2017.

CHA, J. M.; SUH, W. S.; LEE, T. H.; SUBEDI, L.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Phenolic Glycosides from *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik and Their Anti-Inflammatory Activity. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 1023, 2017.

ESPIRITO-SANTO, R. F.; MEIRA, C. S.; COSTA, R. D. S.; SOUZA FILHO, O. P.; EVANGELISTA, A. F.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, G. M.; VELOZO, E. D. S.; VILLARREAL, C. F.; PEREIRA SOARES, M. B. The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. **Plos One**, v. 12, n. 6, p. e0179174, 2017.

GAO, X. J.; GUO, M. Y.; ZHANG, Z. C.; WANG, T. C.; CAO, Y. G.; ZHANG, N. S. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1142-1150, 2015.

HUSEINI, H. Effectiveness of topical *Nigella sativa* Seed Oil in the treatment of cyclic Mastalgia: a randomized, triple-blind, active, and placebo-controlled clinical trial. **Planta medica**, v. 82, n. 04, p. 285-288, 2016.

ILIEV, D. CpG-and LPS-activated MAPK signaling in *in vitro* cultured salmon (*Salmo salar*) mononuclear phagocytes. **Fish & shellfish immunology**, v. 35, n. 4, p. 1079-1085, 2013.

JAIN, S. K.; SINGH, S.; KHAJURIA, A.; GURU, S. K.; JOSHI, P.; MEENA, S.; BHARATE, S. B. Pyrano-isochromanones as IL-6 Inhibitors: Synthesis, *in Vitro* and *in Vivo* Antiarthritic Activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7085-7097, 2014.

KHAN, H.; AMIN, H.; ULLAH, A.; SABA, S.; RAFIQUE, J.; KHAN, K.; BADSHAH, S. L. Antioxidant and Antiplasmodial Activities of Bergenin and 11-O-Galloylbergenin Isolated from *Mallotus philippensis*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

KIRWAN, A. M.; LENIGHAN, Y. M.; O'REILLY, M. E.; MCGILLICUDDY, F. C.; ROCHE, H. M. Nutritional modulation of metabolic inflammation. **Biochemical Society Transactions**, p. BST20160465, 2017.

KUMAR, R.; PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; LALOO, D.; KRISHNAMURTHY, S.; HEMALATHA, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 395-401, 2012.

LIM, H. K.; KIM, H. S.; CHOI, H. S.; CHOI, J.; KIM, S. H.; CHANG, M. J. Effects of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus* against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. **Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 71-75, 2001.

LIN, C. W.; HOU, W. C.; SHEN, S. C.; JUAN, S. H.; KO, C. H.; WANG, L. M.; CHEN, Y. C. Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC $\delta$ /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 9, p. 1807-1815, 2008.

MATHES, E. NF- $\kappa$ B dictates the degradation pathway of I $\kappa$ B $\alpha$ . **The EMBO journal**, v. 27, n. 9, p. 1357-1367, 2008.

MIN, Z. Resveratrol restores lysophosphatidylcholine-induced loss of endothelium-dependent relaxation in rat aorta tissue coinciding with inhibition of extracellular-signal-regulated protein kinase activation. **Phytotherapy research**, v. 24, n. 12, p. 1762-1768, 2010.

NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; AHMAD, S. F.; BANI, S.; QAZI, G. N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis - A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 401-405, 2007.

NICHOLSON, B. P.; ATCHISON, E.; IDRIS, A. A.; BAKRI, S. J. Central serous chorioretinopathy and glucocorticoids: an update on evidence for association. **Survey of ophthalmology**, 2017.

OLIVEIRA, G. A.; OLIVEIRA, G.L.S.; NICOLAU, L. A.; MAFUD, A. C.; BATISTA, L. F.; MASCARENHAS, Y. P.; DE SOUSA, L. K.; DAVID, J. M.; PINTO, L. S.; ALVES, C. Q.; MEDEIROS, J. V. Bergenin from *Peltophorum dubium*: Isolation, Characterization, and Antioxidant Activities in Non-Biological Systems and Erythrocytes. **Medicinal Chemistry**, 2017.

PARK, J. S.; PARK, M. Y.; CHO, Y. J.; LEE, J. H.; YOO, C. G.; LEE, C. T.; LEE, S. M. Anti-inflammatory effect of erdosteine in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1573-1581, 2016.

PORTINCASA, P.; BONFRATE, L.; SCRIBANO, M. L.; KOHN, A.; CAPORASO, N.; FESTI, D.; CAMPANALE, M. C.; RIENZO, T.; GUARINO, M.; TADDIA, M.; FOGLI, M. V.; GRIMALDI, M.; GASBARRINI, A. Curcumin and Fennel Essential Oil Improve Symptoms and Quality of Life in Patients with Irritable Bowel Syndrome. **Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases**, v. 25, n. 2, 2016.

PRUDENTE, A. S.; SPONCHIADO, G.; MENDES, D. A.; SOLEY, B. S.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Pre-clinical efficacy assessment of *Malva sylvestris* on chronic skin inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 852-860, 2017.

RASHID, K.; CHOWDHURY, S.; GHOSH, S.; SIL, P.C. Curcumin attenuates oxidative stress induced NFkappaB mediated inflammation and Endoplasmic reticulum dependent apoptosis of splenocytes in diabetes. **Biochemical pharmacology**, 2017.

RATCHFORD, S. M.; LAVIN, K. M.; PERKINS, R. K.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, S. W.; TRAPPE, T. A.. Aspirin as a COX Inhibitor and Anti-inflammatory Drug in Human Skeletal Muscle. **Journal of Applied Physiology**, p. jap. 01119.2016, 2017.

REILING, J.; BRIDLE, K. R.; SCHAAP, F. G.; JASKOWSKI, L.; SANTRAMPURWALA, N.; BRITTON, L. J.; DEJONG, C. H. C. The role of macrophages in the development of biliary injury in a lipopolysaccharide-aggravated hepatic ischaemia-reperfusion model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 2017.

RONG-HUA, P. A. N.; HONG-MEI, H. E.; YUE, D. A. I.; YU-FENG, X. I. A. Comparative pharmacokinetics of bergenin, a main active constituent of *Saxifraga stolonifera* Curt., in normal and hepatic injury rats after oral administration. **Chinese journal of natural medicines**, v. 14, n. 10, p. 776-782, 2016.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; SILVA, D.A.; CÁRDENO, M. S.; APARICIO-SOTO, M.; SALVADOR, M. J.; SAWAYA, A. F.; DE LA LASTRA, C. A. Abarema cochliacarpus reduces LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages regulating ROS-MAPK signal pathway. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 140-147, 2013.

SEGHATOLESLAM, A. Macrophage immune response suppression by recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens, the ESAT-6, CFP-10, and ESAT-6/CFP-10 fusion proteins. **Iranian journal of medical sciences**, v. 41, n. 4, p. 296, 2016.

SHAH, M. R.; ARFAN, M.; AMIN, H.; HUSSAIN, Z.; QADIR, M. I.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, I. U. Synthesis of new bergenin derivatives as potent inhibitors of inflammatory mediators NO and TNF- $\alpha$ . **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 8, p. 2744-2747, 2012.

SILVA, L. R.; TEIXEIRA, R. Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 11, p. 889-897, 2015.

SOEHNLEIN, O.; LENNART, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427-439, 2010.

SPALLANZANI, R. G.; TORRES, N. I.; AVILA, D. E., ZIBLAT, A.; IRAOLAGOITIA, X. L. R.; ROSSI, L. E. ZWIRNER, N. W. Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN- $\gamma$  Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I-Specific Inhibitory Receptors. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 2141-2148, 2015.

STEBBINGS, S.; BEATTIE, E.; MCNAMARA, D.; HUNT, S. A pilot randomized, placebo-controlled clinical trial to investigate the efficacy and safety of an extract of *Artemisia annua*. **Clinical rheumatology**, v. 35, n. 7, p. 1829-1836, 2016.

WANG, J.; DONG, S. ICAM-1 and IL-8 are expressed by DEHP and suppressed by curcumin through ERK and p38 MAPK in human umbilical vein endothelial cells. **Inflammation**, v. 35, n. 3, p. 859-870, 2012.

YAN, B. Z.; YANG, B. S.; LI, H.; ZHANG, Y. F.; PEI, F. H.; ZHU, A. C.; LIU, B. R. The therapeutic effect of CORM-3 on acute liver failure induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 15, n. 1, p. 73-80, 2016.

YANG, D.; CHEN, H.; ZENG, X., XIE, P.; WANG, X., & LIU, C. Macrophage CGI-58 attenuates inflammatory responsiveness via promotion of PPAR $\gamma$  signaling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 696-713, 2016.

YOON, J. J.; JEONG, J. W.; CHOI, E. O.; KIM, M. J.; HWANG-BO, H.; KIM, H. J.; CHOI, Y. H. Protective effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis in HaCaT human skin keratinocytes. **Excli Journal**, v. 16, p. 426, 2017.

YUN, J.; LEE, Y.; YUN, K.; OH, S. Bergenin decreases the morphine-induced physical dependence via antioxidative activity in mice. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 6, p. 1248-1254, 2015.

ZAMAN, A.; KHAN, M. S. S.; AKTER, L.; SYEED, S. H.; AKTER, J.; AL MAMUN, A.; JALIL, M. A. Exploring new pharmacology and toxicological screening and safety evaluation of one widely used formulation of Nidrakar Bati from South Asia region. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 121, 2015.

ZHANG, J.; NISHIMOTO, Y.; TOKUDA, H.; SUZUKI, N.; YASUKAWA, K.; KITDAMRONGTHAM, W.; AKIHISA, T. Cancer chemopreventive effect of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* wood. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 10, p. 1866-1875, 2013.

ZHANG.; SHOUXIN. Apigenin attenuates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 cytokine balance in mice. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 678-686, 2016.

# CAPÍTULO 03

**Efeito preventivo da bergenina contra o desenvolvimento de colite aguda induzida por TNBS em ratos, estudo da inibição de mediadores inflamatórios e a modulação da via de sinalização do inflamassoma NLRP3/ASC**

Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Catalina Alarcón de la Lastra, Maria Ángeles Rosillo, María Luisa Castejon Martínez, Marina Sánchez-Hidalgo, Jand Venes Rolim Medeiros, Isabel Villegas

**Artigo submetido na revista *Biochemical Pharmacology*  
Fator de Impacto: 4.581  
Qualis-Capes: A1 para Biotecnologia**



## **Efeito preventivo da bergenina contra o desenvolvimento de colite aguda induzida por TNBS em ratos, estudo da inibição de mediadores inflamatórios e a modulação da via de sinalização do inflamassoma NLRP3 / ASC**

### **Resumo**

A inflamação é o primeiro processo subjacente ao mecanismo de lesões e úlceras no colon, bloquear esta resposta imune pode ser a chave para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios a partir de produtos naturais, com maior eficiência e menores efeitos colaterais. O objetivo deste estudo é explorar os efeitos da bergenina (BG) em um modelo de colite aguda induzida por TNBS em ratos, a fim de auxiliar nos estudos para o desenvolvimento de novas terapias com produtos naturais para doença inflamatórias intestinais. 48 ratos *Wistar* foram randomizados em seis grupos: (i) controle salina e (ii) controle TNBS; (iii) 5-ASA 100mg/kg/dia (iv) BG 12mg/kg/dia (v) BG 25mg/kg/dia e (vi) BG 50mg/kg/dia. A colite foi induzida por TNBS. Nossos resultados revelaram que a bergenina diminuiu os sinais de danos macroscópicos e microscópicos da colite e reduziu o grau de infiltração neutrofílica no tecido do cólon; Além disso, foi capaz de reduzir a regulação da expressão da proteína COX-2, iNOS, I $\kappa$ B- $\alpha$  e pSTAT3. Do mesmo modo, o tratamento com bergenina reduziu os níveis de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 e inibiu as vias de sinalização de inflamassoma NLRP3/ASC por via canônica através da IL-1 e não-canônica pela IL-11. Conclusão: nosso estudo forneceu evidências de que a administração de bergenina reduziu o dano causado por TNBS em um modelo experimental de colite aguda em ratos, reduziu os níveis de proteínas e citocinas pró-inflamatórias, provavelmente por modulação e bloqueio de pSTAT3 e NF- $\kappa$ B e bloqueio do inflamassoma de NLRP3/ASC por via canônica e não-canônica.

**Palavras-chave:** Bergenina. TNBS. Colite aguda. Inflamassoma NLRP3/ASC.

Caspases

## 1. Introdução

Entre as principais doenças inflamatórias intestinais (DII), a colite ulcerativa caracteriza uma desordem aguda ou crônica do sistema gastrintestinal com condições inflamatórias, que incluem diarréia com ou sem sangue, dor abdominal, febre, perda de peso e úlceras cuja prevalência e a incidência anual vem aumentando constantemente em todo o mundo, afetando pessoas de todas as idades (LEINWAND et al., 2017; GONZÁLEZ et al., 2016; IRAPORDA et al., 2016).

Mesmo com etiologia incerta, a colite ulcerativa pode ser associada a condições multifatoriais em termos de imunidade, genética e condições não-imunes, como fatores ambientais. Esta doença afeta fortemente a vida dos pacientes porque ainda não existe tratamento específico e não há perspectivas de cura. A forma atual de controle da colite é baseada na terapia farmacológica convencional com o uso de corticosteróides, imunossuppressores, salicilatos e imunomoduladores (WEI et al., 2017; ÁVILA-ROMÁN et al., 2016; SUN et al., 2016).

Esta condição multifatorial leva a mudanças na permeabilidade da barreira intestinal e perda de proteção contra lesões o que resulta em úlceras em vários locais do intestino. Do ponto de vista imunológico, as duas proteínas, óxido nítrico induzível sintetase (iNOS) e ciclooxygenase-2 (COX-2) estão diretamente associadas ao aumento das lesões inflamatórias no cólon, bem como os níveis elevados de marcadores inflamatórios, entre eles a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-18 (IL-18) além da mieloperoxidase (MPO) e os baixos níveis de interleucina-10 anti-inflamatória (IL-10) (MOTAGHI et al., 2016; SADAR et al., 2016).

Embora os mecanismos etiológicos não estejam completamente elucidados, alguns pesquisadores relatam a importância de propor novos meios terapêuticos usando produtos naturais isolados ou dietas suplementadas com presença de substâncias derivadas de plantas (APARICIO-SOTO et al., 2016; SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2015; CÁRDENO et al., 2013).

Como a inflamação é o primeiro processo subjacente ao mecanismo de lesões e úlceras no cólon, bloquear esta resposta imune pode ser a chave para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios a partir de produtos naturais, com maior eficiência e menores efeitos colaterais. Várias pesquisas mostraram interesse em compostos fenólicos devido à ação farmacológica antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana que a maioria desses compostos

possuem (MZID et al., 2017; EL-HAWARY et al., 2016; NARANG; JIRAUNGKOORSKUL, 2016).

A bergenina ((2R, 3S, 4S, 4aR, 10bS) -3,4,8,10-tetrahydroxy-2-(hydroxymethyl) -9-methoxy-3,4,4a, 10b-tetrahydro-2H-pyrano (3 , 2-c) isochromen-6-one (C 14 H 16 O 9)) é um dos principais constituintes ativos das plantas do gênero *Peltophorum* e é classificado como um C-glicósido derivado do ácido 4-O-metil gálico (BAJRACHARYA et al., 2015). Este composto apresenta propriedades farmacológicas como atividades antibacterianas (RAJ et al., 2012), antitumoral (ZHANG et al., 2013) e antidiabética (KUMAR et al., 2012). Além disso, a sua atividade anti-inflamatória também foi estudada em investigações experimentais (tanto *in vivo* como *in vitro*), como no modelo de edema de pata induzido por carragenina, o modelo de artrite em camundogo balb/c dosando as concentrações de ciclooxigenase (COX) -1, COX-2 e fosfolipase A2 (PLA2) (BAJRACHARYA et al., 2015). No entanto, a sua possível atividade anti-inflamatória *in vivo* na colite ulcerativa ainda não foi descrita.

O objetivo deste estudo foi explorar os efeitos da bergenina (BG) em um modelo de colite aguda induzida por TNBS em ratos, a fim de auxiliar nos estudos para o desenvolvimento de novas terapias de produtos naturais para DII.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Animais experimentais

Um total de 48 ratos *Wistar* machos com oito semanas de idade fornecidos pela Janvier Labs<sup>®</sup> (França) e mantidos no laboratório de manipulação da Faculdade de Farmácia – Universidade de Sevilla – Espanha sob condições controladas de temperatura (24-25 °C) e umidade (70-75%) com ciclo claro/escuro de 12h. Recebendo água e comida *ad libitum*. Os ratos foram randomizados em seis grupos: (i) Controle (solução salina) e (ii) controle de TNBS; (iii) ácido 5-aminosalicílico (5-ASA); (iv) BG 12; (v) BG 25 e (vi) BG 50. As doses orais de 5-ASA (100 mg/kg de peso corporal) e BG (BG 12: 12 mg/kg de peso corporal, BG 25: 25 mg BG/kg de peso corporal e BG 50: 50mg BG/kg de peso corporal) (BG e 5-ASA foram dissolvidos em PBS). Doses escolhidas com base nas análises descritas na literatura (PEREIRA et al., 2017; PATEL et al., 2012). A BG, salina e o 5-ASA foram

administrados por via oral às 48, 24, e 1 h antes da indução de colite e 24 h depois. O grupo controle recebeu salina em um volume comparável (10 ml/kg de peso corporal). Os experimentos seguiram o protocolo aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Farmácia. Todos os experimentos estavam em conformidade com as recomendações da União Europeia relativas à experimentação animal (Diretiva do Conselho Europeu 2010/630 / UE).

## *2.2. Indução da colite ulcerativa*

A colite foi induzida por administração de TNBS (Sigma-Aldrich Company Ltd., Espanha), dissolvida em etanol a 50% (10 mg num volume de 0,25 ml para induzir a colite aguda) de acordo com o procedimento de Morris descrito por Martín et al. (2004). Os animais foram sacrificados 48 horas após a indução de colite usando alta concentração de anestesia. Os ratos foram monitorados diariamente com observações do comportamento, peso corporal e consistência das fezes.

## *2.3. Avaliação macroscópica da gravidade da colite clínica*

No final do período experimental, os cólons dos animais foram removidos para avaliar a presença de adesão e variações no peso/comprimento como índice de inflamação. A colite clínica foi avaliada por um observador independente ao tratamento. Uma porção distal de 10 cm do cólon de cada animal foi removida e cortada longitudinalmente, ligeiramente limpa em solução salina para remover resíduos fecais e depois pesadas. As escalas de pontuações do dano macroscópico foram atribuídas com base nas características clínicas do cólon (MARTÍN et al., 2004). A presença de adesões (escala 0-2), ulceração (escala 0-10) e / ou consistência das fezes (escala 0-1) foram avaliadas de acordo com o critério de Bobin-Dubigeon et al. (2001). O índice do peso do cólon/comprimento do cólon, foi utilizado como marcador de dano macroscópico. Pedacos do tecido colônico foram coletados e congelados em nitrogênio líquido para a medição dos parâmetros bioquímicos.

#### *2.4. Avaliação histopatológica*

Para o exame histológico, utilizamos amostras da parte distal do cólon de cada animal fixado em paraformaldeído tamponado a 4%, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e incorporadas em parafina. Posteriormente, seções do tecido foram cortadas a 4 mm em um micrótomo rotativo (Leica Ultracut<sup>®</sup>), montadas em lâminas de vidro limpas e secas a 37 °C. As seções foram limpas, hidratadas e coradas com hematoxilina/eosina e azul de Alcian para avaliação histológica de dano colônico e conteúdo de muco, respectivamente, de acordo com os protocolos padrões. As lâminas foram codificadas para evitar viés de observação durante a avaliação. Todas as seções de tecido foram examinadas em um microscópio Olympus<sup>®</sup> modelo BH-2 para caracterização das alterações histopatológicas. As fotografias obtidas de amostras de cólon foram digitalizadas usando uma camera Olympus<sup>®</sup> BX61 acoplada ao microscópio. A análise dos números de lesões foi realizada pelo programa de análise de imagem Adobe 1 Photoshop 1 Versão 6.0 (Adobe Systems<sup>®</sup>).

#### *2.5. Avaliação do envolvimento de neutrófilos*

A atividade da MPO foi avaliada como marcador de infiltração de neutrófilos de acordo com o método de Grisham et al. (1990) com pequenas modificações. Em todos os animais obteve-se uma amostra da região distal do cólon. As amostras foram processadas como descrito por Larrosa et al. (2010).

#### *2.6. Quantificação dos mediadores inflamatórios*

As amostras da região distal do cólon foram pesadas e homogeneizadas, após descongelamento, com 3 mL de solução salina tamponada (PBS pH 7,2), centrifugadas a 4 °C a 12.000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados para determinar a produção de citocinas com kits quantitativos de imunoensaio (ELISA): IL-1 $\beta$ , INF- $\gamma$  e IL-10 (Diacclone, Besaçon Cedex, França) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de proteína dos homogeneizados foram determinadas seguindo o método colorimétrico de Bradford (1976) e o conteúdo de citocinas calculado como picogramas por miligrama de tecido.

## *2.7. Isolamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares e detecção por imunotransferência*

Os tecidos de cólon congelados foram pesados e homogeneizados em tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 8 mM, EGTA 5 mM, EDTA 0,5 mM, 0,01 mg/mL de leupeptina, 0,01 mg/mL de pepstatina, 0,01 mg/mL de aprotinina, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo e NaCl 250 mM). Os homogeneizados foram centrifugados (12.000 g / 15 min / 4 °C) e os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80 °C. A concentração de proteína do homogeneizado foi determinada seguindo o método colorimétrico de Bradford (1976).

As alíquotas de sobrenadantes contendo quantidades iguais de proteína (50 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida a 10% por eletroforese. No passo seguinte, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose e bloqueadas com 5% de leite em NP-40 0,05% em PBS, após isso, foram incubadas com os anticorpos primários específicos: anti-COX-2 policlonal e anti-iNOS policlonal (160862, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) na diluição de 1:2.500 e 1:1.000, respectivamente); anti-IL-18 policlonal (ab71495, Abcam plc) à diluição de 1:200; anti-IκBα (44D4, Cell Signaling Technology, Inc.) em diluição de 1:1000, anti-pSTAT3 e anti-ASC1 (sc-8059 e sc-376916, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, Inc) em diluição 1:100; anti-caspase-1, anti-caspase-11 e anti-NLRP3 (NBP1-45433, NBP1-45453, 25N10E9 e NBP2-03948, respectivamente, Novus Biologicals, LLC) em diluição de 1:400, 1:500 e 1:500, respectivamente. durante uma noite a 4 °C.

Logo depois, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário específico, anti-rabbit (10004301, Cayman Chemical) na diluição de 1:2.500 ou anti-mouse (P0447, Dako, Atlanta, GA, EUA) na diluição de 1:2.500 durante 2h à temperatura ambiente. Para provar o carregamento igual do conteúdo de proteínas, as membranas foram analisadas quanto à expressão da β-actina usando um anticorpo anti-β-actina (A5316, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A imunodeteção foi realizada utilizando um kit de detecção de luz de quimioluminescência (34095, Supersignal West Femto, Thermo Fisher Scientific Inc). Os imunossinais foram capturados usando o Sistema de Imagem LAS-3000 Fujifilm Image Reader (Stamford, EUA) e os dados densitométricos foram estudados após a

normalização com os dados da  $\beta$ -actina. Os sinais foram analisados e quantificados pelo programa de imagem em Java (Image J, Softonic).

### 2.8. Análises estatísticas

Todos os valores nas figuras e no texto foram expressos como médias aritméticas  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram avaliados com o software GraphPad Prism<sup>®</sup> Versão 5.01. A significância estatística de qualquer diferença em cada parâmetro entre os grupos foi avaliada por análise de variância unidirecional (ANOVA), usando Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. No experimento envolvendo histologia e *Western Blot*.

## 3. Resultados

### 3.1. Efeitos da bergenina na colite aguda de ratos induzida por TNBS

A administração intracolônica de 10 mg de TNBS dissolvido em etanol durante dois dias induziu um estado de colite aguda nos animais caracterizada por diarreia sanguinolenta, perda de peso e ulceração da mucosa colônica acompanhada de infiltração de neutrófilos. Após 48h da indução da colite, os animais do grupo controle TNBS (TNBS) apresentaram grande perda de peso. A diferença na inflamação do trato intestinal foi apresentada por um aumento significativo da relação peso / comprimento do colon e a presença de adesões entre os órgãos adjacentes como índice de inflamação, em comparação com o grupo controle negativo (salina) (**Tabela 1**).

O estudo macroscópico do cólon mostrou uma aparência flácida, estreitamento do lúmen intestinal, inflamação e necrose; Além disso, a mucosa adjacente apresentou edema e hemorragia (**Figura 1**). Os grupos de animais tratados com 5-ASA (100 mg/kg) e BG (25 e 50 mg/kg) apresentaram perda de peso menor em comparação com o grupo TNBS, mas relações de peso/comprimento foi semelhante, sugerindo um menor grau de inflamação, o que é confirmado através dos valores da pontuação de dano macroscópico para ambas as doses de BG

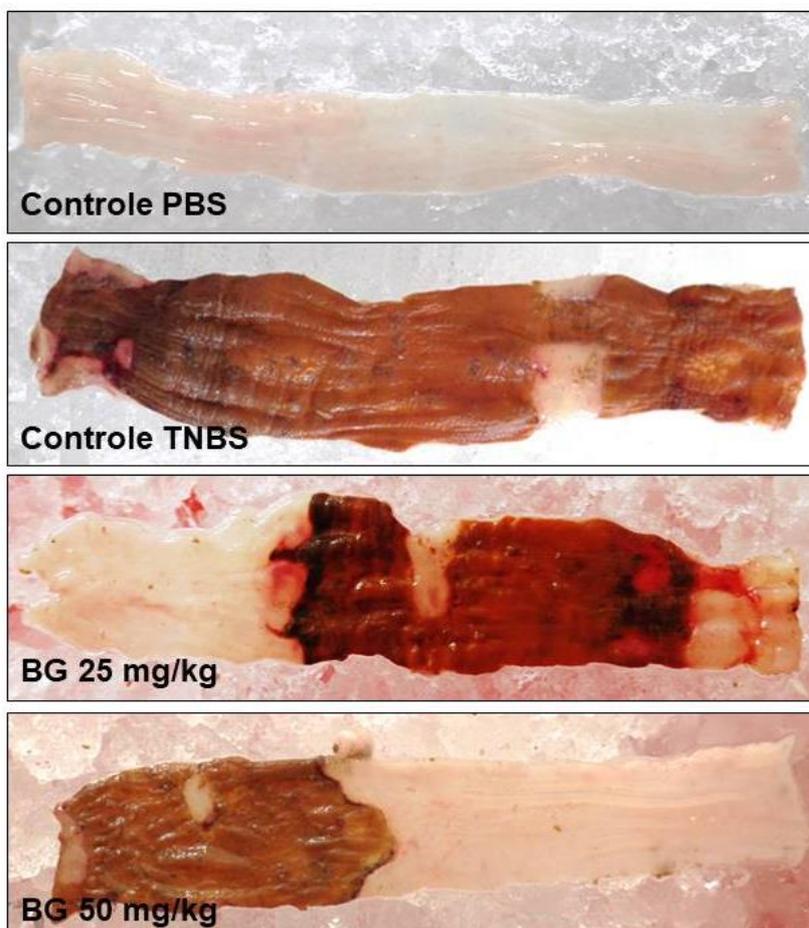
(\*\*\*  $p < 0,001$  vs. TNBS), porém BG na dose de 12 mg/kg não mostrou diferença estatística em comparação com o grupo TNBS (**Tabela 1** e **Figura 1**).

**Tabela 1 - Efeitos do tratamento com bergenina (12, 25 e 50 mg / kg) em parâmetros macroscópicos da colite em ratos induzida por TNBS.**

Grupos (n = 8)	Mudança de peso corporal	Peso/comprimento do cólon (g/cm)	Dano macroscópico (Escala de 0-10)	Aderências (Escala de 0-2)	Diarréia (Escala de 0-1)
Controle	5.28 ± 0.44	0,12 ± 0,009	0	0	0
TNBS	-9.91 ± 1.9 <sup>+++</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>+++</sup>	9,75 ± 0,16 <sup>+++</sup>	2 <sup>+++</sup>	1 <sup>+++</sup>
5- ASA	-13.43 ± 0.9 <sup>+++</sup>	0,21 ± 0,001	4,89 ± 0,17 <sup>***</sup>	0,23 ± 0,09 <sup>***</sup>	0,78 ± 0,1
BG12 + TNBS	-1.34 ± 0.4 <sup>***</sup>	0,24 ± 0,01	8,75 ± 0,18	1,89 ± 0,1	0,98 ± 0,1
BG25 + TNBS	-4.21 ± 2.08 <sup>*</sup>	0,23 ± 0,01	5,62 ± 0,18 <sup>***</sup>	1,12 ± 0,1 <sup>***</sup>	0,87 ± 0,1
BG50 + TNBS	-9,00 ± 0.53	0,25 ± 0,01	4,62 ± 0,18 <sup>***</sup>	0,37 ± 0,1 <sup>***</sup>	0,75 ± 0,1

Os valores representam a média ± E.P.M. (n = 8). <sup>+++</sup>p < 0.001 vs controle (PBS); <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001 vs TNBS. (ANOVA e *Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* test).

**Figura 1 - Representação da aparência macroscópica da mucosa do cólon dos ratos.**



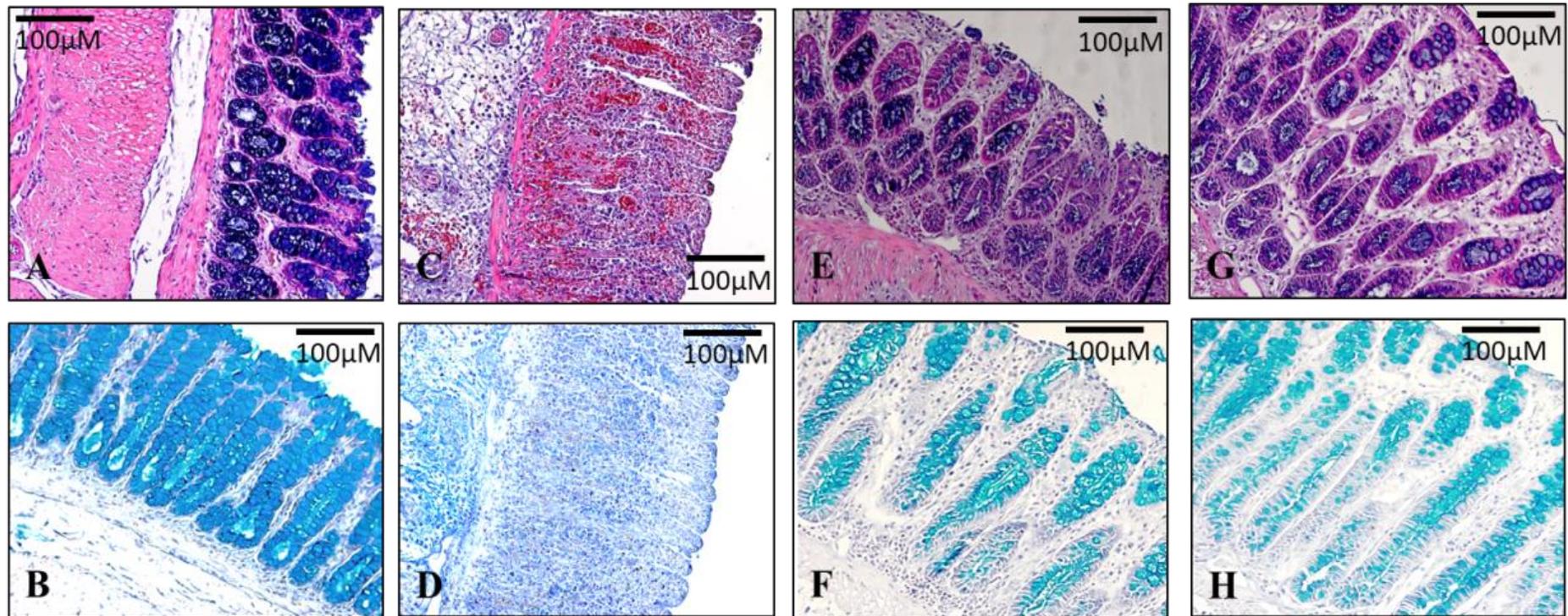
Fonte: Autoria própria (2018).

### 3.2. Estudos histológicos do cólon após tratamento com bergenina no modelo experimental de colite aguda em ratos induzida por TNBS

A avaliação histopatológica do tecido colônico do grupo controle PBS mostrou uma estrutura normal e inalterada (**Figura 2A e B**). O grupo TNBS apresentou lesões em toda a mucosa, perda de estrutura histológica e grande alteração no epitélio glandular, além de úlceras com grandes quantidades de hemorragia, descamação, ausência de glândulas e destruição de nervos epiteliais (**Figura 2C e D**).

Nas seções histológicas obtidas dos grupos tratados com BG nas doses de 25mg/kg (**Figura 2E e F**) e 50 mg/kg (**Figura 2G e H**), foi possível observar a redução da inflamação, a preservação da estrutura glandular, presença de muco e pouco infiltrado inflamatório.

**Figura 2 - Imagens dos cortes histológicos de tecido colônico de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida por TNBS e tratados com bergenina**

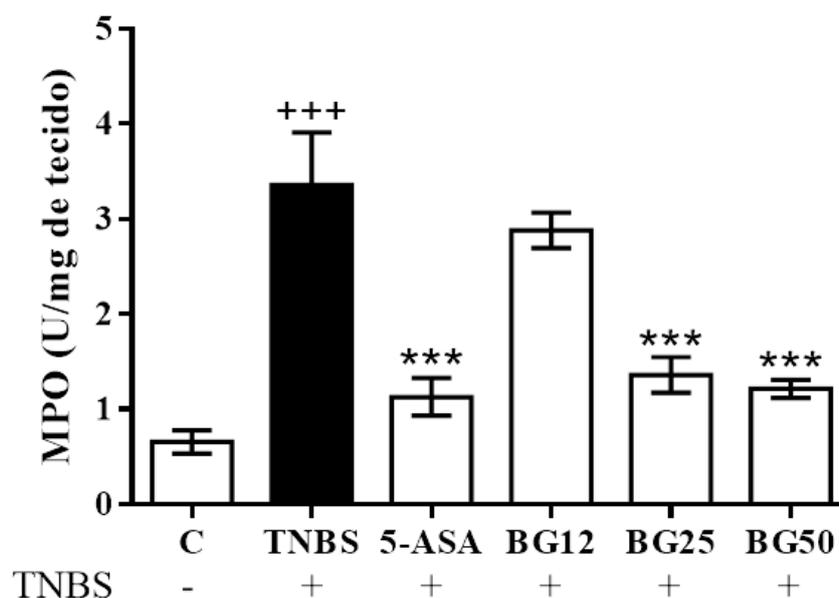


Grupo controle (A e B), grupo TNBS (C e D), grupo BG25 (E e F), grupo BG50 (G e H). As imagens A, C, E e G correspondem a coloração com hematoxilina e eosina (10X); imagens B, D, F e H correspondem a coloração com Alcian blue (10X).

### 3.3. Avaliação dos níveis de MPO após tratamento com bergenia no modelo experimental de colite aguda em ratos induzida por TNBS

Os resultados do estudo colorimétrico como medida direta do grau de infiltração neutrofílica nas amostras de tecido do cólon indicaram que o grupo TNBS teve um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) na atividade da enzima MPO. No entanto, 5-ASA (100 mg/kg) e ambas as doses de BG (25 e 50 mg/kg) foram capazes de diminuir os valores deste parâmetro bioquímico ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo TNBS; enquanto BG 12 mg/kg foi ineficaz (**Figura 3**).

**Figura 3 - Atividade da mieloperoxidase no tecido colônico de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida por TNBS e tratados com bergenia**

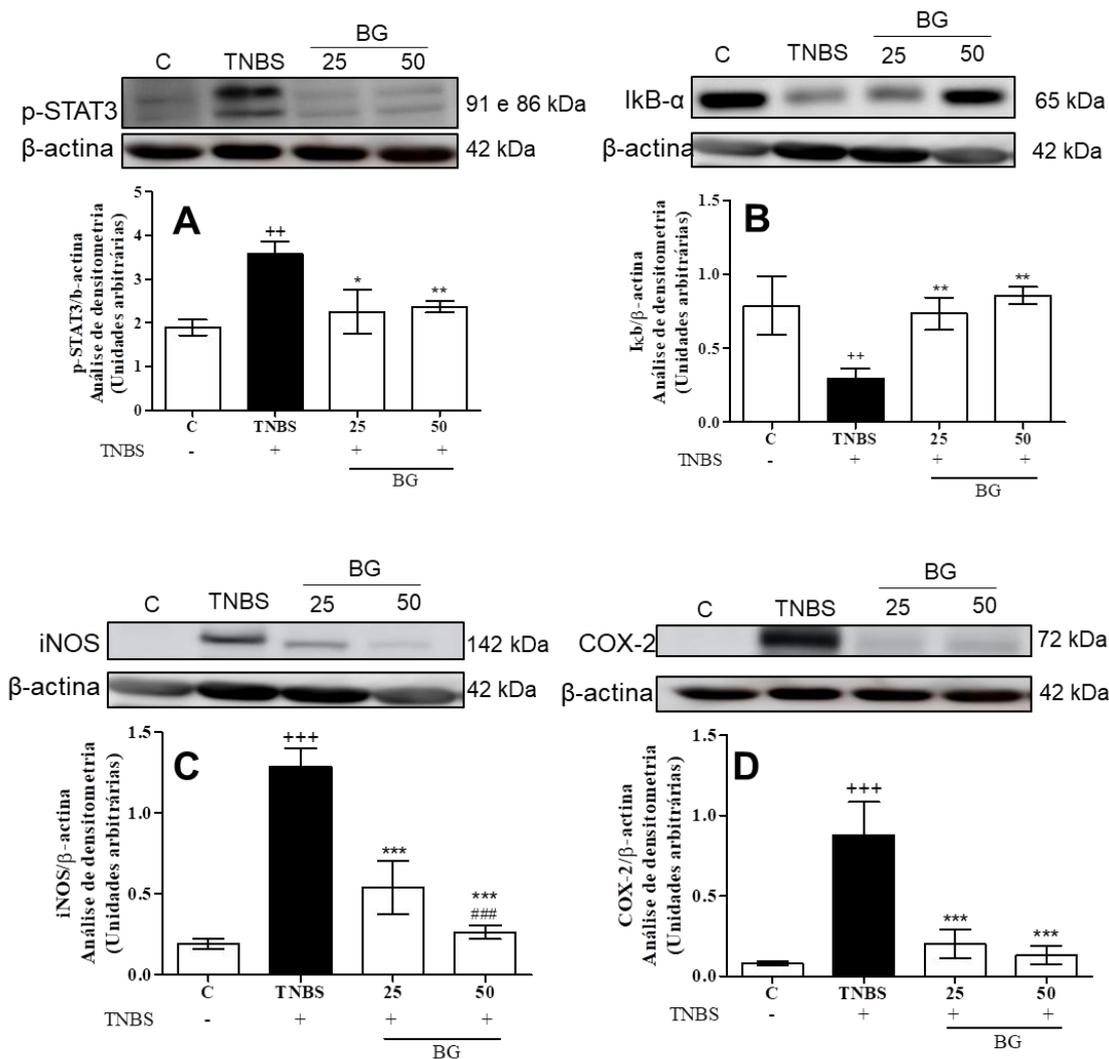


Níveis depois do tratamento com bergenia de ratos com colite aguda induzida por TNBS. Valores representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 8). +++ $p < 0,001$  vs. controle (PBS); \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo TNBS (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

3.4. Expressão de proteínas pSTAT3, I $\kappa$ B- $\alpha$ , iNOS e COX-2 na mucosa colônica de ratos tratados com berberina no modelo de colite aguda induzida por TNBS.

Os níveis de expressão das proteínas pSTAT3, I $\kappa$ B- $\alpha$ , iNOS e COX-2 foram analisados por *Western blot*. Conforme mostrado na Figura 4, os níveis de pSTAT3, iNOS e COX-2 (**Figura 4A, C e D**) foram muito elevados no grupo tratado com TNBS em comparação com o grupo controle PBS ( $p < 0,001$ ); também neste grupo, o nível de I $\kappa$ B- $\alpha$  (**Figura 4B**) diminuiu significativamente ( $p < 0,01$ ) o que mostra um alto nível de inflamação provocada pelo TNBS. Os grupos tratados com BG nas doses de 25 e 50 mg/kg apresentaram níveis de expressão significativamente menores de pSTAT3, iNOS e COX-2 (**Figura 4A, C e D**) em comparação com o grupo TNBS ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Quando o fator de transcrição NF- $\kappa$ B é analisado através da sua subunidade I $\kappa$ B- $\alpha$  (**Figura 4B**), há um aumento significativo nos grupos tratados com BG nas doses de 25 e 50 mg/kg em relação ao grupo TNBS ( $p < 0,01$ ), mostrando que o tratamento com BG diminui os níveis de inflamação na colite aguda induzida por TNBS.

**Figura 4 - Expressão das proteínas pSTAT-3, IκB-α, iNOS e COX-2 no tecido colônico de ratos submetidos ao modelo de colite aguda induzida por TNBS e tratados com bergenia**

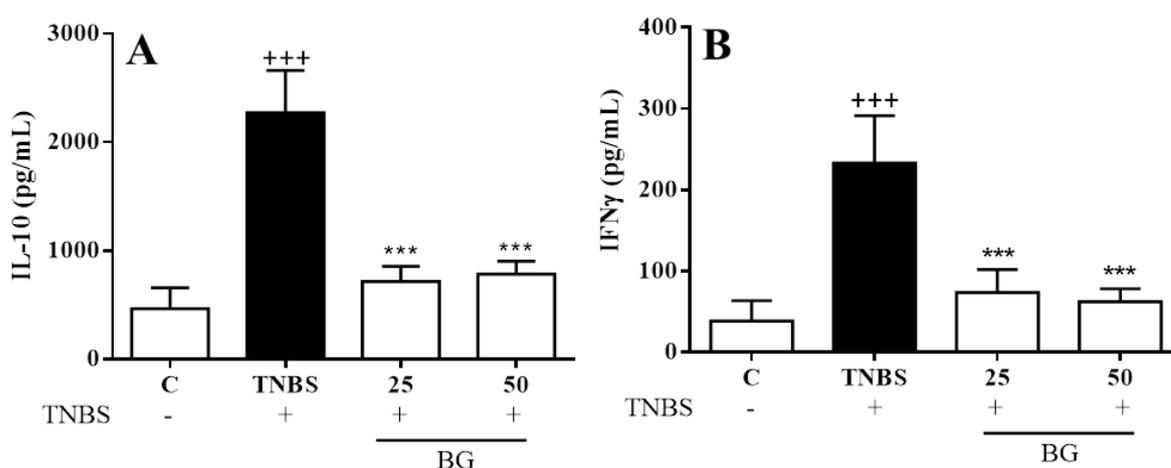


Expressão das proteínas pSTAT-3 (A) e IκB-α (B), iNOS (C) e COX-2 (D) depois do tratamento com bergenia dos ratos com colite aguda induzida por TNBS. Os plots representam a intensidade das bandas que foram mensuradas pelo programa Image J. A β-Actina foi usada como controle de normalização de carga. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 8). \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001 vs. controle (PBS); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001 comparado com o grupo TNBS. ###p < 0.001 vs. BG25. (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

### 3.5. Efeitos do tratamento com bergenina na ativação de mediadores inflamatórios na colite aguda induzida por TNBS

A colite induzida por TNBS está associada a muitos tipos de citocinas inflamatórias. Para determinar o efeito da BG na colite aguda, as concentrações de IL-10 e IFN- $\gamma$  foram determinadas (**Figura 5**). Em comparação com o grupo controle negativo (PBS), a estimulação por TNBS levou a um aumento significativo de citocinas no grupo TNBS ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, esses aumentos foram significativamente inibidos por ambas as doses de BG em relação ao grupo TNBS ( $p < 0,001$ ). Estes resultados indicam que BG suprime a produção dessas citocinas.

**Figura 5 - Concentrações de IL-10 e IFN $\gamma$  em ratos com colite aguda após tratamento com bergenina.**



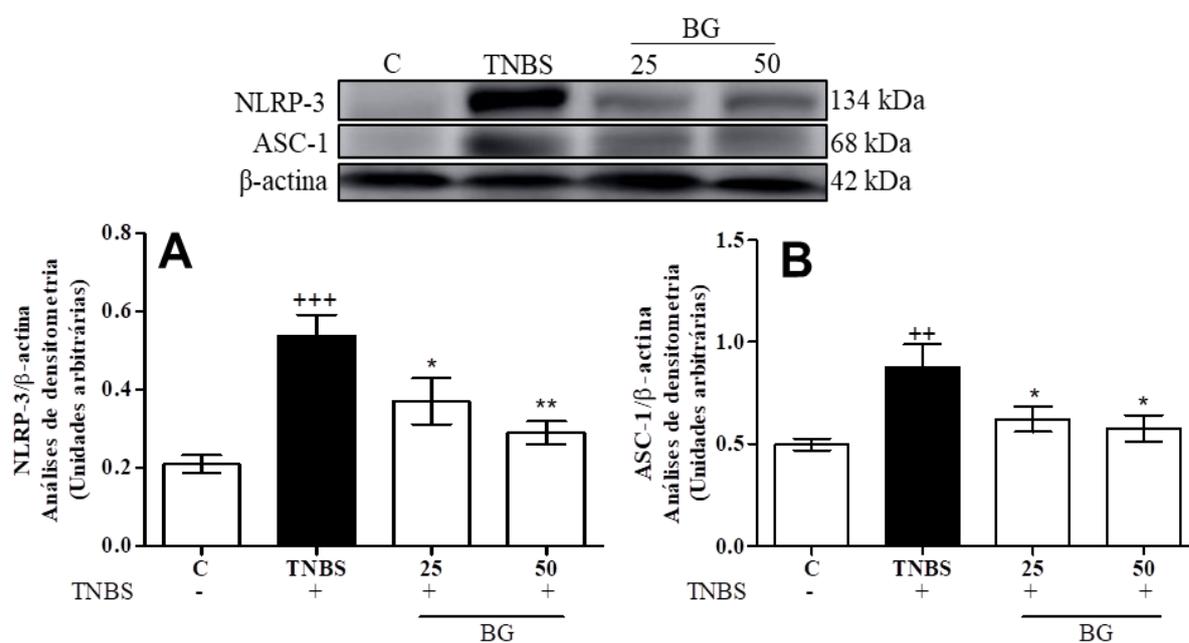
Os níveis das citocinas inflamatórias no tecido colônico foram mensurados por ELISA. Concentrações de IL-10 (A) e IFN $\gamma$  (B). Valores representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 8). <sup>+++</sup>p < 0.001 vs. controle PBS; <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001 vs. TNBS (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

### 3.6. O tratamento com bergenina inibe as vias de sinalização canônica e não canônica do inflamassoma NLRP3/ASC na colite aguda induzida por TNBS

Estudos recentes revelaram a importância do inflamassoma NLRP3/ASC na regulação da homeostase intestinal e no risco de desenvolver doença inflamatória intestinal (LIU et al., 2017; VELTMAN et al., 2017; KE et al., 2016). Por esse motivo, decidimos avaliar os efeitos do tratamento com BG na modulação deste complexo multiproteico. O TNBS produziu um aumento significativo na expressão de NLRP3 ( $p$

< 0,001); No entanto, o tratamento com BG foi capaz de reverter as alterações induzidas por colite aguda em ambas as doses estudadas de 25 e 50 mg/kg ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente; **Figura 6A**). Conforme mostrado na **Figura 6B**, evidenciamos diferenças na expressão da proteína adaptadora ASC. O TNBS produziu um aumento significativo da expressão da proteína ASC ( $p < 0,01$ ), por outro lado, o tratamento com BG foi capaz de reverter as alterações induzidas pelo TNBS na colite aguda em ambas as doses estudadas ( $p < 0,05$ ; **Figura 6B**).

**Figura 6 - Efeitos do tratamento com bergenia na expressão de NLRP3 e ASC em ratos com colite aguda induzida por TNBS**

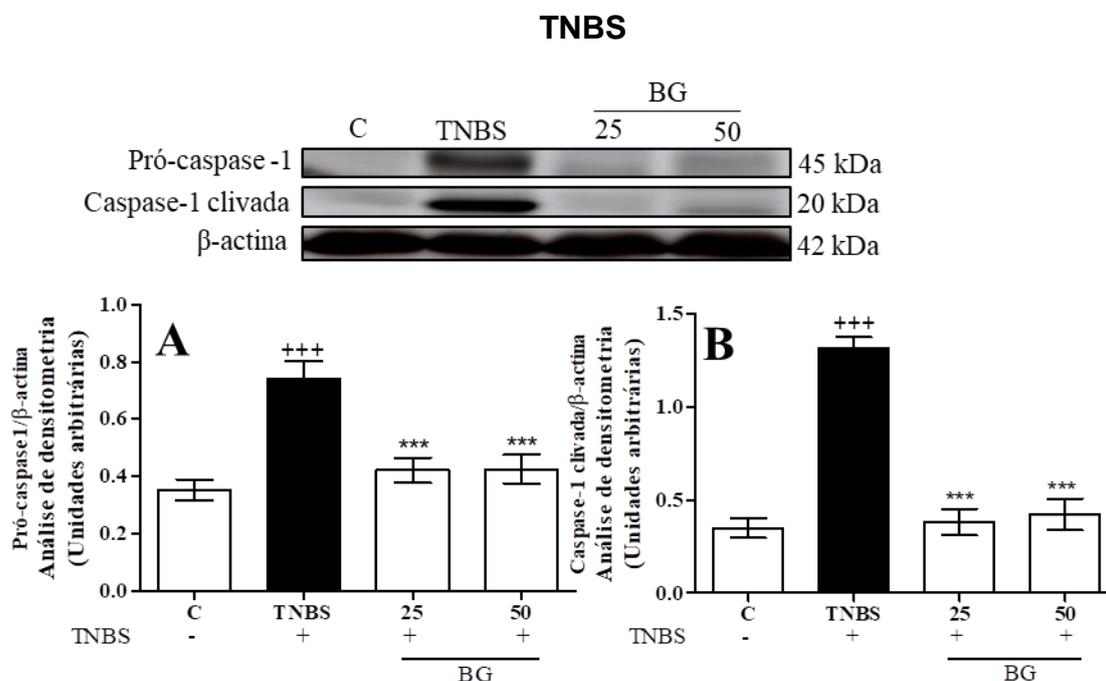


Análise da densitometria (A) NLRP3 e (B) ASC. Os plots representam a intensidade das bandas mensuradas pelo programa Image J.  $\beta$ -Actina foi usada como controle de normalização de carga. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 8). +++ $p < 0.001$ ; ++ $p < 0.01$  vs. controle; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  vs. TNBS (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

A ativação do inflamassoma NLRP3/ASC desencadeia um processo inflamatório dependente da caspase-1, de pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, permitindo a liberação das formas maduras dessas citocinas (HIROTA et al., 2010). A **Figura 7** representa o comportamento da pró-caspase-1 (**Figura 7A**) e a caspase-1 clivada (**Figura 7B**) após o tratamento com bergenia. Observamos que a expressão da pró-caspase-1 e a caspase-1 clivada aumentaram significativamente no grupo TNBS ( $p < 0,001$ ), enquanto as duas formas foram significativamente diminuídas após o tratamento com BG ( $p < 0,001$ ) em comparação com o grupo TNBS. Esses

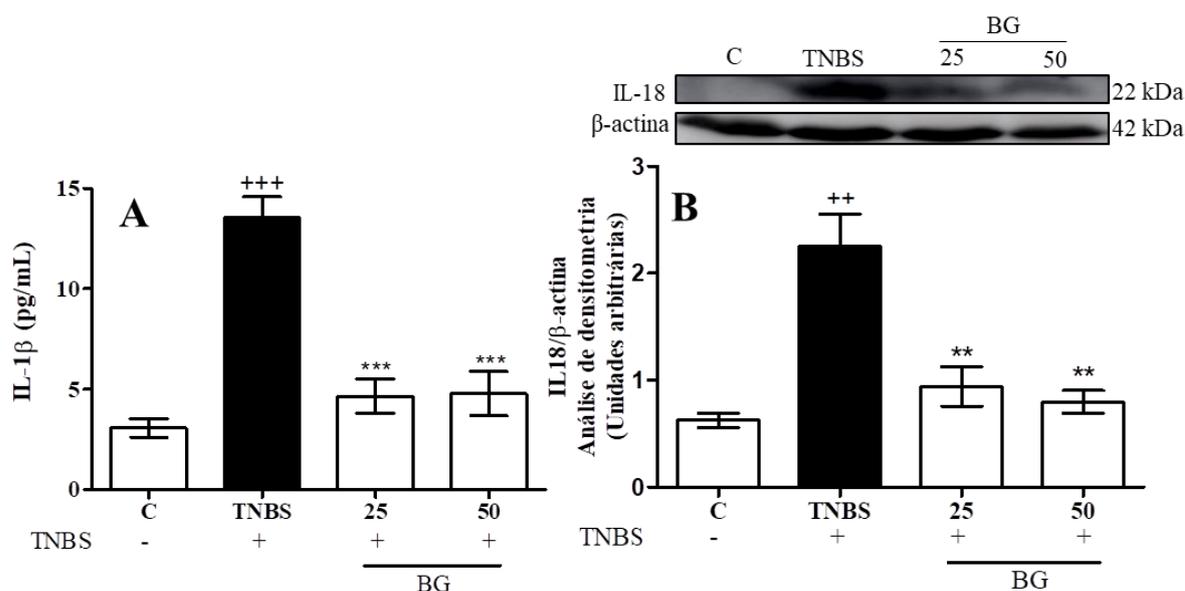
resultados corroboraram que o tratamento com BG é capaz de reduzir a regulação da ativação da caspase-1 em ambas as doses estudadas.

**Figura 7 - Efeitos do tratamento com bergenina na expressão de Pro-caspase 1 e caspase-1 no tecido colônico depois de ratos com colite aguda induzida por**



Análise de densitometria (A) Pró-caspase-1 e (B) caspase-1 clivada. Os plots representam a intensidade das bandas que foram mensuradas pelo programa Image J. β-Actina foi usada como controle de normalização de carga. Os valores representam a média ± E.P.M (n = 8). \*\*\*p < 0.001 vs. controle; \*\*\*p < 0.001 vs. TNBS (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

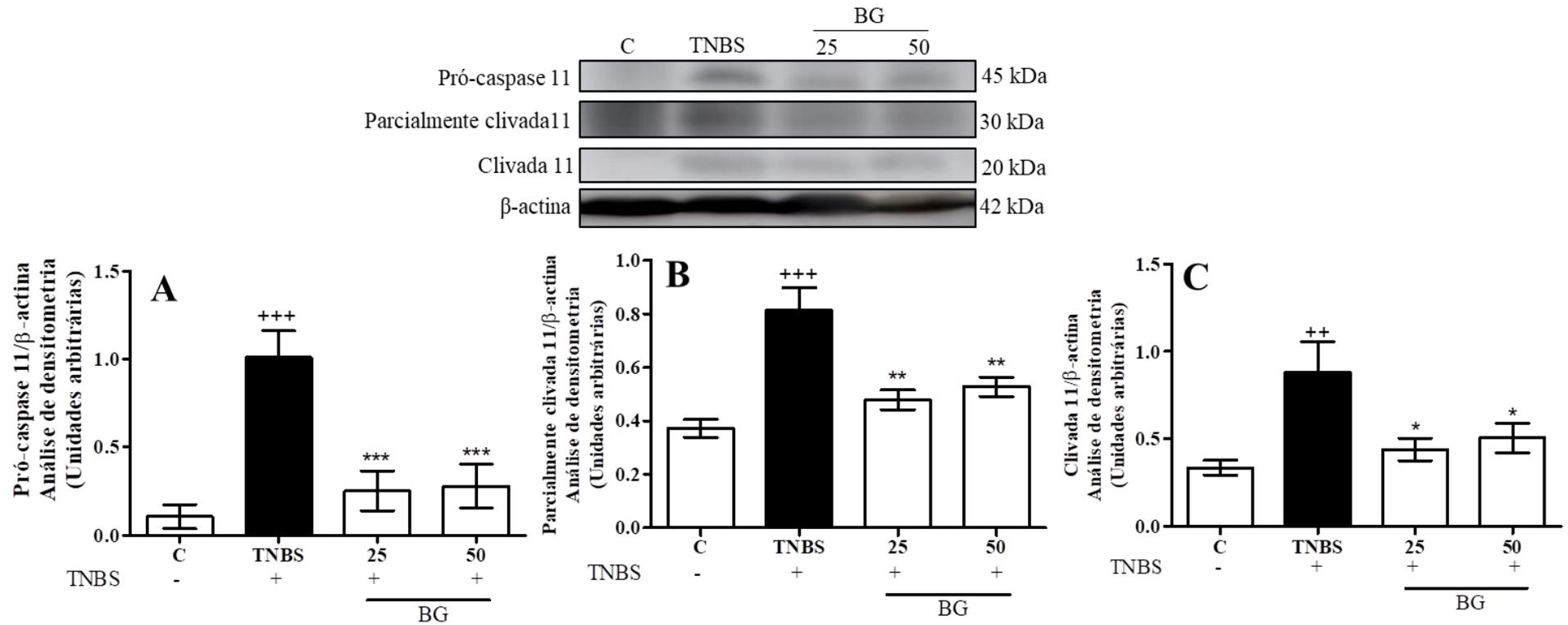
A inibição da caspase-1 clivada está associada a uma diminuição da produção de IL-1β e IL-18. Portanto, decidimos medir os níveis de IL-1β e a expressão de IL-18 na mucosa colônica. Observamos que os níveis de IL-1β (**Figura 8A**) e a expressão da IL-18 (**Figura 8B**) aumentaram significativamente no grupo TNBS (p < 0,001 e p < 0,01, respectivamente), indicando que ambos os mediadores são induzidos no estágio agudo da lesão colônica. No entanto, após o tratamento com BG, nossos resultados demonstraram que a produção de IL-1β e a expressão de IL-18 foram significativamente reduzidas (p < 0,001 e p < 0,01, respectivamente) em comparação com o grupo TNBS.

**Figura 8 - Efeitos do tratamento com bergenina sobre os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-18**

(A) quantificação de IL-1 $\beta$  por ELISA. (B) Análise de densitometria de IL-18. Os plots representam a intensidade das bandas que foram mensuradas pelo programa Image J.  $\beta$ -Actina foi usada como controle de normalização de carga. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 8). +++p < 0.001 e ++p < 0.01 vs. controle; \*\*\*p < 0.001 e \*\*p < 0.01 vs. TNBS (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

Em resumo, o tratamento com BG suprimiu notavelmente os aumentos induzidos pelo TNBS na expressão de NLRP3, ASC, pró-caspase-1, caspase-1 clivada e IL-18, bem como nos níveis de IL-1 $\beta$ , inibindo a via canônica deste inflamassoma. Um mecanismo alternativo para a ativação da caspase-1 é a via não canônica, que envolve a caspase-11 para desencadear na clivagem de caspase-1 e a subsequente liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (VIGANÒ et al., 2013). Diante disso, decidimos avaliar os efeitos da BG na ativação da caspase-11. Descobrimos que o TNBS é capaz de regular a caspase-11 aumentando significativamente sua atividade em suas formas pró-caspase, parcialmente clivada (p < 0,001 para ambos) e clivada (p < 0,01), indicando que durante a colite essa caspase é ativada. Os dados obtidos dos grupos que receberam o tratamento de BG em ambas as doses foi capaz de minimizar a ativação da caspase-11 na forma pró-caspase (p < 0,001), parcialmente clivada (p < 0,01 e totalmente clivada (p < 0,05) quando comparado ao grupo TNBS (**Figura 9A-C**, respectivamente).

**Figura 9 - Efeito do tratamento com bergenina sobre o nível de caspase-11 no tecido colônico de ratos com colite aguda induzida por TNBS**



Análise de densitometria (A) Pro-caspase 11; (B) caspase-11 clivada parcialmente e (C) caspase-11 clivada. Os plots representam a intensidade das bandas e foram mensuradas pelo programa Image J.  $\beta$ -Actina foi usada como controle de normalização de carga. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 8). <sup>+++</sup>p < 0.001 e <sup>++</sup>p < 0.01 vs. controle; <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001, <sup>\*\*</sup>p < 0.01 e <sup>\*</sup>p < 0.05 vs. TNBS (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

#### 4. Discussão

A colite é uma doença classificada como doença inflamatória intestinal aguda ou crônica de etiologia ainda desconhecida que afeta um número crescente de pessoas em todo o mundo (TOLGA et al., 2016). As doenças inflamatórias intestinais são consideradas consequências de uma resposta inadequada e exagerada do sistema imunológico do indivíduo (ZHENG et al., 2017; VASUDEVAN et al., 2017).

Os resultados do presente estudo demonstraram pela primeira vez os efeitos benéficos da administração de bergenina, um derivado de ácido gálico em um modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS em ratos. A administração de BG diminuiu a gravidade e a extensão das lesões intestinais induzidas pelo TNBS. Da mesma forma, a atividade anti-inflamatória da BG foi demonstrada em um modelo de mastite induzida por lipopolisacarídeos (LPS) em camundongos por Gao et al. (2015) onde BG foi capaz de inibir o dano inflamatório induzido pelo LPS em células mamárias.

Na análise histopatológica de nosso estudo, a administração de BG influenciou na diminuição do dano causado pelo TNBS nas células do tecido epitelial do cólon de ratos com colite aguda, resultados semelhantes foram demonstrados em ratos submetidos a um modelo experimental de inflamação renal (LEINWAND et al., 2017). A evidência do nível diminuído de infiltração de neutrófilos nos grupos tratados com bergenina no modelo de colite aguda induzida por TNBS foi demonstrada medindo o nível de MPO, que é um indicador da migração dessas células no caso de um processo inflamatório (GAO et al., 2015). O tratamento com BG induziu a diminuição no nível de MPO no homogenato de tecido colônico dos ratos. Assim, este resultado está de acordo com os resultados demonstrados por Bajracharya e colaboradores (2015).

O aumento do fator de transcrição de expressão STAT3, que é fosforilado durante o processo inflamatório, é essencial para induzir a ativação de estatinas, citocinas e fatores de crescimento com atividades pró-inflamatórias além de auxiliar na diferenciação de linfócitos T (MA et al., 2017; RAY et al., 2014; PARK et al., 2005; GLEZER et al., 2000). Nossos resultados mostraram que a BG foi capaz de diminuir a fosforilação de STAT. Quanto ao fator de transcrição NF-κB, este tem um papel fundamental no sistema imunológico (ROSILLO et al., 2016) e nas patologias

de distúrbios inflamatórios (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2015). Existe uma correlação entre a ativação do NF- $\kappa$ B e o grau de inflamação (SU et al., 2016). Este fator é encontrado no citoplasma da célula como um dímero formado por duas subunidades, geralmente p50 e p65 ligadas aos seus inibidores I $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  e I $\kappa$ B-e) que impedem a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo (ŚWIĘRKOT et al., 2016; ROSILLO et al., 2011). A degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$  permite a entrada de NF- $\kappa$ B no núcleo, no qual tende a se ligar a sequências específicas do DNA e passa a regular a transcrição de um grande número de genes que codificam proteínas inflamatórias (ALQAHTANI et al., 2016; LEE et al., 2016). Em nossos resultados, observamos um grau de preservação de I $\kappa$ B- $\alpha$  nos grupos tratados com BG.

No que diz respeito às enzimas indutoras iNOS e COX-2, amplamente conhecida por estar presente nos processos inflamatórios, a iNOS aumenta a produção de óxido e gera espécies de nitrogênio reativo e afeta a integridade do tecido (SUZUKI et al., 2016), de forma semelhante à COX-2 também tem sua atividades desenvolvida (PAPADAKIS et al., 2000). Estudos mostram que COX-2 atua em sinergismo com iNOS para potencializar a reação inflamatória (ROSILO et al., 2011). Nosso grupo e outros autores relataram que existe uma forte correlação entre a colite e o aumento da expressão dessas proteínas (SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2015; PATEL et al., 2012), e neste estudo demonstramos pela primeira vez que o tratamento com BG foi capaz de diminuir a expressão de ambas as proteínas em o modelo de colite aguda induzida por TNBS em ratos.

A patogênese da colite ulcerativa está intimamente ligada a um desequilíbrio na liberação de citocinas como IL-6, IL-10 e IL-17 (BARADA et al., 2007). A literatura informa que a IL-10 está relacionada à manutenção da homeostase imune intestinal (FIORUCCI et al., 2002). Esta citocina é produzida por células B e T, macrófagos, mastócitos e células epiteliais intestinais (MAERTEN et al., 2004), e faz parte de um sistema que suprime a expressão de citocinas pró-inflamatórias (STASI et al., 20104). No entanto, existem contradições quanto ao desempenho desta citocina na colite experimental, alguns estudos apresentaram aumento da expressão (VASILYEVA et al., 2016; LIU et al., 2003) e outros não mostraram alterações significativas desta citocina nos modelos experimentais de colite aguda (NYOMBAYIRE et al., 2016; SILVEIRA et al., 2009). Esta diferença nos níveis de IL-10 no modelo de colite aguda por TNBS pode estar relacionada à fase inflamatória do processo que pode ser aumentada no início da inflamação e retornar aos níveis

basais na resolução da inflamação (STASI et al., 2004). Em nosso experimento, os níveis de IL-10 mostraram um aumento significativo no grupo TNBS em comparação com o controle PBS; Por outro lado, nos grupos tratados com BG, os níveis de IL-10 foram significativamente reduzidos em relação ao grupo TNBS, estando de acordo com os achados publicados na literatura sobre a expressão de IL-10 em colite experimental aguda por TNBS (STASI et al., 2004).

O IFN- $\gamma$  é considerado uma citocina chave para a ativação da resposta imune do tipo Th1 (CAMPANIELLO et al., 2017) e contribui para a resposta inflamatória aguda e crônica, atraindo células fagocíticas para o local da inflamação (BRYANT; FITZGERALD, 2013). Em monócitos e macrófagos, o IFN- $\gamma$  estimula a síntese de TNF- $\alpha$  (MASTERS, 2013). No nosso estudo, observou-se que o TNBS induziu o aumento da expressão de IFN- $\gamma$ , enquanto que o tratamento com BG reduziu os níveis desta citocina. Resultados semelhantes foram observados por Campaniello et al. (2017).

IL-1 $\beta$  e IL-18 são citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel importante no complexo inflamatório. A ativação destas citocinas depende da atividade do inflamassoma NLRP3/ASC e Caspase-1. Quando o inflamassoma é ativado, a extremidade distal da cadeia polipeptídica amino-terminal (PYR) da proteína NLRP3 se liga ao PYR da proteína ASC, esta junção faz com que os domínios de ativação e domínio de recrutamento (CARD) da ASC se liguem ao domínio CARD da pró-caspase1 que é clivada e ativada, conseqüentemente, ativando a síntese e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (BAUER et al., 2017). A literatura relata que se bloquear a ativação do inflamassoma em modelos experimentais de colite, têm-se uma queda dos níveis da inflamação (ZAKI et al., 2010; SIEGMUND et al., 2001). Assim, o desenvolvimento de novas terapias eficientes para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais pode estar no mecanismo patológico do inflamassoma. Nosso estudo revelou que a administração de BG a ratos submetidos ao modelo de colite aguda TNBS reduziu significativamente os níveis de expressão de NLRP3, ASC e Caspase 1 em sua forma clivada e não clivada, além de diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  e a expressão da IL-18, bloqueando a via canônica do inflamassoma. Um estudo mostrou que a caspase-1 é um dos principais mediadores da instalação da colite e que a diminuição desta enzima em um modelo de colite aguda é capaz de diminuir o dano inflamatório (ZHANG et al., 2014), uma vez que reduz os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-18 o que corrobora com nossos resultados.

Por uma via adicional não-canônica, o inflamassoma é descrito como sendo ativado pela caspase-11 no processo de síntese de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. No entanto, a caspase-11 sozinha não tem a capacidade de ativar IL-1 $\beta$  e IL-18, portanto, a literatura sugere que esta via age em associação com NLRP3 para efetuar a clivagem e maturação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (WILLIAMS et al., 2015; OFICJALSKA et al., 2015; BROZ et al., 2013). Nosso estudo demonstrou que a administração de BG também reduz a atividade da caspase-11.

Assim, sugere-se que o BG pode exercer os efeitos anti-inflamatórios através das vias de sinalização canônica e não canônica do inflamassoma NLRP3 / ASC. No entanto, uma investigação detalhada do mecanismo ainda é necessária.

## 5. Conclusão

O estudo forneceu evidências de que a administração de BG reduz o dano causado por TNBS em um modelo experimental de colite aguda em ratos, diminui os níveis de proteínas e citocinas pró-inflamatórias, provavelmente por modulação de das vias de STAT3 e NF- $\kappa$ B e também pela diminuição da atividade das vias canônica e não-canônica do inflamassoma NLRP3/ASC.

## Referencias

ALQAHTANI, S.; MAHMOUD, A. M. Gamma-Glutamylcysteine Ethyl Ester Protects against Cyclophosphamide-Induced Liver Injury and Hematologic Alterations via Upregulation of PPAR $\gamma$  and Attenuation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

APARICIO-SOTO, M.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; ROSILLO, M.Á.; CASTEJÓN, M.L.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. **Food & function**, v. 7, n. 11, p. 4492-4505, 2016.

ÁVILA-ROMÁN, J.; TALERO, E.; RODRÍGUEZ-LUNA, A.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; MOTILVA, V. Anti-inflammatory effects of an oxylipin-containing lyophilised biomass from a microalga in a murine recurrent colitis model. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 12, p. 2044-2052, 2016.

BAJRACHARYA, Gan B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133-152, 2015.

BARADA, K. A.; MOURAD, F. H.; SAWAH, S. I.; KHOURY, C.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; NASSAR, C. F.; SAADÉ, N. E. Up-regulation of nerve growth factor and interleukin-10 in inflamed and non-inflamed intestinal segments in rats with experimental colitis. **Cytokine**, v. 37, n. 3, p. 236-245, 2007.

BAUER, C.; DUEWELL, P.; LEHR, H. A.; ENDRES, S.; SCHNURR, M. Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: influence of genetic and environmental factors. **Digestive diseases**, v. 30, n. Suppl. 1, p. 82-90, 2012.

BAUER, C.; DUEWELL, P.; MAYER, C.; LEHR, H. A.; FITZGERALD, K. A.; DAUER, M.; SCHNURR, M. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. **Gut**, v. 59, n. 9, p. 1192-1199, 2010.

BOBIN-DUBIGEON, C.; COLLIN, X.; GRIMAUD, N.; ROBERT, J. M.; LE BAUT, G.; PETIT, J. Y. Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. **European journal of pharmacology**, v. 431, n. 1, p. 103-110, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROZ, P.; MONACK, D. M. Noncanonical inflammasomes: caspase-11 activation and effector mechanisms. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003144, 2013.

BRYANT, C.; FITZGERALD, K. A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 9, p. 455-464, 2009.

CAMPANIELLO, M. A.; MAVRANGELOS, C.; EADE, S.; HARRINGTON, A. M.; BLACKSHAW, L. A.; BRIERLEY, S. M.; HUGHES, P. A. Acute colitis chronically alters immune infiltration mechanisms and sensory neuro-immune interactions. **Brain, behavior, and immunity**, v. 60, p. 319-332, 2017.

CÁRDENO, A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; ROSILLO, M. A.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 $\alpha$ . **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 1, p. 147-156, 2013.

EL-HAWARY, S. S.; MOHAMMED, R.; ABOUZID, S.; ALI, Z. Y.; ELWEKEEL, A. Anti-arthritic activity of 11-O-(4'-O-methyl galloyl)-bergenin and *Crassula capitella* extract in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 834-844, 2016.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; DEL SOLDATO, P.; FLOWER, R. J.; CLARK, M. J. P.; IGNARRO, L. J. NCX-1015, a nitric-oxide derivative of prednisolone, enhances regulatory T cells in the lamina propria and protects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15770-15775, 2002.

GAO, X. J.; GUO, M. Y.; ZHANG, Z. C.; WANG, T. C.; CAO, Y. G.; ZHANG, N. S. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1142-1150, 2015.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M. C. W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 2000.

GONZÁLEZ, L. Y.; MARÍN-JIMÉNEZ, I. Therapeutic approach to Crohn disease: possible parallels with hidradenitis suppurativa. **Actas dermo-sifiliograficas**, v. 107, p. 2-7, 2016.

GRISHAM, M. B.; BENOIT, J. N.; GRANGER, D. N. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 729-742, 1990.

HIROTA, S. A.; NG, J.; LUENG, A.; KHAJAH, M.; PARHAR, K.; LI, Y.; MCCAFFERTY, D. M. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. **Inflammatory bowel diseases**, v. 17, n. 6, p. 1359-1372, 2010.

IRAPORDA, C.; ROMANIN, D. E.; BENGGOA, A. A.; ERREA, A. J.; CAYET, D.; FOLIGNÉ, B.; RUMBO, M. local Treatment with lactate Prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis Model. **Frontiers in immunology**, v. 7, 2016.

KE, P.; SHAO, B. Z.; XU, Z. Q.; WEI, W.; HAN, B. Z.; CHEN, X. W.; LIU, C. Activation of cannabinoid receptor 2 ameliorates DSS-induced colitis through inhibiting NLRP3 inflammasome in macrophages. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0155076, 2016.

KUMAR, R.; PATEL, D. K; PRASAD, S. K., LALOO, D,; KRISHNAMURTHY, S,.; HEMALATHA, S. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 395-401, 2012.

LARROSA, M.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. J.; SELMA, M. V.; AZORÍN-ORTUÑO, M.; TOTI, S.; ESPÍN, J. C. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 717-725, 2010.

LEE, W. S.; NG, R. T.; CHAN, K. W.; LAU, Y. L. Variable outcome in infantile-onset inflammatory bowel disease in an Asian cohort. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 48, p. 10653, 2016.

LEINWAND, K. L.; GERICH, M. E.; HOFFENBERG, E. J.; COLLINS, C. B. Manipulation of the Endocannabinoid System in Colitis: A Comprehensive Review. **Inflammatory bowel diseases**, v. 23, n. 2, p. 192-199, 2017.

LIU, L.; DONG, Y.; YE, M.; JIN, S.; YANG, J.; JOOSSE, M. E.; SAFAR, B. The pathogenic role of NLRP3 inflammasome activation in inflammatory bowel diseases of both mice and humans. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 11, n. 6, p. 737-750, 2017.

LIU, S. P.; DONG, W. G.; WU, D. F.; LUO, H. S.; YU, J. P. Protective effect of angelica sinensis polysaccharide on experimental immunological colon injury in rats. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 9, n. 12, p. 2786, 2003.

MA, L.; HUANG, C.; WANG, X. J.; XIN, D. E.; WANG, L. S.; ZOU, Q. C.; CHATTERJEE, D. Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation. **Molecular cell**, v. 65, n. 2, p. 296-309, 2017.

MAERTEN, P.; SHEN, C.; COLPAERT, S.; LIU, Z.; BULLENS, D. A. M.; VAN ASSCHE, G.; CEUPPENS, J. L. Involvement of interleukin 18 in Crohn's disease: evidence from in vitro analysis of human gut inflammatory cells and from experimental colitis models. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 135, n. 2, p. 310-317, 2004.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS I.; LA-CASA, C. ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical pharmacology**, v. 67, n. 7, p. 1399-1410, 2004.

MASTERS, S.L.; Specific inflammasomes in complex diseases. **Clinical immunology** v.147, n.3, p. 223-228, 2013.

MORRIS, G. P. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 795-803, 1989.

MOTAGHI, E.; HAJHASHEMI, V.; MAHZOUNI, P.; MINAIYAN, M. The effect of memantine on trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. **European journal of pharmacology**, v. 793, p. 28-34, 2016.

MZID, M.; BEN KHEDIR, S.; BEN SALEM, M.; REGAIEG, W.; REBAI, T. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 775-781, 2017.

NARANG, N.; JIRAUNGKOORSKUL, W. Anticancer activity of key lime, *Citrus aurantifolia*. **Pharmacognosy reviews**, v. 10, n. 20, p. 118, 2016.

NYOMBAYIRE, J.; ANZALA, O.; GAZZARD, B.; KARITA, E.; BERGIN, P.; HAYES, P.; FARAH, B. First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of a Replicating Intranasally Administered Sendai HIV-1 Gag Vaccine: Induction of Potent T-cell or Antibody Responses in Prime-Boost Regimens. **The Journal of infectious diseases**, p. jiw500, 2016.

OFICJALSKA, K.; RAVERDEAU, M.; AVIELLO, G.; WADE, S. C.; HICKEY, A.; SHEEHAN, K. M.; CREAGH, E. M. Protective role for caspase-11 during acute

experimental murine colitis. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 3, p. 1252-1260, 2015.

PAPADAKIS, K. A.; TARGAN, S. R. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Annual review of medicine**, v. 51, n. 1, p. 289-298, 2000.

PARK, S.J.; NAKAGAWA, T.; KITAMURA, H.; ATSUMI, T.; KAMON, H.; SAWA, S.; IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. 2005.

PATEL, D. K.; PATEL, K.; KUMAR, R.; GADEWAR, M.; TAHILYANI, V. Pharmacological and analytical aspects of bergenin: a concise report. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 2, p. 163-167, 2012.

PEREIRA, S. R.; PEREIRA, R.; FIGUEIREDO, I.; FREITAS, V.; DINIS, T. C.; ALMEIDA, L. M. Comparison of anti-inflammatory activities of an anthocyanin-rich fraction from Portuguese blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and 5-aminosalicylic acid in a TNBS-induced colitis rat model. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174116, 2017.

RAJ, M. K.; DURAI PANDIYAN, V.; AGUSTIN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of bergenin isolated from *Peltophorum pterocarpum* DC. flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S901-S904, 2012.

RAY, J. P.; MARSHALL, H. D.; LAIDLAW, B. J.; STARON, M. M.; KAECH, S. M.; CRAFT, J. Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 367-377, 2014.

ROSILLO, M. A.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M. An update on dietary phenolic compounds in the prevention and management of rheumatoid arthritis. **Food & function**, v. 7, n. 7, p. 2943-2969, 2016.

ROSILLO, M. A.; SANCHEZ-HIDALGO, M.; CARDENO, A.; DE LA LASTRA, C. A. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 7, p. 737-745, 2011.

SADAR, S. S.; VYAWAHARE, N. S.; BODHANKAR, S. L. Ferulic acid ameliorates TNBS-induced ulcerative colitis through modulation of cytokines, oxidative stress, iNOs, COX-2, and apoptosis in laboratory rats. **EXCLI journal**, v. 15, p. 482, 2016.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; VILLEGAS, I.; APARICIO-SOTO, M.; CÁRDENO, A.; ROSILLO, M. Á.; GONZÁLEZ-BENJUMEA, A.; DE LA LASTRA, C. A. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 513-520, 2015.

SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; VILLEGAS, I.; ROSILLO, M. Á., APARICIO-SOTO, M.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. Dietary squalene supplementation improves DSS-

induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFkB signaling pathways. **Molecular nutrition & food research**, v. 59, n. 2, p. 284-292, 2015.

SIEGMUND, B.; LEHR, H. A.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. IL-1 $\beta$ -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13249-13254, 2001.

SILVEIRA, D. M. D.; FRANCO, F. C. M.; NASCIMENTO, I. L. D. O.; SALOMÃO, M. D. F. L.; ARAÚJO, T. M. D. Pesquisa de interferon gama em tecido periodontal de ratos submetidos à movimentação dentária induzida. 2009.

STASI, M. A.; RUGGIERO, V.; URSILLO, A.; TAURELLI, R.; AGLIANÒ, M., WEBER, E.; CARMINATI, P. Ameliorating effects of the immunomodulator 3-(2-ethylphenyl)-5-(3-methoxyphenyl)-1H-1, 2, 4-triazole in an experimental model of colitis in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 494, n. 2, p. 263-272, 2004.

SU, C. L.; CHEN, M.; ZHANG, P. N.; XU, W.; LIN, J. F. Effects and mechanism of testosterone on the production of inflammatory cytokines and glucose uptake in co-culture of RAW264. 7 macrophage and 3T3-L1 adipocytes. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 96, n. 33, p. 2665-2670, 2016.

SUN, J.; SUN, M. J. Mechanism of alpha-lipoic acid in treating TNBS-induced colitis in mice. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 96, n. 40, p. 3246-3250, 2016.

SUZUKI, R.; KATAKURA, K.; FUJIWARA, T.; GUNJI, N.; WATANABE, H.; OHIRA, H. Imiquimod-induced CCR9 Ameliorates murine TNBS Colitis. **Fukushima journal of medical science**, v. 62, n. 2, p. 90-100, 2016.

ŚWIERKOT, J.; NOWAK, B.; CZARNY, A.; ZACZYŃSKA, E.; SOKOLIK, R.; MADEJ, M., WILAND, P. The Activity of JAK/STAT and NF- $\kappa$ B in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 25, n. 4, p. 709-717, 2016.

TOLGA, Y.; MANSUR, C. A.; SAVAS, G. H.; GULHAN, U. K.; ALPER, P.; ILKNUR, K.; ENDER, S. Plasma viscosity: a potential predictor of both medical treatment response and clinical stage of ulcerative colitis. **Annali italiani di chirurgia**, v. 87, p. 531-543, 2016.

VASILYEVA, E.; ABDULKHAKOV, S.; CHEREPNEV, G.; MARTYNOVA, E.; MAYANSKAYA, I.; VALEEVA, A.; RIZVANOV, A. Serum Cytokine Profiles in Children with Crohn's Disease. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

VASUDEVAN, A.; GIBSON, P. R.; VAN LANGENBERG, D. R. Time to clinical response and remission for therapeutics in inflammatory bowel diseases: What should the clinician expect, what should patients be told?. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 35, p. 6385, 2017.

VELTMAN, D. LAEREMANS, T.; PASSANTE, E.; HUBER, H. J. Signal transduction analysis of the NLRP3-inflammasome pathway after cellular damage and its paracrine regulation. **Journal of theoretical biology**, v. 415, p. 125-136, 2017.

VIGANÒ, E.; MORTELLARO, A. Caspase-11: The driving factor for noncanonical inflammasomes. **European journal of immunology**, v. 43, n. 9, p. 2240-2245, 2013.

WEI, Y.; LU, C.; CHEN, J.; CUI, G.; WANG, L.; YU, T.; UEDE, T. High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 70, 2017.

WILLIAMS, T. M.; LEETH, R. A.; ROTHSCHILD, D. E.; MCDANIEL, D. K.; COUTERMARSH-OTT, S. L.; SIMMONS, A. E.; ALLEN, I. C. Caspase-11 attenuates gastrointestinal inflammation and experimental colitis pathogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 308, n. 2, p. G139-G150, 2015.

ZAKI, M. H.; BOYD, K. L.; VOGEL, P.; KASTAN, M. B.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 379-391, 2010.

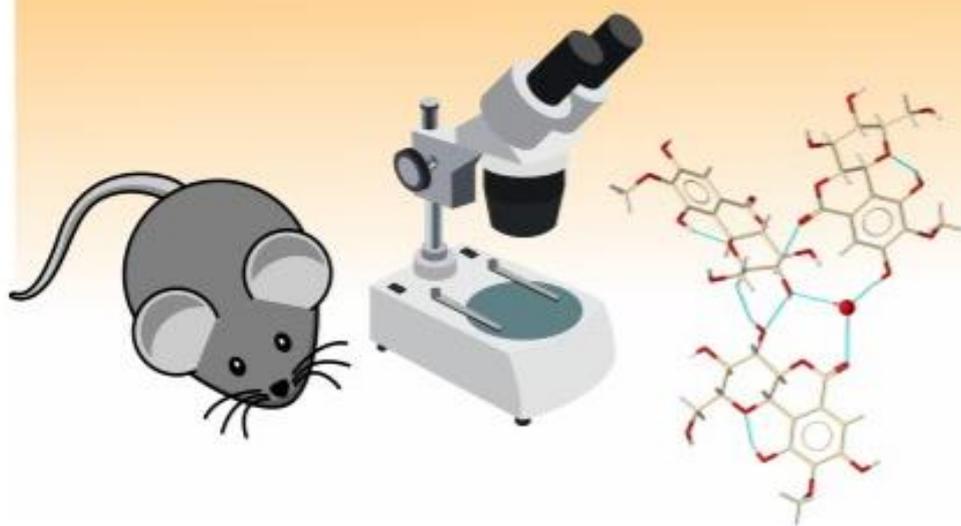
ZHANG, H. X.; LIU, S. J.; TANG, X. L.; DUAN, G. L.; NI, X.; ZHU, X. Y.; WANG, C. N. H<sub>2</sub>S attenuates LPS-induced acute lung injury by reducing oxidative/nitrative stress and inflammation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1603-1612, 2016.

ZHANG, J., FU, S.; SUN, S.; LI, Z.; GUO, B. Inflammasome activation has an important role in the development of spontaneous colitis. **Mucosal immunology**, v. 7, n. 5, p. 1139-1150, 2014.

ZHANG, J.; NISHIMOTO, Y.; TOKUDA, H.; SUZUKI, N.; YASUKAWA, K.; KITDAMRONGTHAM, W.; AKIHISA, T. Cancer chemopreventive effect of bergenin from *Peltophorum pterocarpum* wood. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 10, p. 1866-1875, 2013.

ZHENG, K.; SHEN, H.; JIA, J.; LU, Y.; ZHU, L.; ZHANG, L.; SHEN, Z. Traditional Chinese medicine combination therapy for patients with steroid-dependent ulcerative colitis: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 18, n. 1, p. 8, 2017.

# CONCLUSÃO

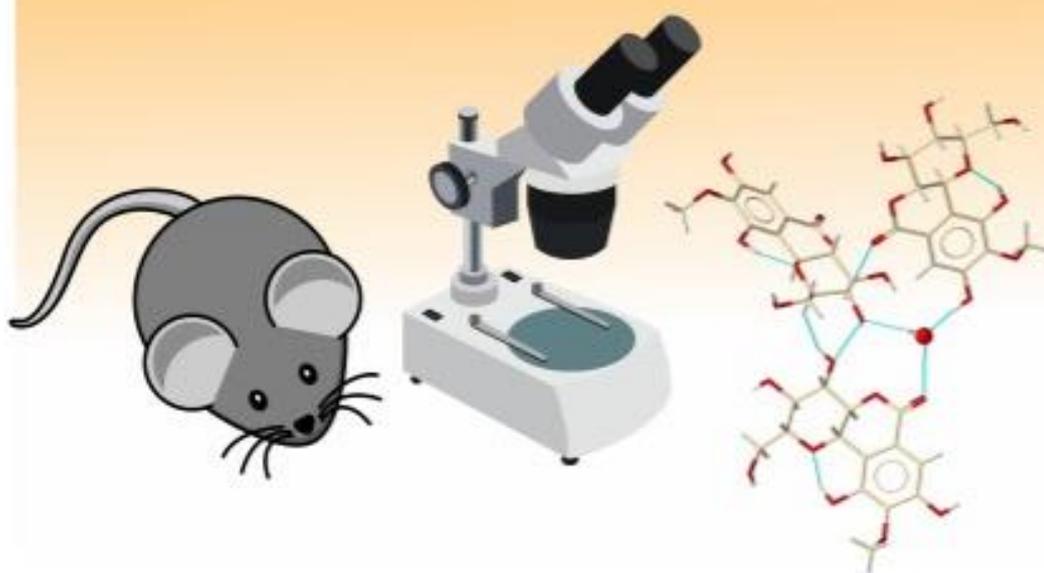


## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que:

- ✓ A bioprospecção da bergenina sobre os aspectos antioxidantes e anti-inflamatórios mostraram que essa substância possui potencial terapêutico em processos inflamatórios que envolvem mediadores inflamatórios;
- ✓ Nos testes antioxidantes observou-se que a bergenina possui grande capacidade antioxidante *in vitro* em modelos biológicos e não biológicos sendo comparado com as propostas de mecanismo de ação, assim, a bergenina pode representar uma nova fonte alternativa dentre as substâncias bioativas, com potencial antioxidante para diversas aplicações nas indústrias de fármacos, cosméticos e alimentos;
- ✓ Nos testes envolvendo o modelo de toxicidade e inflamação em macrófagos peritoneais de camundongos, a bergenina reduziu a expressão da proteína pró-inflamatória iNOS, bem como a produção de NO, também diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL17A e mostrou-se a atuar com mais sensibilidade pela via de sinalização Jak-STAT-3;
- ✓ Por fim, no estudo envolvendo um modelo animal de colite ulcerativa aguda foi possível evidenciar que a administração de bergenina reduziu os danos macroscópicos causados pelo TNBS em ratos, diminuiu a infiltração de neutrófilos no tecido lesado, preservou a mucosa e as glândulas do cólon, diminuiu a expressão de proteínas pró-inflamatórias e os níveis das citocinas envolvidas no processo inflamatório. Também neste experimento foi possível perceber que a bergenina modula as vias de sinalização STAT3 e NF-kB e bloqueia o inflamassoma-NLRP3/ASC pela via canônica e não canônica. Portanto, a bergenina tem potencial para ser aplicada em novas terapias anti-inflamatórias.

# REFERÊNCIAS



## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, D.; GAUTAM, D.; SHARMA, M.; SINGLA, S. K. Bergenin attenuates renal injury by reversing mitochondrial dysfunction in ethylene glycol induced hyperoxaluric rat model. **European journal of pharmacology**, v. 791, n. 2, p. 611-621, 2016.
- AHMED, Z. B.; YOUSFI, M.; VIAENE, J.; DEJAEGHER, B.; DEMEYER, K.; MANGELINGS, D.; VANDER, H. Y. Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from Pistacia atlantica leaf extracts by LC fingerprinting. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 547-556, 2018.
- AL JUHAIMI, F.; MUSA OZCAN, M.; GHAFLOOR, K.; BABIKER, E. E. The effect of microwave roasting on bioactive compounds, antioxidant activity and fatty acid composition of apricot kernel and oils. **Food Chemistry**, v. 243, p. 414-419, 2018.
- APARICIO-SOTO, M.; SANCHEZ, H. M.; CARDENO, A.; LUCENA, J.M.; GONZALEZ, E. F.; CASTILLO, M. J. et al. The phenolic fraction of extra virgin olive oil modulates the activation and the inflammatory response of T cells from patients with systemic lupus erythematosus and healthy donors. **Molecular nutrition & food research**, 2017.
- ARGOLLO, M.; FIORINO, G.; HINDRYCK, P.; PEYRIN, B. L.; DANESE, S. Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. **Journal of Autoimmunity**, 2017.
- AWAAD, A. S.; AL-AONAZI, N. K.; AL-OTHMAN M. R.; ZAIN, M.E.; EL- MELIGY R. M.; EL-SAYED, N. Anticandidal Activity of Extracts and a Novel Compound, Amnomopin, Isolated From *Petriella setifera*. **Phytotherapy research**, 2017.
- BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; REZENDE, L. C.; GUEDES, M. L. S, DAVID, J. P. A C-glucoside benzoic acid derivative from the leaves of *Peltophorum dubium*. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 3, p. 168-170, 2010.
- BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, p. 133-152, 2015.
- BENJAMIN, K. R.; SILVA, I. R.; CHERUBIM, J. O. P.; MCPHEE, D.; PADDON, C. J. Developing Commercial Production of Semi-Synthetic Artemisinin, and of <sup>2</sup>-Farnesene, an Isoprenoid Produced by Fermentation of Brazilian Sugar. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1339-1345, 2016.
- BOLDORI, J.; DENARDIN, C. C.; VASCONCELLOS, M. M.; de ÁVILLA, D. S. Avaliação preliminar do extrato da jabuticaba (*myrciaria cauliflora*) e atividade anti-hiperglicêmica em *caenorhabditis elegans*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2017.

BONFANTI, G.; BITENCOURT, P. E. R.; BONA, K. S. D.; PEROZA, L. R.; CARGNELUTTI, L. O.; BORGES, R. M. et al. Safety assessment and behavioral effects of *Solanum guaraniticum* leaf extract in rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 45-57, 2016.

BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O.; COSTA, R. B. D.; POTT, A.; POTT, V. J.; SCHEIDT, G. N. et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, p. 39-44, 2005.

BURISCH, J.; JESS, T.; MARTINATO M.; LAKATOS, P. L. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 4, p. 322-337, 2013.

CHANG T. H.; HSIEH, F. L.; KO, T. P.; TEMG, K. H.; LIANG, P. H.; WANG, A. H. Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. **The Plant cell**, v. 22, n. 2, p. 454-467, 2010.

COSTA, F. R.; FRANCOZO, M. C.; DE OLIVEIRA, G. G.; IGNACIO, A.; CASTOLDI, A.; ZAMBONI, D. S. et al. Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. **The Journal of experimental medicine**, v. 213, n. 7, p. 1223-1239, 2016.

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. Formação in vitro de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural**, v. 44, p. 314-320, 2014.

DAMASCENO, S. R.; OLIVEIRA, F.R.; CARVALHO, N. S.; BRITO, C. F.; SILVA, I. S.; SOUSA, F. B. et al. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life sciences**, v. 94, n 1, p. 58-66, 2014.

DOS SANTOS, J. E. F.; DOS SANTOS, J. A. A.; DO NASCIMENTO B. R.; DA SILVA S. A. C.; LOPES, D. H. G.; DE OLIVEIRA, N. T. et al. Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras isoladas de secreção vaginal. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 11, n. 3, p. 34-44, 2017.

DUDAREWICZ, M.; RYCHLIK, S. M.; BARANSKA, M.; WOITCZAK, A.; TRZCINSKI, R.; DZIKI, A. et al. Significance of the genetic polymorphism of CYP2D6 and NAT2 in patients with inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 4, p. 686-690, 2014.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

DWIVEDI, V. P.; BHATTACHARYA, D.; YADAV, V.; SINGH, D. K.; KUMAR, S.; SINGH, M. et al. The Phytochemical Bergenin Enhances T Helper 1 Responses and Anti-Mycobacterial Immunity by Activating the MAP Kinase Pathway in Macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 149, 2017.

EL-HAWARY, S. S.; MOHAMMED, R.; ABOUZID, S.; ALI, Z. Y.; ELWEKEEL, A. Anti-arthritic activity of 11-O-(4'-O-methyl galloyl)-bergenin and *Crassula capitella* extract in rats. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 834-844, 2016.

FIGUEIREDO, C. P.; FERREIRA, N. C.; PASSOS, G. F.; COSTA, R. D.; NEVES, F. S.; MACHADO, C. S. C. et al. Toxicological Evaluation of Anti-Scrapie Trimethoxychalcones and Oxadiazoles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 1421-1434, 2015.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. D. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

GIOVANNINI, P.; HOWES, M. J.; EDWARDS, S. E. Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 184, p. 58-71, 2016.

GUIDO, R. V. C.; AANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, L. D. C.; SILVA, H. C. G.; MELO, F. R. G. D.; OLIVEIRA, HD.; BOTREL, M. O.; ESPÍNDOLA, F. Estudo prospectivo de produtos e processos tecnológicos com o acaí (*Euterpe oleracea*). **Caderno de Prospecções**, v. 10, n. 2, p. 215-225, 2017.

HARB, W. J. Crohn's Disease of the Colon, Rectum, and Anus. **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 6, p. 1195-1210, 2015.

HEILMANN, R. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Is inflammatory bowel disease in dogs and cats associated with a Th1 or Th2 polarization? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 168, n. 3, p. 131-134, 2015.

HELLER, F.; FUSS, I. J.; NIEUWENHUIS, E. E.; BLUMBERG, R. S.; STROBER, W. Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis, Is Mediated by IL-13-Producing NK-T Cells. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 629-638, 2002.

HERNÁNDEZ, F. D.; VALOR, L. Protein-kinase Inhibitors: A New Treatment Pathway for Autoimmune and Inflammatory Diseases? **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 12, n. 2, p. 91-99, 2016.

HISTER, C. A. L.; PASQUALLI, M.; TRAPP, K. C.; STEFANELLO, R.; BOLIGON, A. A.; DE CAMPOS, M. M. A. et al. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, 2017.

HUGOT, J. P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CEZARD, J. P.; BELAICHE, J. et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 599-603, 2001.

JACOBO, H. N. J.; JACOBO, H. F. E.; ZENTELLA, D. A.; ANDRADE, C. A.; HEINRICH, M.; PEREZ, P. C. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 179, p. 391-402, 2016.

JACOBS, J. P.; GOUDARZI, M.; SINGH, N.; TONG, M.; MCHARDY, I. H.; RUEGGER, P. et al. A Disease-Associated Microbial and Metabolomics State in Relatives of Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 6, p. 750-766, 2016.

KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Globalisation of inflammatory bowel disease: perspectives from the evolution of inflammatory bowel disease in the UK and China. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 1, n. 4, p. 307-316, 2016.

KIM, M.; CHOI, K. H.; HWANG, S. W.; LEE, Y. B.; PARK, H. J.; BAE, J. M. Inflammatory bowel disease is associated with an increased risk of inflammatory skin diseases: A population-based cross-sectional study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 1, p. 40-48, 2017.

KIRSCHWENG, B.; TÁTRAALJAI, D.; FOLDES, E.; PUKÁNSZKY, B. Natural antioxidants as stabilizers for polymers. **Polymer Degradation and Stability**, 2017.

KMIEC, Z.; CYMAN, M.; SLEBIODA, T. J. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. **Advances in Medical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 1-16, 2017.

LAURIE, S. M.; VAN, J. P. J.; FABER, M.; PHILPOTT, M. F.; LABUSCHAGNE, M. T. Trans- $\beta$ -carotene, selected mineral content and potential nutritional contribution of 12 sweetpotato varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 2, p. 151-159, 2012.

LIM, S. M.; JEONG, J. J.; CHOI, H. S.; CHANG, H. B.; KIM, D. H. Mangiferin corrects the imbalance of Th17/Treg cells in mice with TNBS-induced colitis. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 220-228, 2016.

LU, K. C.; DIETZ, D. W. The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. **Seminars in Colon and Rectal Surgery**, v. 15, n. 3, p. 171-177, 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, Jr. V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADEIRA, L. S.; BORSCHIVER, S.; PEREIRA, N. On the assignment of biopharmaceutical patents. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 80, n. 5, p. 932-943, 2013.

- MAJER, P.; NEUGART, S.; KRUMBEIN, A.; SCHREINER, M.; HIDEG, T. Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 1-9, 2014.
- MALIK, T. A. Inflammatory Bowel Disease. **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 6, p. 1105-1122, 2015.
- MANTOVANI, N.; ROVEDA, M.; TRES, L.; FORTES F. D. O.; GRANDO, M. Cultivo de canfístula (*Peltophorum dubium*) em minijardim clonal e propagação por miniestacas. **Ciência Florestal**, v. 27, p. 225-236, 2017.
- MARELLI, G.; SICA, A.; VANNUCCI, L.; ALLAVENA, P. Inflammation as target in cancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 35, p. 57-65, 2017.
- MARQUES, A. M.; PROVANCE, D. W.; KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO M. R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.
- MARTINEZ, C, A.; MORENO, A.; GÓMEZ, G. M.; CABELLO, M. J.; MARTIN, J.; LOPEZ, N. M. Á. Epistatic interaction between TLR4 and NOD2 in patients with Crohn's Disease: **relation with risk and phenotype in a Spanish cohort**. **Immunobiology**, v. 221, n. 9, p. 927-933, 2016.
- MAY, Z. W. W.; BUTTACHON, S.; DETHOUP, T.; PEREIRA, J, A.; Gales L.; INACIO A. et al. Antibacterial and antibiofilm activities of the metabolites isolated from the culture of the mangrove-derived endophytic fungus *Eurotium chevalieri* KUFA 0006. **Phytochemistry**, v. 141, p. 86-97, 2017.
- MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; DELGADO, M. F.; CORREA, G.T. Aspectos morfo-anatômicos e fisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spr.) Taub. submetida ao alagamento e à aplicação de etrel. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, 1998.
- MOFFAT, J. G.; VINCENT, F.; LEE, J. A.; EDER, J.; PRUNOTTO, M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. **Nature reviews drug discovery**, 2017.
- MOODIE, L. W.; TREPOS, R.; CERVIN, G.; LARSEN, L.; LARSEN, D. S.; PAVIA, H. et al. Probing the Structure-Activity Relationship of the Natural Antifouling Agent Polygodial against both Micro- and Macrofoulers by Semisynthetic Modification. **Journal of natural products**, v. 80, n. 2, p. 515-525, 2017.
- MOREIRA, C. I. R.; OLIVEIRA, D. M. T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 193-207, 2006.
- MOURA, F. A.; GOULART, M. O. F. Chapter 7 - Inflammatory Bowel Diseases: The Crosslink Between Risk Factors and Antioxidant Therapy A2 - Gracia-Sancho, Jordi. In: Salvadó J (ed). **Gastrointestinal Tissue**. **Academic Press**, p. 99-112, 2017.

MU, L.-H.; FENG, J.-Q.; LIU, P. A new bergenin derivative from the rhizome of *Ardisia gigantifolia*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 14, p. 1242-1245, 2012.

MUGGE, F. L. B.; PAULA, S. J.; MELO, J.C.; BRANDÃO, M. G. L. Native plant species with economic value from Minas Gerais and Goiás: a discussion on the currentness of the data recovered by the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 455-462, 2016.

MUSZYNSKA, B.; GRZYWACZ-KISIELEWSKA, A.; KALA, K.; GDULA-ARGASINSKA, J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*, v. 243, p. 373-381, 2018.

NASCIMENTO JUNIOR, B. J.; SANTOS, A. M. T.; SOUZA, A. T.; SANTOS, E. O.; XAVIER, M. R.; MENDES, R. L. et al. Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 423-432, 2016.

NEWMAN, D. J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 402-414, 2017.

NG, S. C. Epidemiology of inflammatory bowel disease: Focus on Asia. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2014.

NIKOLIC, M.; GLAMOCLIIJA, J.; FERREIRA, I.C.F.R.; CALHELHA, R.C.; FERNANDES, A.; MARKOVIC, T.; MARKOVIC, D.; GIWELI, A.; SOKOVIC, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 183–190, 2014.

OLIVEIRA, G. A. L.; OLIVEIRA, G. L. S.; JÚNIOR, L. M. R.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; FREITAS R. M. Cell toxicity and hemolytic potential of an isolated molecule from *Peltophorum dubium* (Spreng). **Toxicology Letters**, v. 238, n. 2, s. 192, 2015.

OLIVER, J.; RUEDA, B.; LÓPEZ, NEVOT, M. A.; GÓMEZ, G. M.; MARTÍN, J. Replication of an Association Between IL23R Gene Polymorphism With Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 8, p. 977-981 e 972, 2007.

OZ, M.; LOZON, Y.; SULTAN, A.; YANG, K. H.; GALADARI, S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 83-97, 2015.

PAN, R. H.; HE, H. M.; DAI, Y.; XIA, Y. F. Comparative pharmacokinetics of bergenin, a main active constituent of *Saxifraga stolonifera* Curt., in normal and hepatic injury rats after oral administration. **Chinese journal of natural medicines**, v. 14, n. 10, p. 776-782, 2016.

PATIL, D. T.; MOSS, A. C.; ODZE, R. D. Role of Histologic Inflammation in the Natural History of Ulcerative Colitis. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 26, n 4, p. 629-640, 2016.

PAZUCH, F. A.; NOGUEIRA, C. E. C.; SOUZA, S. N. M.; MICUANSKI, V. C.; FRIEDRICH, L.; LENZ, A. M. Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 34-42, 2017.

PETERS, C. P.; MJOSBERG, J. M.; BERNINK, J. H.; SPITS, H. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. **Immunology Letters**, v. 172, p. 124-131, 2016.

PEYRIN, B. L.; CHRISTOPHER, R.; BEHAH, D.; LASSEN, C. Modulation of sphingosine-1-phosphate in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 16, n. 5, p. 495-503, 2017.

PILONI, N.E.; FERMANDEZ, V.; VIDELA, L.A.; PUNTARULO, S. Acute iron overload and oxidative stress in brain. **Toxicology**, v. 314, p. 174-182, 2013.

RAY, C.; SAGAR, P. Management of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Surgery (Oxford)**, 2017.

RIBEIRO, S. R.; ANDRADE, M.; MADELLA, D.; MARTINAZZO, A. P.; AQUINO, G. M. L.; MELO, N. R. et al. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 154-169, 2017.

RODNICK, K. J.; HOLMAN, R. W.; ROPSKI, P. S.; HUANG, M.; SWISLOCKI, A. L. M. A Perspective on Reagent Diversity and Non-covalent Binding of Reactive Carbonyl Species (RCS) and Effector Reagents in Non-enzymatic Glycation (NEG): Mechanistic Considerations and Implications for Future Research. **Frontiers in chemistry**, v. 5, p. 39, 2017.

RODRIGUES, M. M. L. G.; MACHADO, F. M. D. G.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1621, n. 2, p. 170-182, 2003.

RODRIGUES, W. Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. **Interações (Campo Grande)**, v. 17, p. 267-277, 2016.  
ROGLER, G. Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 7, p. 521-530, 2017.

ROSEN, M. J.; KARNS, R.; VALLANCE, J. E.; BEZOLD, R.; WADDELL, A.; COLLINS, M. H. et al. Mucosal Expression of Type 2 and Type 17 Immune Response Genes Distinguishes Ulcerative Colitis From Colon-Only Crohn's Disease in Treatment-Naive Pediatric Patients. **Gastroenterology**, v. 152, n. 6, p. 1345-1357.e1347, 2017.

SANG, Z.; PAN, W.; WANG, K.; MA, Q.; YU, L.; YANG, Y. et al. Design, synthesis and evaluation of novel ferulic acid-O-alkylamine derivatives as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 130, p. 379-392, 2017.

SANTOS, S. C. D. D.; BARBOSA, L. E. R. Crohn's disease: risk factor for colorectal cancer. **Journal of Coloproctology**, v. 37, n. 1, p. 55-62, 2017.

SHARMA, A.; KASHYAP, D.; SAK, K.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 7. n. 1, p. 15-32, 2018.

SHEEHAN, D.; SHANAHAN, F. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 1, p. 143-154, 2017.

SIEGMUND, B. Cytomegalovirus infection associated with inflammatory bowel disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 5, p. 369-376, 2017.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62 (6 Suppl), p. 1315S-1321S, 1995.

SILVA, G. H.; JOSÉ, A. C.; FARIA, J. M. R.; PEREIRA, W. V. S. Aspects of *Peltophorum dubium* Sprengel (Taubert) seeds in an aerial seed bank. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 32-40, 2017.

SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R.; SILVA, I. S.; SILVA, V. G.; BRITO, C. F.; TTEIXEIRA, A. E. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-biological interactions**, v. 229, p. 55-63, 2015.

SINGH, U.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I. Reactions of hydroxyl radical with bergenin, a natural poly phenol studied by pulse radiolysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 6008-6014, 2009.

SINGH, V. P.; PROCTOR, S. D.; WLLING, B, P. Koch's postulates, microbial dysbiosis and inflammatory bowel disease. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 7, p. 594-599, 2016.

SOUSA, I.J.O; ARAÚJO, S.; NEGREIROS, P.S.; FRANÇA, A.R.S.; ROSA, G.S.; NEGREIROS, F.S.; GONÇALVES, R.L.G. A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde. **Revista Uningá**, vol.31, n.1, p.35-39, 2017.

SPECA, S.; DUBUQUOY, L. Chronic bowel inflammation and inflammatory joint disease: Pathophysiology. **Joint Bone Spine**, v. 84, n.4, p. 417-420, 2017.

STAPPENBECK, T. S.; MCGGVERN, D. P. B. Paneth Cell Alterations in the Development and Phenotype of Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 322-326, 2017.

- STEELS, E.; STEELE, M. L.; HAROLD, M.; COULSON, S.; Efficacy of a Proprietary *Trigonella foenum-graecum* L. De-Husked Seed Extract in Reducing Menopausal Symptoms in Otherwise Healthy Women: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. **Phytotherapy research: PTR**, 2017.
- SUN, M. Y.; LIN, J. N. Relationship between NR1H2 polymorphisms and inflammatory bowel disease risk: A systematic review and meta-analysis. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 41, n. 2, p. 230-239, 2017.
- TADIC, V.; ARSIC, L.; ZVEZDANOVIC, J.; ZUGIC, A.; CVETKOVIC, D.; PAVKOV, S. The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application. **Journal of ethnopharmacology**, v. 199, p. 138-148, 2017.
- TENÓRIO, M.; MELLO, G. A.; VIANA, A. Políticas de fomento à ciência, tecnologia e inovação em saúde no Brasil e o lugar da pesquisa clínica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 1441-1454, 2017.
- TERÁN, E. L. Cardiovascular Risk of Cyclooxygenase Selective Inhibitors. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 4, n. 3, p. 107-114, 2008.
- TIGRE, P. B.; NASCIMENTO, C. V. M. F. D.; COSTA, L. S. Windows of opportunities and technological innovation in the Brazilian pharmaceutical industry. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, 2016.
- TORRES, J.; MEHANDRU, S.; COLOMBEL, J. F.; PEYRIN, B. L. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1741-1755, 2017.
- TSOUH, F. P. V.; NYARKO, A. K.; APPIAH, O. R.; TCHOKOUAHA, Y. L. R.; ADDO, P.; Asante IK, et al. Ethnopharmacological reports on anti-Buruli ulcer medicinal plants in three West African countries. **Journal of ethnopharmacology**, v.172, p. 297-311, 2015.
- UDDEN, S. M. N.; PENG, L.; GAN, J. L.; SHELTON, J. M.; MALTER, J. S.; HOOPER, L. V. et al. NOD2 Suppresses Colorectal Tumorigenesis via Downregulation of the TLR Pathways. **Cell Reports**, v. 19 n.13, p. 2756-2770, 2017.
- UNGARO, R.; MEHANDRU, S.; ALLEN, P. B.; PEYRIN, B. L.; COLOMBEL, J. F. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1756-1770, 2017.
- VICTOR, M.M. Organic chemistry in Brazil: its contribution in the total synthesis of natural products since the Brazilian Chemical Society Foundation. **Química nova**, vol. 40, n. 6, p. 701-705, 2017.
- WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; FREITAG, R. A.; MEIRELES, M. C. A. et al. Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, p. 991-999, 2016.

WANG H.; GU, J.; HOU, X.; CHEN J.; YANG N.; LIU Y. et al. Anti-inflammatory effect of miltirone on inflammatory bowel disease via TLR4/NF- $\kappa$ B/IQGAP2 signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 531-540, 2017.

WIN, N. N.; NGWE, H.; ABE L.; MORITA, H. Naturally occurring Vpr inhibitors from medicinal plants of Myanmar. **Journal of natural medicines**, 2017.

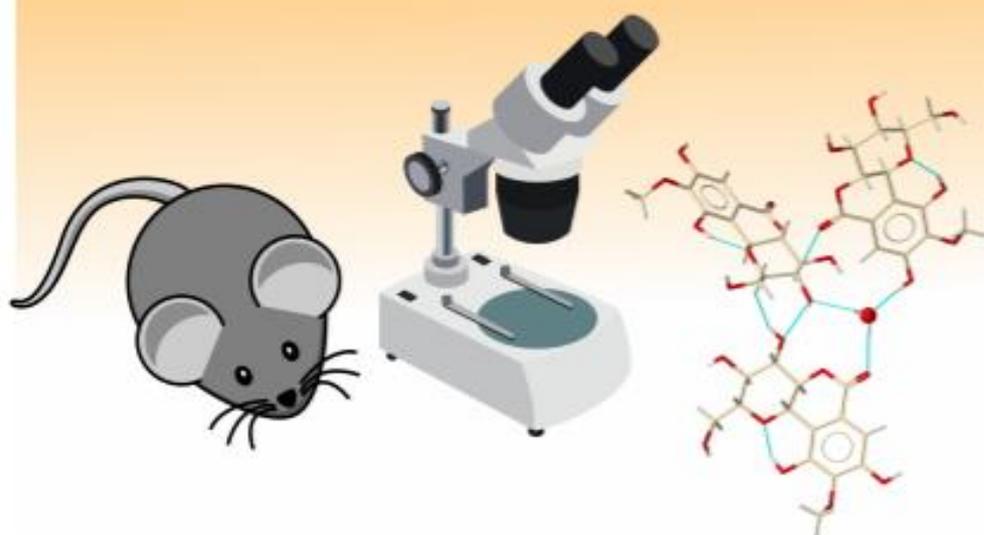
WLODARCZYK, M.; SOBOLEWSKA, W. A.; STEC, M. K.; FICHNA, J.; WISNIEWSKA, J. M. The influence of family pattern abnormalities in the early stages of life on the course of inflammatory bowel diseases. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 852-858, 2016.

YADAV, P.; ELLINGHAUS, D.; RÉMY, G.; FREITAG, W. S.; CESARO, A.; DEGENHARDT, F. et al. Genetic Factors Interact With Tobacco Smoke to Modify Risk for Inflammatory Bowel Disease in Humans and Mice. **Gastroenterology**, v. 153, n. 2, p. 550-565, 2017.

YADAV, V.; VARUM, F.; BRAVO, R.; FURRER, E.; BOJIC, D.; BASIT, A. W. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. **Translational Research**, v. 176, p. 38-68, 2016.

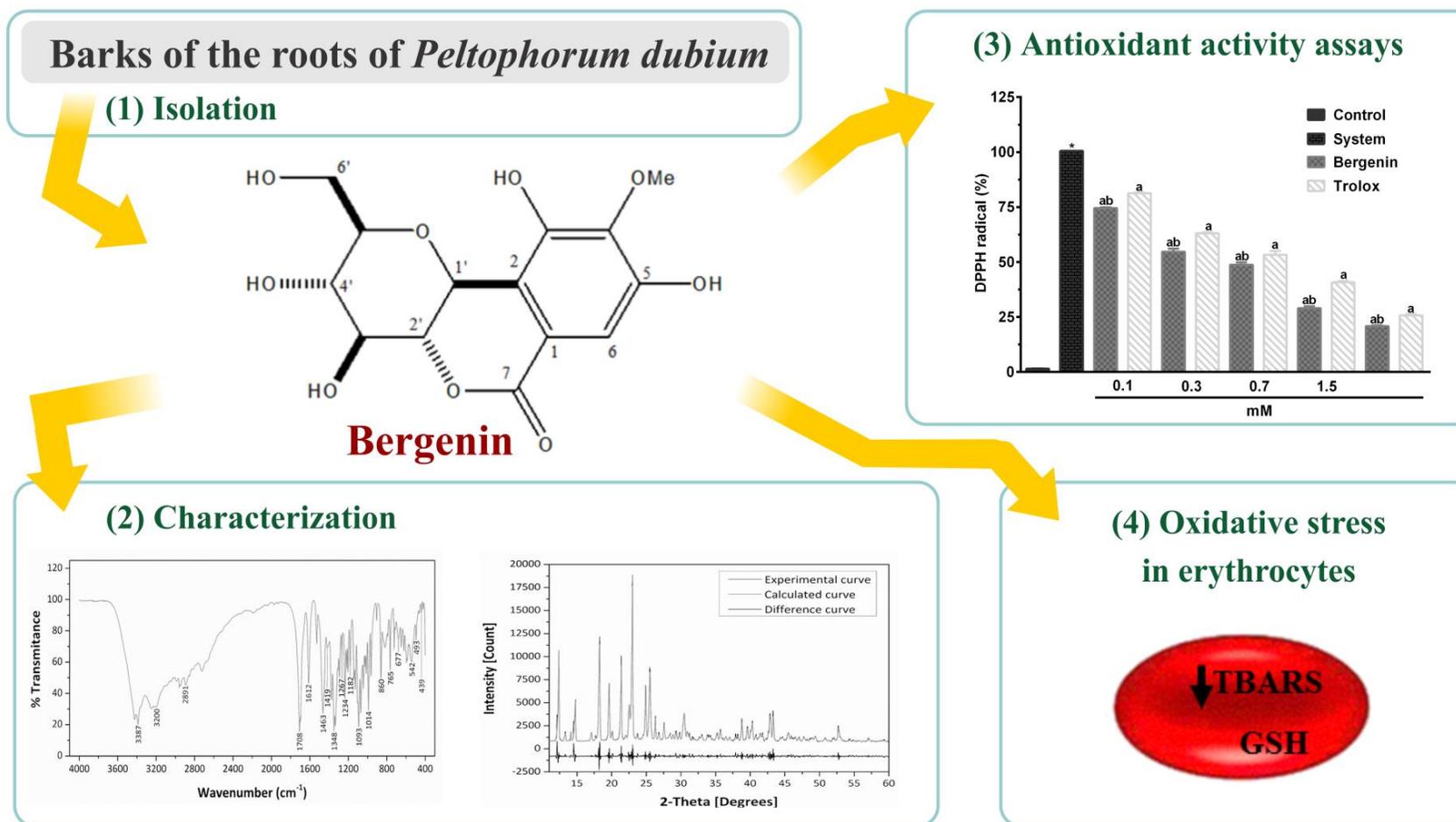
ZAMARRUD; ALI, I.; HUSSAIN, H.; AHMAD, V. U.; QAISER, M.; AMYN, A.; MOHAMMAD, F. V. Two new antioxidant bergenin derivatives from the stem of *Rivea hypocrateriformis*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 722-725, 2011.

# APÊNDICES

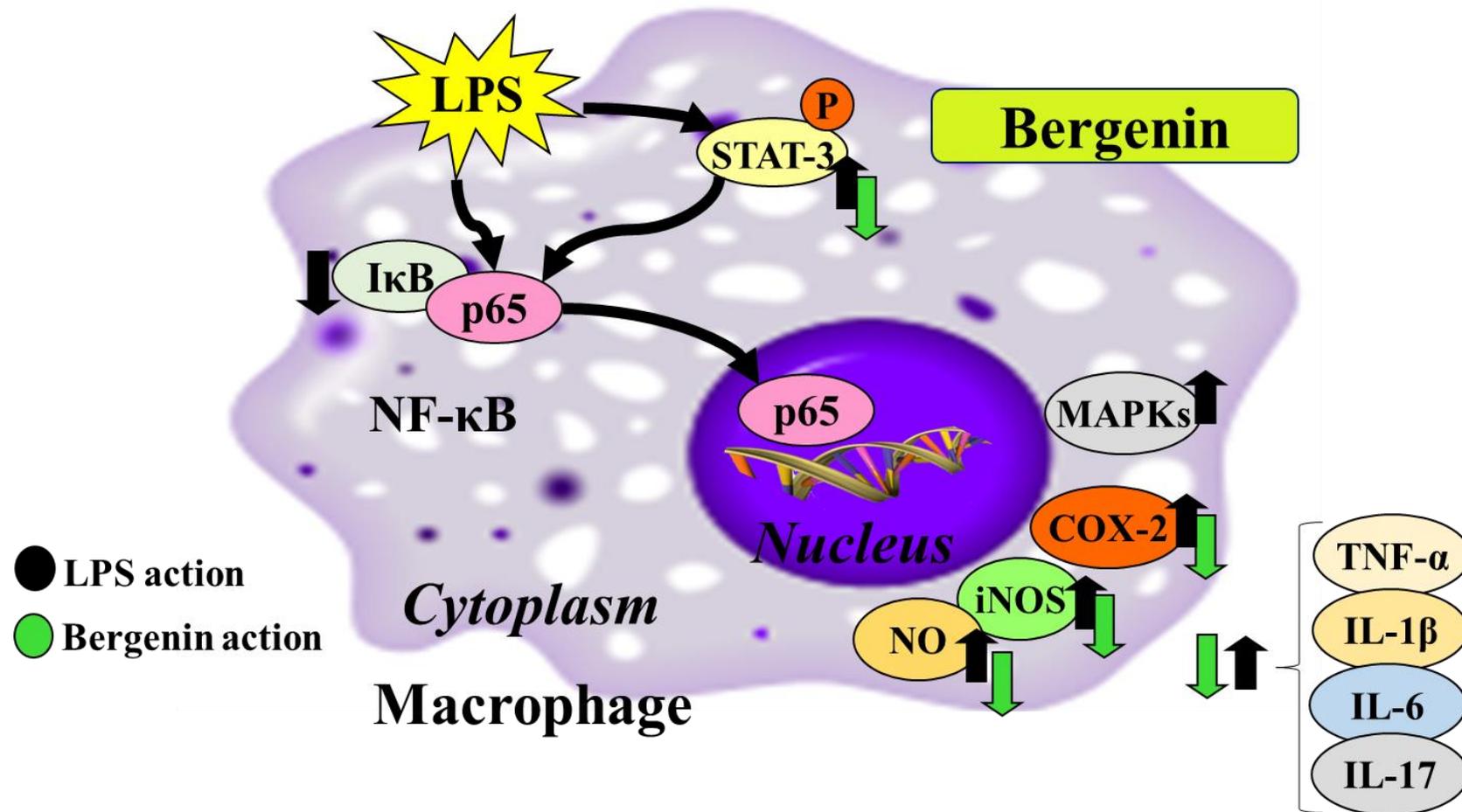


## APÊNDICES

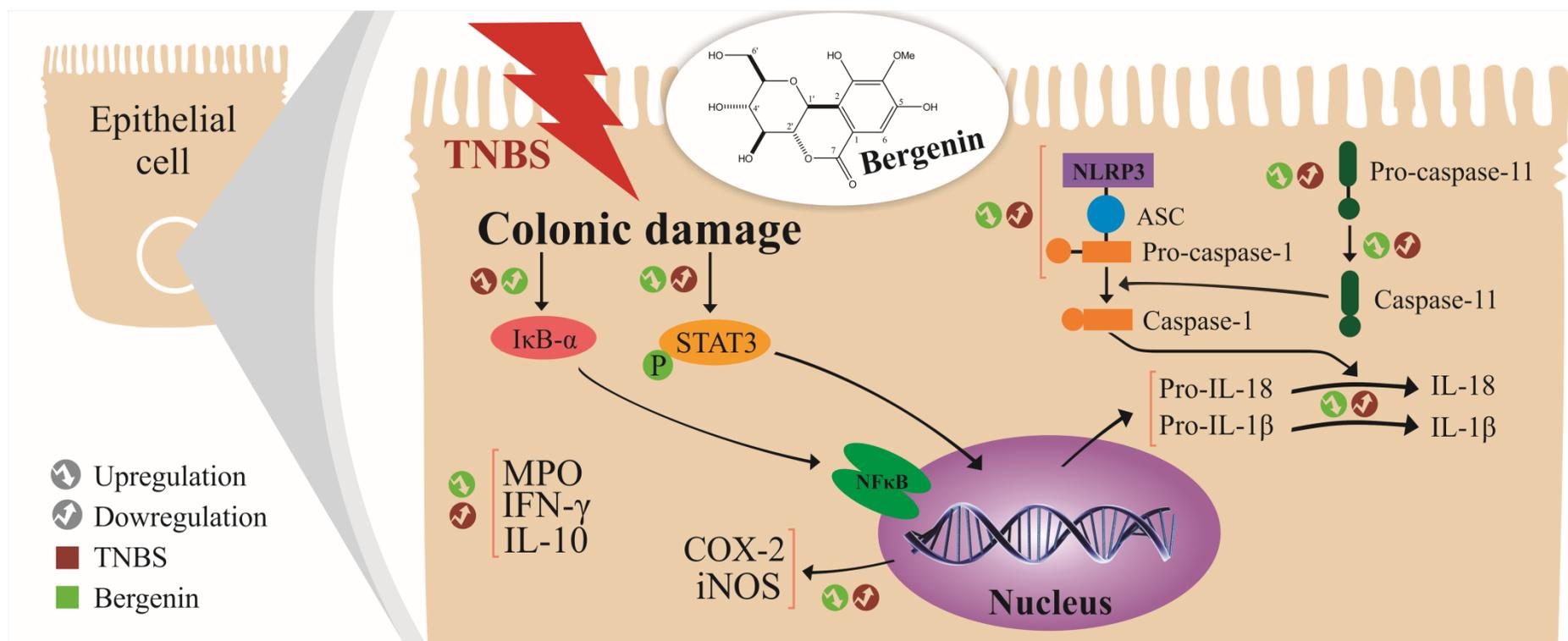
APÊNDICE A: Graphical abstract dos resultados do artigo "Bergenin from *Peltophorum dubium*: Isolation, Characterization, and Antioxidant Activities in Non-Biological Systems and Erythrocytes" publicado no periódico *Medicinal Chemistry*.



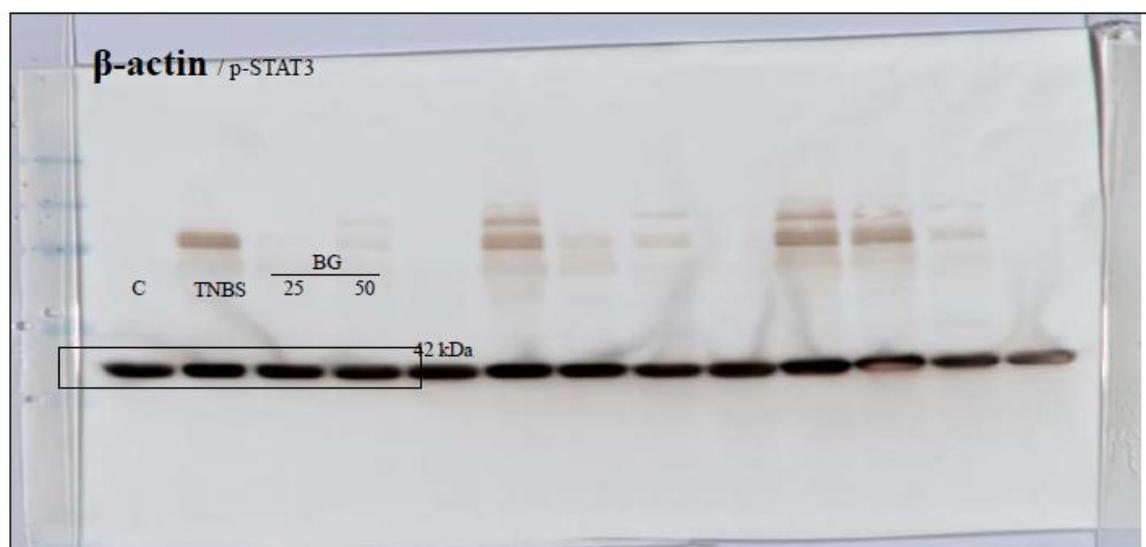
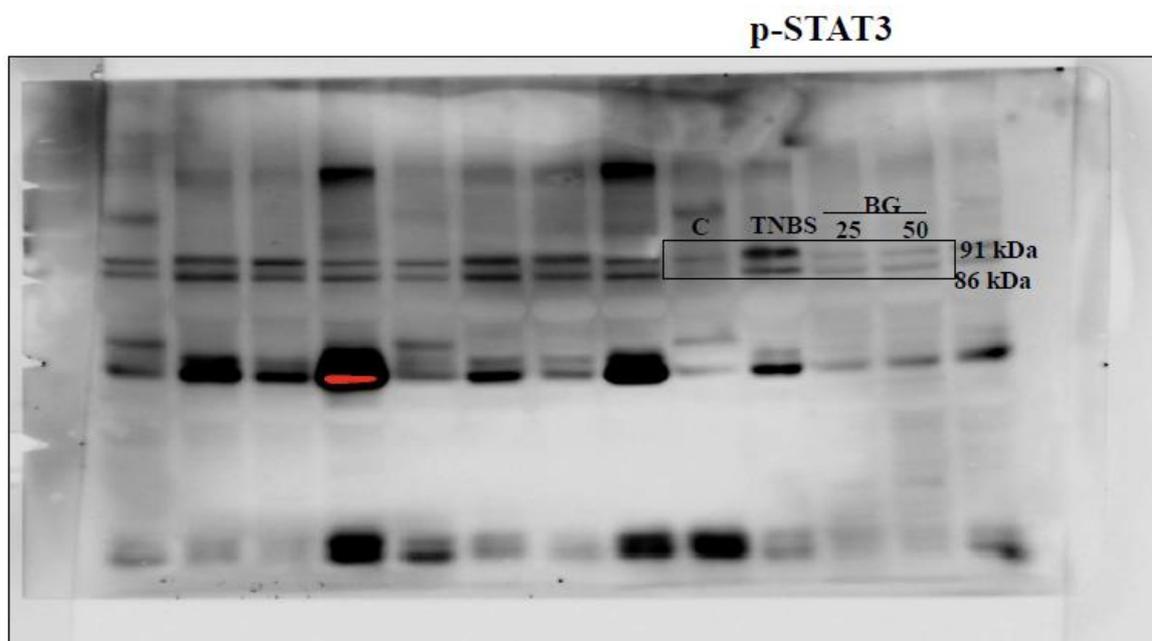
APÊNDICE B: Graphical abstract dos resultados do artigo "Bergenin from *Peltophorum dubium* downregulate inflammatory responses in LPS-activated murine peritoneal macrophages suppressing STAT3 signalling pathways" Submetido no periódico *International immunopharmacology*. Fator de Impacto: 2.956. Qualis CAPES B1 para Biotecnologia.

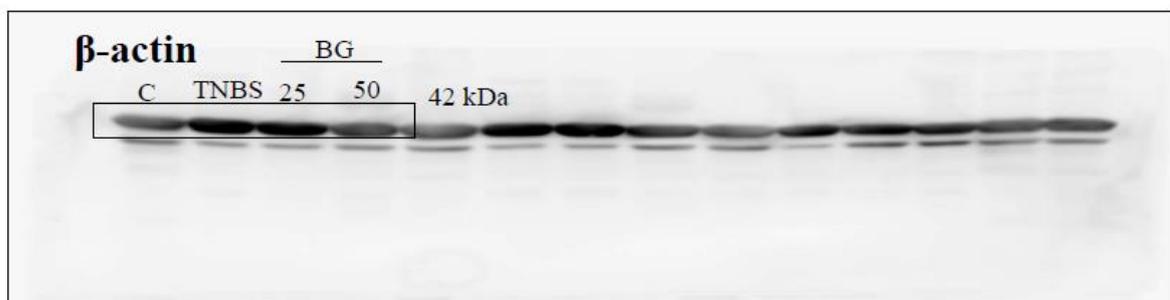
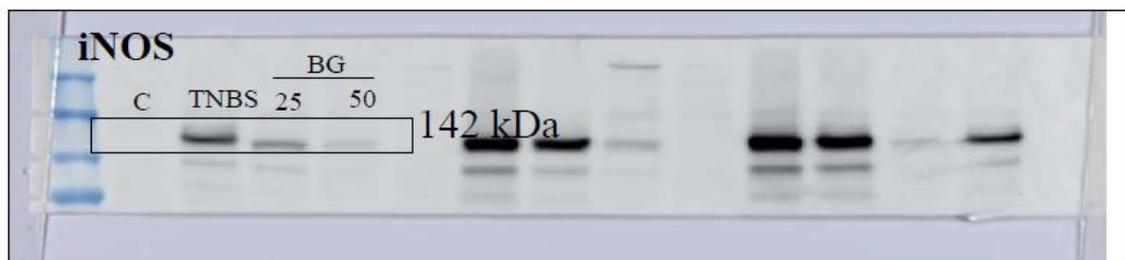
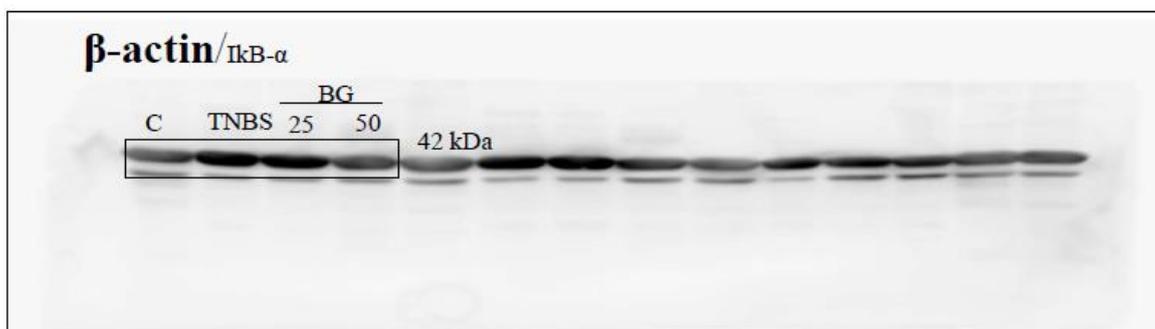
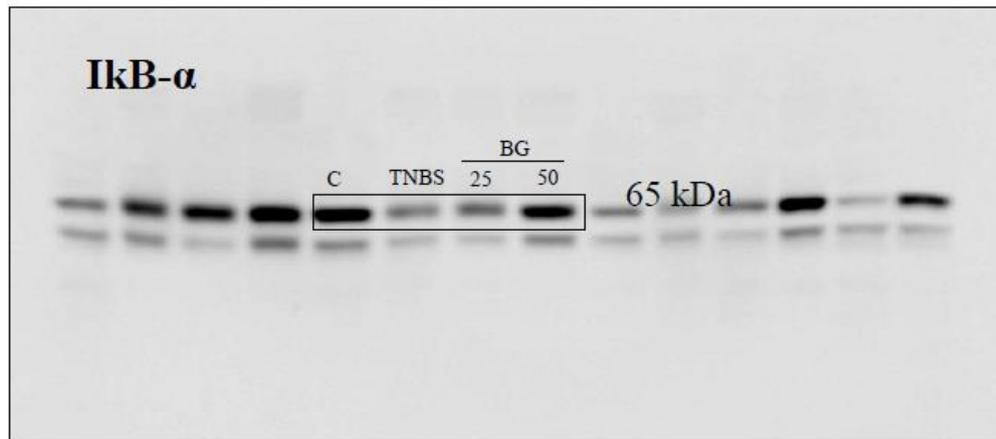


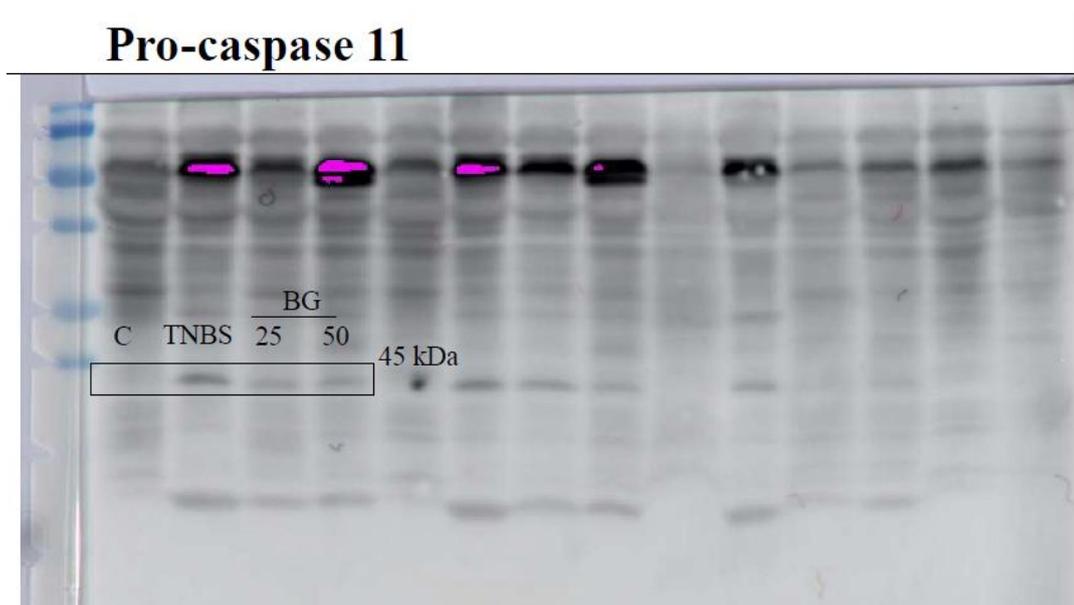
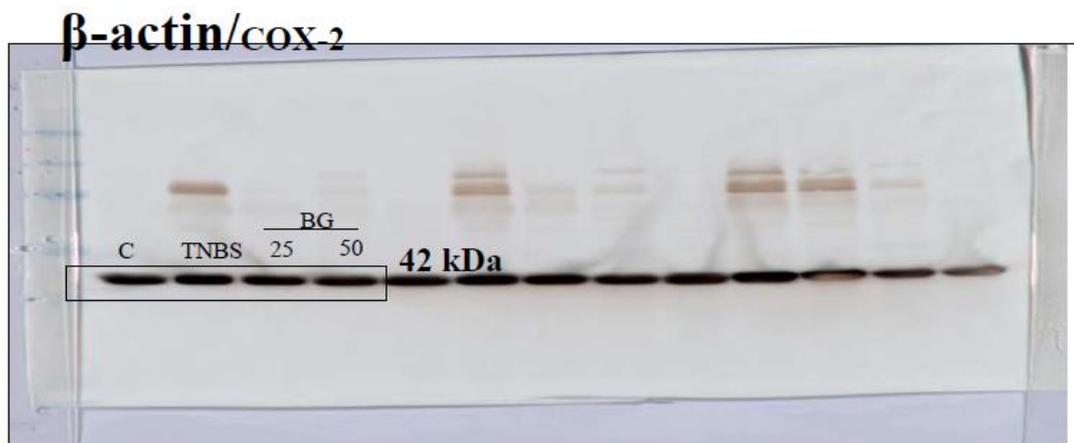
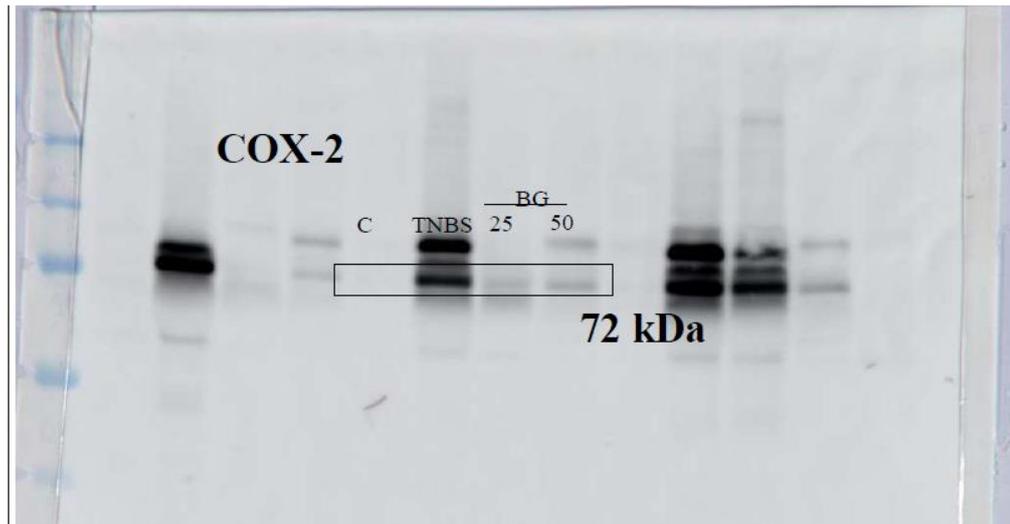
APÊNDICE C: Graphical abstract dos resultados do artigo "Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats by inhibiting inflammatory mediators and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways". Submetido no periódico *Biochemical Pharmacology*. Fator de Impacto: 4.581. Qualis CAPES A1 para Biotecnologia.



APÊNDICE D: Material suplementar do artigo “Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats by inhibiting inflammatory mediators and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways”. Submetido no periódico *Biochemical Pharmacology*. Fator de Impacto: 4.581. Qualis CAPES A1 para Biotecnologia.

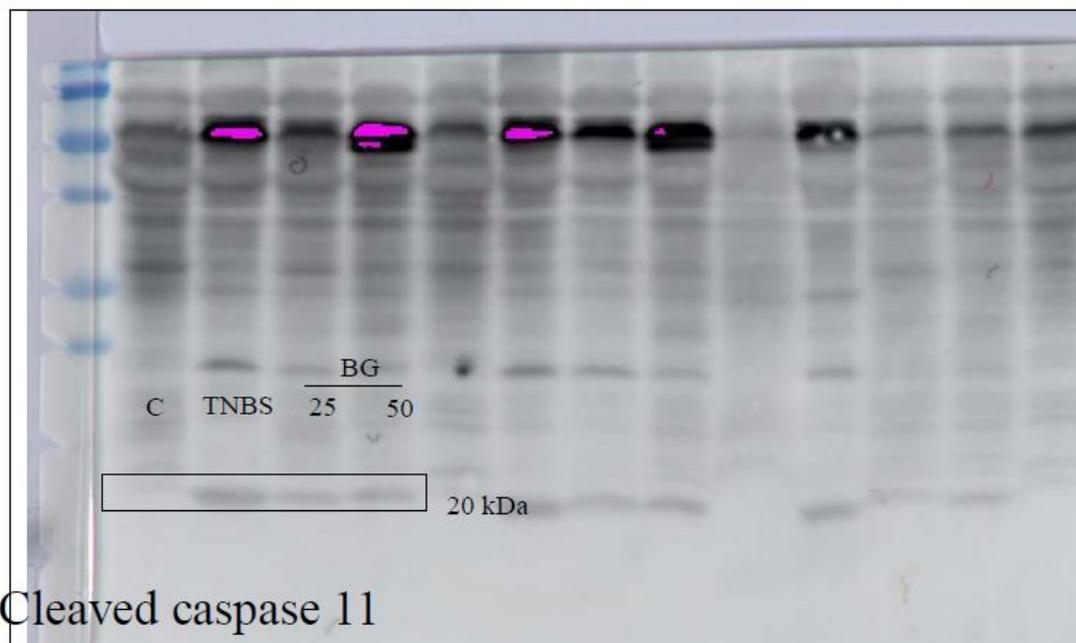






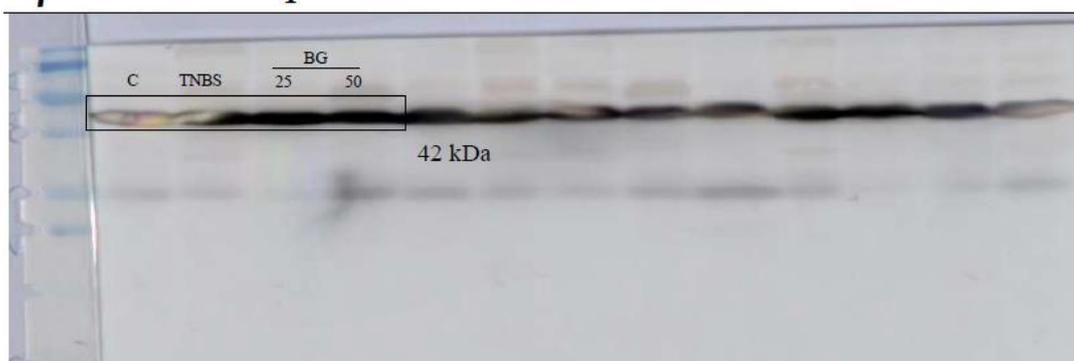


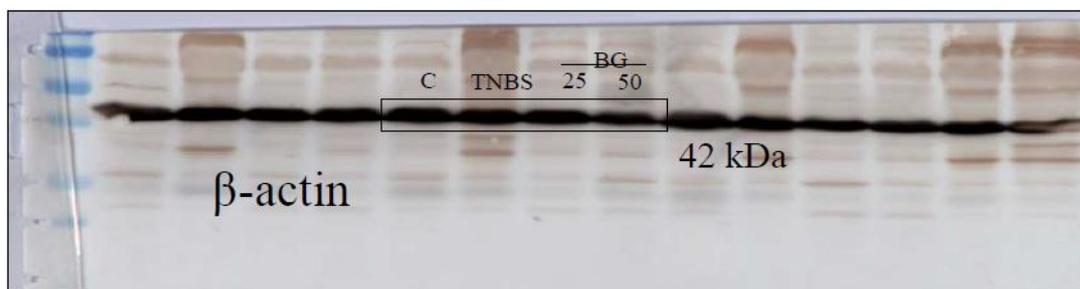
Partially cleaved caspase 11

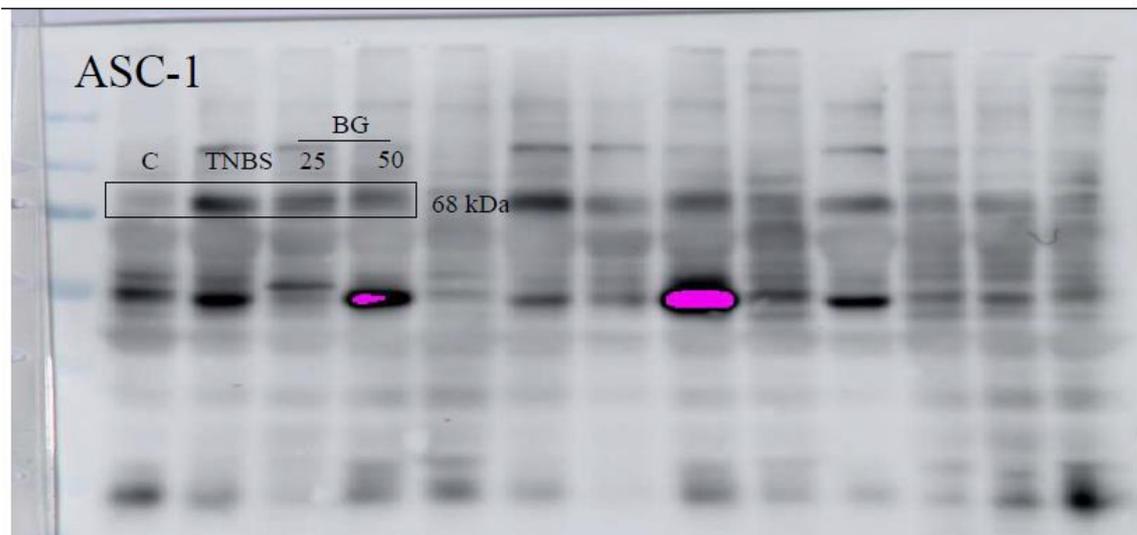
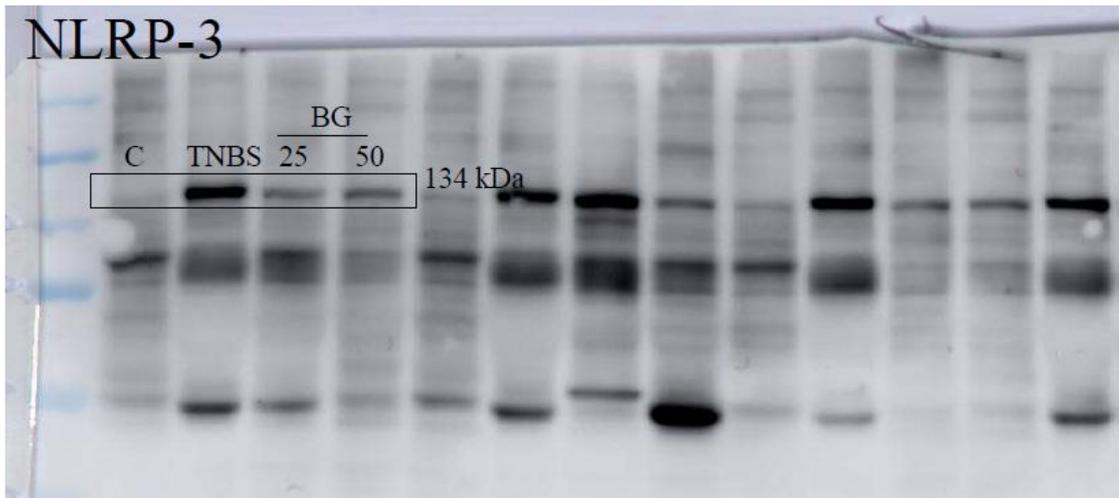


Cleaved caspase 11

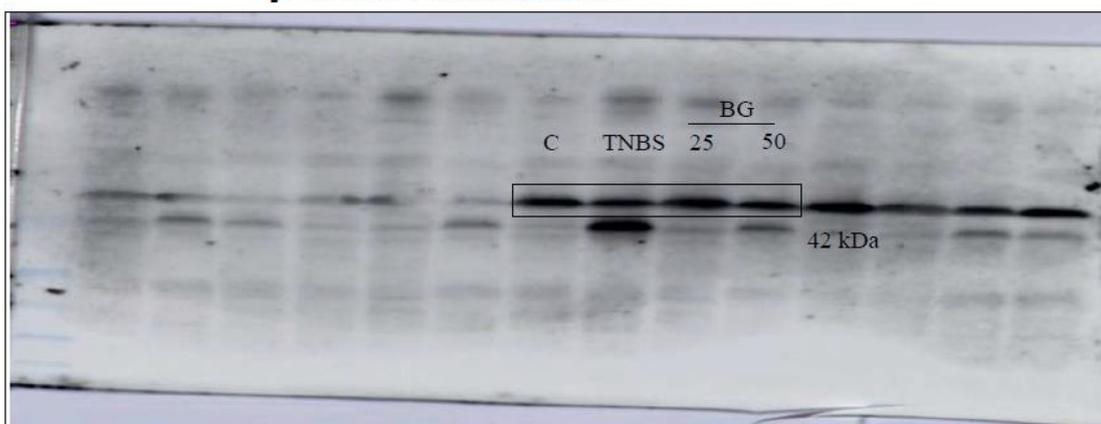
$\beta$ -actin/caspase 11

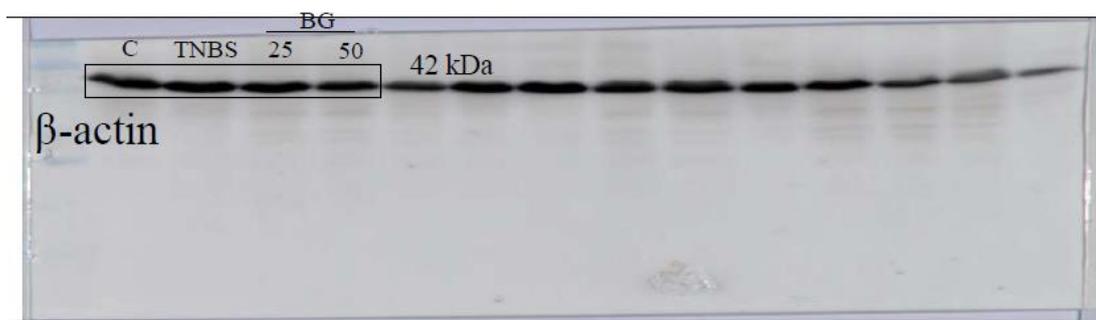
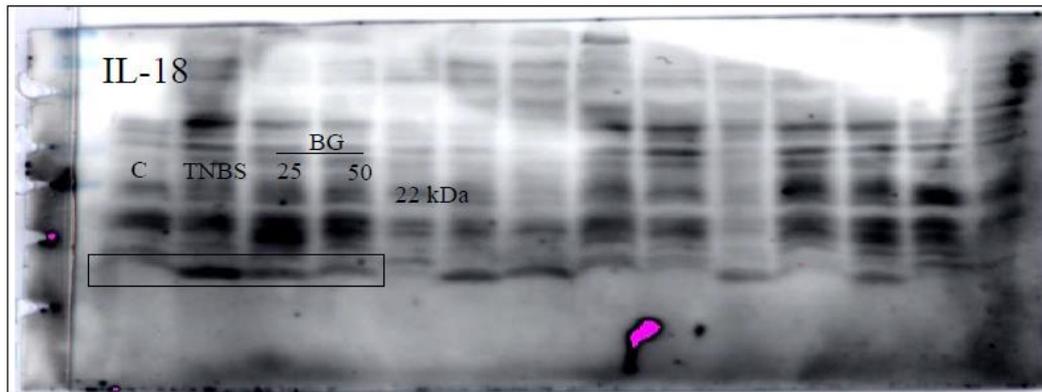




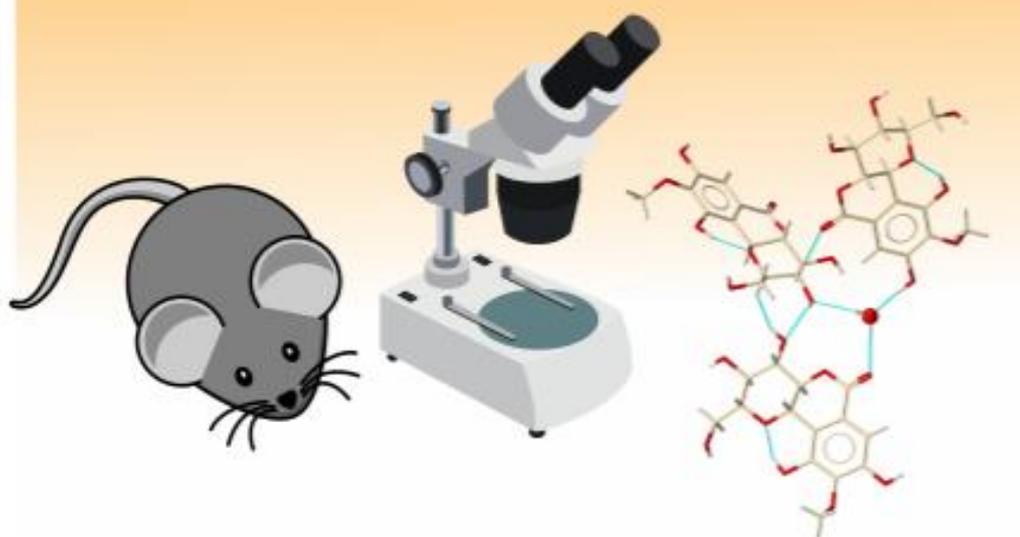


**$\beta$ -actin / NLRP3 and ASC**





# ANEXOS



## ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de publicação de artigo científico oriundo da tese no periódico *Medicinal Chemistry* (ISSN: **1573-4064**; FI: 2.331; Qualis B1 em Biotecnologia).

NCBI Resources  How To

PubMed.gov  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed

Advanced

Format: Abstract

Send to

[Med Chem](#), 2017 Mar 6. doi: 10.2174/1573406413666170306120152. [Epub ahead of print]

## Bergenin from *Peltophorum dubium*: Isolation, Characterization, and Antioxidant Activities in Non-Biological Systems and Erythrocytes.

[de Oliveira GA](#)<sup>1</sup>, [da Silva Oliveira GL](#)<sup>1</sup>, [Nicolau LA](#)<sup>2</sup>, [Mafud AC](#)<sup>3</sup>, [Batista LF](#)<sup>3</sup>, [Mascarenhas YP](#)<sup>3</sup>, [de Sousa LK](#), [David JM](#)<sup>4</sup>, [Pinto LS](#)<sup>4</sup>, [Alves CQ](#)<sup>4</sup>, [Medeiros JV](#)<sup>1</sup>.

[Author information](#)

### Abstract

**BACKGROUND:** Bergenin, a compound derived from gallic acid, is a secondary metabolite of the plant *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.

**OBJECTIVE:** In this study, we aimed to characterize the ability of bergenin to eliminate the radicals in non-biological systems.

**METHODS:** We evaluated bergenin is ability to protect erythrocytes from oxidative damage in a biological system. We have elucidated bergenin structure using nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. We then evaluated its antioxidant capacity in vitro against DPPH•, ABTS•+, hydroxyl radicals, and nitric oxide, and determined its ability to transfer electrons owing to its reduction potential and ability to chelate iron. We also evaluated its protective capacity against oxidative damage produced by AAPH in erythrocytes, its hemolytic properties, its ability to inhibit hemolysis, and its ability to maintain intracellular reduced glutathione homeostasis.

**RESULTS:** Bergenin concentrations between 0.1 and 3mM significantly ( $p < 0.05$ ) and dose dependently decreased formation of ABTS•+, DPPH•, nitrite ions, OH•, reduced formation ferricyanide, ferrozine-Fe<sup>2+</sup> complex, inhibited AAPH-induced oxidative hemolysis of erythrocytes, raised GSH levels in the presence of AAPH, inhibited AAPH-induced lipid peroxidation in erythrocytes.

**CONCLUSION:** Bergenin may represent a novel alternative antioxidant, with potential applications in various industries, including drugs, cosmetics, and foods.

Copyright© Bentham Science Publishers; For any queries, please email at [epub@benthamscience.org](mailto:epub@benthamscience.org).

ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo científico oriundo da tese no periódico **International immunopharmacology**. Fator de Impacto: 2.956. Qualis CAPES B1 para Biotecnologia.

Elsevier Editorial System(tm) for  
International Immunopharmacology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Bergenin from *Peltophorum dubium* downregulates inflammatory response in LPS-activated murine peritoneal macrophages suppressing STAT3 signalling pathway

Article Type: Full length article

Keywords: Bergenin; inflammation; LPS-stimulated macrophages; STAT3; TNF.

Corresponding Author: Dr. Jand Rolim Medeiros, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Piauí

First Author: Guilherme Oliveira

Order of Authors: Guilherme Oliveira; Catalina Alarcón-de-la-Lastra; María Ángeles Rosillo; María Luisa Martínez; Isabel Villegas; Jand Rolim Medeiros, Ph.D.; Marina Sánchez-Hidalgo

Abstract: Background: The bergenin is a major active constituent of *Bergenia* genus and exerts a large range of pharmacological properties. The natural immunity or innate is the first protection system of the body against injury or pathogens, macrophages are the main components of this system and are closely related to phagocytic cells and play a key role throughout the inflammation and its resolution produce cytokines and chemokines that release signals and attract other cells to act on the resolution of the inflammatory process. Objective: the objective of this study was to determine the effect of bergenin inflammation demonstrated in peritoneal macrophages from mice stimulated by LPS and describe the action mechanism involved. Methods: Nitrite production was analysed by the Griess method. In addition, iNOS expression, MAPK family activation, I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation were determined by Western blot. In addition, proinflammatory cytokines production were evaluated by ELISA. Results: Our results revealed that bergenin was capable to down-regulate, iNOS and nitrites. Similarly, bergenin reduced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-17A production in LPS-treated murine peritoneal macrophages which was related to an inhibition on STAT3 signaling pathway. Conclusion: Our study has provided evidence that bergenin administration could play an important role in the anti-inflammatory effect of natural products and probably provide an attractive complement in management of inflammatory diseases.

## ANEXO C – Comprovante de submissão de artigo científico oriundo da tese no periódico

1/8/2018

E-mail de Universidade Federal do Piauí - Submission Confirmation for Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats by inhibiting inflammatory mediators and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways



Jand-Venes Rolim Medeiros &lt;jandvenes@ufpi.edu.br&gt;

---

**Submission Confirmation for Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats by inhibiting inflammatory mediators and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways**


---

**Biochemical Pharmacology** <eeserver@eesmail.elsevier.com>  
 Responder a: Biochemical Pharmacology <BP@kumc.edu>  
 Para: jandvenes@ufpi.edu.br

8 de janeiro de 2018 15:52

Dear Dr. Medeiros,

This is to confirm your manuscript files have been submitted to the editorial office via the on-line system. You will receive further correspondence within the next few days.

Thank you for choosing Biochemical Pharmacology.

Kind regards,

Lynn LeCount  
 Managing Editor  
 Biochemical Pharmacology Editorial Office

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/appanswers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO D – Comprovante de publicação de resumo científico oriundo da tese no periódico Toxicology Letters (ISSN: 0378-4274; FI: 3.858; Qualis A1 em Biotecnologia).



P07-057

## Cell toxicity and hemolytic potential of an isolated molecule from *Peltophorum dubium* (Spreng)

G. Antonio Lopes de Oliveira <sup>1,✉</sup>, G. Layson da Silva Oliveira <sup>1</sup>, L.M. Rezende Júnior <sup>1</sup>, J. Pereira de Lima David <sup>2</sup>, J. Mauricio David <sup>2</sup>, R. Mendes de Freitas <sup>1</sup>

■ [Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.555>

[Get rights and content](#)

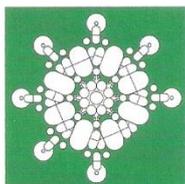
**Introduction:** The GB12 is a molecule isolated from roots of the tree *Peltophorum dubium* (Spreng). Considering the potential of GB12 as a precursor of new therapies in medicine, this work shows *in vitro* toxicity results obtained from the GB12.

**Methodology:** Hemolytic Capacity 300  $\mu$ L of erythrocyte suspension 10% (ES) were mixed with 500  $\mu$ L of GB12 (0.1, 0.3, 0.7, 1.5 or 3 mM) and incubated at 37 °C/2 h. Then, the samples were centrifuged and the absorbances of the supernatants were measured at 540 nm. Triton X-100 (0.1–3 mM) as positive control. Inhibition of hemolysis induced by AAPH The GB12 (0.1–3 mM) was mixed with 300  $\mu$ L of ES, then it was added 500  $\mu$ L of AAPH (200 mM in PBS, pH 7.4). The solutions were incubated at 37 °C/2 h. Then, it was added 2400  $\mu$ L of PBS, centrifuged and the rates of hemolysis were determined in the supernatants at 540 nm. The Trolox (0.1–3 mM) as positive control. Determination of levels of glutathione in erythrocytes it was induced lysis in ES. Then, it was added trichloroacetic acid centrifuged and to the supernatant was added 100  $\mu$ L of DTNB. The supernatant was measured at 412 nm.

**Results:** Hemolytic Capacity The rate of hemolysis was less than 5% even at the highest concentration of GB12, significant ( $p < 0.05$ ) compared to the Triton X-100, which showed 100% of hemolysis relative to controls ( $p < 0.05$ ) at all concentrations. Inhibition of hemolysis induced by AAPH At concentrations tested, the values obtained were  $42.93 \pm 0.84$ ,  $62.67 \pm 0.14$ ,  $86.68 \pm 0.08$ ,  $93.60 \pm 0.24$  and  $95.31 \pm 0.56\%$ , in which the GB12 reduced hemolysis when compared to AAPH ( $p < 0.05$ ). It was same to Trolox against the AAPH ( $p < 0.05$ ), with  $40.72 \pm 0.53$ ,  $59.85 \pm 0.71$ ,  $84.62 \pm 0.57$   $91.72 \pm 0.13$  and  $94.87 \pm 0.25\%$  of antioxidant capacity, respectively. The EC50 value was  $0.16 \pm 0.01$  mM for the GB12 and  $0.19 \pm 0.02$  mM for Trolox. Determination of levels of glutathione in erythrocytes. The result of GSH in control was  $18.41 \pm 0.51$   $\mu$ mol/g hemoglobin after addition of AAPH. In the samples of GB12, the GSH levels were  $31.09 \pm 0.04$ ,  $36.95 \pm 0.54$ ,  $40.64 \pm 0.58$ ,  $46.45 \pm 0.09$  and  $46.74 \pm 0.15$   $\mu$ mol/g hemoglobin. The depletion was inhibited ( $p < 0.05$ ) compared to AAPH. The Trolox increased GSH levels ( $p < 0.05$ ) compared to AAPH  $30.19 \pm 0.08$ ,  $34.87 \pm 0.13$ ,  $39.28 \pm 0.15$ ,  $45.00 \pm 0.12$  and  $45.89 \pm 0.24$   $\mu$ mol/g hemoglobin.

**Conclusion:** The GB12 showed no toxicity at the concentrations tested in this study.

ANEXO E – Comprovante de apresentação oral de resumo científico oriundo da tese durante a VII Reunião de Jovens Farmacologistas de Andaluzia - Granada – Espanha



MARÍA DEL PILAR UTRILLA NAVARRO, PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, COMO MIEMBRO DEL COMITÉ ORGANIZADOR DE LA VII REUNIÓN DE JÓVENES FARMACÓLOGOS DE ANDALUCÍA,

CERTIFICA QUE LOS AUTORES:

**G. A. Lopes de Oliveira, M. Sánchez-Hidalgo, M.A. Rosillo, G. L. da Silva Oliveira, R. Mendes de Freitas, C. Alarcón de la Lastra**

HAN PRESENTADO LA COMUNICACIÓN ORAL TITULADA:

*GB12, an isocoumarin isolated from Peltophorumdubiumdownregulates the inflammatory response in LPS-activated murine peritoneal macrophages*

EN LA VII REUNIÓN DE JÓVENES FARMACÓLOGOS DE ANDALUCÍA, CELEBRADA EN GRANADA EL DÍA 3 DE JULIO DE 2015.

Y PARA QUE ASÍ CONSTE A LOS EFECTOS OPORTUNOS, FIRMO EL PRESENTE CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN.

En Granada a 3 de Julio de 2015

Prof. Mª Pilar Utrilla Navarro

ANEXO F – Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o 36º Congresso da Sociedade Espanhola de Farmacologia – Valência - Espanha

**36 CONGRESO**  
**SOCIEDAD ESPAÑOLA**  
**DE FARMACOLOGÍA**

Comunicación C059

Valencia, 18 de Septiembre de 2015

Por la presente certificamos que la comunicación con título:

**GB12, AN ISOLATED MOLECULE FROM PELTHOPHURUM DUBIUM,  
DOWNREGULATES LPS-INDUCED INFLAMMATORY RESPONSE THROUGH  
STAT3 INHIBITION IN CULTURED MURINE PERITONEAL MACROPHAGES**

de los autores:

**G. A Lopes de Oliveira; M. Sánchez-Hidalgo; M.A. Rosillo; G. L. da Silva  
Oliveira; J. M. David; R. Mendes de Freitas; C. Alarcón de la Lastra**

ha sido presentada como **Comunicación en Formato CARTEL** durante el **36 Congreso de la Sociedad Española de Farmacología**, que se ha celebrado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia los días 16, 17 y 18 de Septiembre de 2015.

Y para que conste donde convenga, firmamos la presente en fecha y lugar arriba indicados.

 **CLAU EVENTS S.L.**  
B-98417256  
Edificio GDG Center  
Avda. Reyes Católicos, 60  
46950 Alfafar (Valencia)

Secretaría Técnica  
CLAVE CONGRESOS

ANEXO G – Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas – Teresina - PI

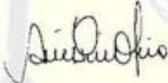


## I SIMPÓSIO NORDESTINO DE RECURSOS NATURAIS E POTENCIALIDADES TERAPÊUTICAS

### CERTIFICADO

Certifico que o resumo expandido intitulado “Avaliação da atividade sequestradora de radicais não biológicos por um derivado do ácido gálico isolado de *Peltophorum dubium*” de autoria de **Luís Mário Rezende Júnior, Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, George Layson da Silva Oliveira, Jorge Maurício David, Rivelilson Mendes de Freitas** foi apresentado na modalidade **Banner** no I Simpósio Nordestino de Recursos Naturais e Potencialidades Terapêuticas, realizado no período de 17 a 19 de junho de 2015.

Teresina, 19 de junho de 2015.



Profa. Dra. Aldeida Pereira de Oliveira  
Presidente do I RENAPTE

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ANEXO H – Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas – Teresina - PI

*Certificado*

 **II EECF**  
Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas

**II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas**  
**II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos**

 I Simposio Internacional de Farmácia Clínica

Certificamos que **OLIVEIRA, G. A. L., OLIVEIRA, G. L. S., DAVID, J. P. L., DAVID, J. M., FREITAS, R. M.** apresentaram o trabalho **"POTENCIAL CITOTÓXICO DA MOLÉCULA #GB12 ISOLADA DE *Peltophorum dubium* (Spreng) EM ERITRÓCITOS"** na sessão painel durante o II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simposio Internacional de Farmácia Clínica, realizado no período de 9 a 11 de abril de 2015, no Blue Tree Towers Rio Poty na cidade de Teresina, Piauí, Brasil.

Teresina, Piauí, 11 de abril de 2015.

*Rivellson Mendes de Freitas*  
Prof. Dr. Rivellson Mendes de Freitas  
Coordenador Geral

*Lívio César Cunha Nunes*  
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes  
Sub-coordenador Geral

*Hélvis Rocha e Silva*  
Profa. Dra. Hélvis Rocha e Silva  
Coordenadora Comissão Científica



**Patrocinadores:** 

**Apoio Institucional:** 

**Co-organizadores:** 

ANEXO I – Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o IV Congresso Meio-Norte de Medicina Laboratorial - Teresina - PI



IV Congresso Meio-Norte de Medicina Laboratorial

III Feira de Tecnologia, Produtos e Equipamentos Laboratoriais

I Encontro em Ciências Farmacêuticas

I Encontro de Gestão e Qualidade Laboratorial

### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "Avaliação da toxicidade de uma molécula isolada da *Peltophorum dubium* (Spreng) no teste de letalidade em *Artemia salina*" de autoria de GUILHERME ANTÔNIO LOPES DE OLIVEIRA, SABRYNA BRENA CUNHA FONTELE, THALYS RIBEIRO DE SOUZA LEITE, ALDENORA MARIA XIMENES RODRIGUES, GEORGE LAYLSON DA SILVA OLIVEIRA, JUCENI PEREIRA DE LIMA DAVID, CLAYTON QUEIROZ ALVES, LARISSA SANTOS PINTO, JORGE MAURÍCIO DAVID, RIVELILSON MENDES DE FREITAS foi apresentado no IV Congresso Meio-Norte de Medicina Laboratorial, realizado no período de 30 de outubro a 01 de novembro de 2014, na categoria oral.

Teresina-PI, 01 de Novembro de 2014

*Rivelilson Mendes de Freitas*  
Presidente do IV Congresso MEDLAB  
Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

  
Presidente do GPI Cursos  
João Jafilson da Silva Sousa

---

REALIZAÇÃO

ANEXO J – Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o V Congresso Meio-Norte de Medicina Laboratorial - Teresina - PI

## V Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial

### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado Perfil toxicológico de camundongos tratados com bergenina, aporte para o delineamento de novos fármacos de autoria de Gabriella Pacheco, Bacharelado em Biomedicina UFPI; Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) UFPI; Kerolayne de Melo Nogueira, Licenciatura em Biologia UFPI; Bruno Íles, Licenciatura em Biologia UFPI; Ana Patrícia de Oliveira, Pós-Graduação em Biotecnologia (BIOTEC) UFPI; Francisca Beatriz de Melo Sousa, Pós Graduação em Ciências Biomédicas UFPI; Thiago de Souza Lopes Araújo, Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) UFPI; Luan Kelves Miranda de Souza, Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) UFPI; Ana Carolina Machado Leócido, Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) UFPI; Jand Venes Rolim Medeiros, Licenciatura em Biologia UFPI foi apresentado na Modalidade Oral do V Congresso Norte-Nordeste de Medicina Laboratorial, realizado no período de 24 a 26 de novembro de 2016, no Centro de Convenções Atlantic City, Teresina, Piauí.

Teresina-PI, 26 de novembro de 2016.



Amanda Torres Nunes  
Presidente do V MEDLAB



Antonio Carlos Mendes de Moura  
Coordenador Científico do GPI Cursos



ANEXO K – Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o I Simpósio Nacional em Inflamação Gastrointestinal - Fortaleza - CE

**I SIMPÓSIO NACIONAL  
EM INFLAMAÇÃO GASTROINTESTINAL**

08 à 09 de Julho de 2017 - Fortaleza, Ceará - Brasil

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho: **EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA BERGENINA, UM DERIVADO DO ÁCIDO GÁLICO, NA COLITE ULCERATIVA AGUDA INDUZIDA POR TNBS.** de autoria de **Leticia de Sousa Chaves; Catalina Alarcón de La Lastra ; Guilherme Antônio Lopes de Oliveira ; Isabel Villegas ; Maria Ángeles Rosillo ; Maria Luisa Castejon Martinez ; Marina Sánchez-Hidalgo ; Jand Venes Rolim Medeiros.** foi apresentado como Poster no I Simpósio Nacional em Inflamação Gastrointestinal, realizado de 08 à 09 de Julho de 2017 em Fortaleza, CE.

*Antoniella S. G. Duarte*  
**Antoniella S. G. Duarte**  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Morfofuncionais - UFC

*Emmanuel Prata de Souza*  
**Emmanuel Prata de Souza**  
Chefe do Departamento de  
Morfologia - UFC

*Pedro Marcos G. Soares*  
**Pedro Marcos G. Soares**  
Presidente do I Simpósio Nacional  
em Inflamação Gastrointestinal

ANEXO L – Comprovante de premiação de melhor trabalho apresentado durante o I Simpósio Nacional em Inflamação Gastrointestinal - Fortaleza - CE

**I SIMPÓSIO NACIONAL  
EM INFLAMAÇÃO GASTROINTESTINAL**

08 à 09 de Julho de 2017 - Fortaleza, Ceará - Brasil

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho intitulado “Efeito anti-inflamatório da berberina, um derivado do ácido gálico, na colite ulcerativa aguda induzida por TNBS.” sob a autoria de **Letícia de Souza Chaves**, recebeu o **Prêmio de Honra ao Mérito na Sessão de Pôsteres** do I Simpósio Nacional em Inflamação Gastrointestinal

Fortaleza, 09 de julho de 2017.

*Antoniella S. G. Duarte*  
**Antoniella S. G. Duarte**  
Coordenador(a) do Programa de Pós- Graduação  
em Ciências Morfofuncionais - UFC

*Emmanuel Prata de Souza*  
**Emmanuel Prata de Souza**  
Chefe do Departamento de  
Morfologia - UFC

*Pedro Marcos G. Soares*  
**Pedro Marcos G. Soares**  
Presidente do I Simpósio Nacional  
em Inflamação Gastrointestinal

ANEXO M - Comprovante de apresentação em pôster de resumo científico oriundo da tese durante o 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics



49<sup>th</sup> Brazilian Congress  
of Pharmacology and  
Experimental Therapeutics

# CERTIFICATE

We certify that the poster **"EFFECTS OF BERGENIN TRATAMENT ON THE ACTIVATION OF INFLAMMATORY MEDIATORS ON TNBS-INDUCED ACUTE COLITIS"** by *Oliveira GAL, Chaves LS, Sousa FBM, Pacheco G, Rosillo MAR, Martinez MLC, Hidalgo MS, Villegas I, Medeiros JVR, Lastra CA* was presented at the 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), held in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, from October 17 to 20, 2017.



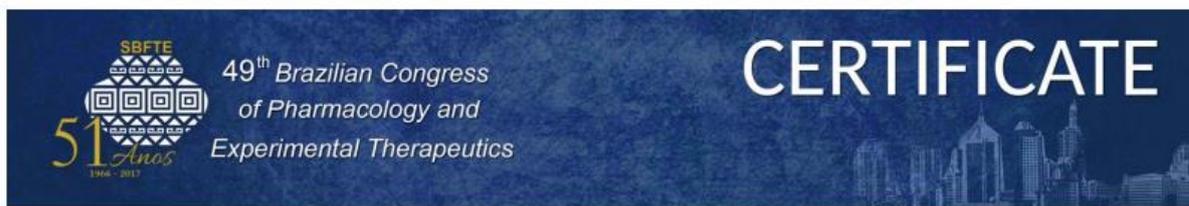
Maria Christina W. Avellar  
Congress President

17-20 October, 2017  
Centro de Convenções

Ribeirão Preto, SP, Brazil



ANEXO N – Comprovante de menção honrosa pela apresentação de resumo oriundo da tese no 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics



We certify that **Letícia Chaves** received Honorable Mention for the poster **PT 9.012**: Oliveira GAL, Chaves LS, Sousa FBM, Pacheco G, Rosillo MAR, Martinez MLC, Hidalgo MS, Villegas I, Medeiros JVR, Lastra CA. "**EFFECTS OF BERGENIN TRATAMENT ON THE ACTIVATION OF INFLAMMATORY MEDIATORS ON TNBS-INDUCED ACUTE COLITIS**", at the 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE) held in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, from October 17 to 20, 2017.

Maria Christina W. Avellar  
Congress President

17-20 October, 2017  
Centro de Convenções

Ribeirão Preto, SP, Brazil



ANEXO O - Certificado de aprovação de projeto intitulado "**Bioprospecção do derivado do ácido gálico bergenia com ênfase nas propriedades antioxidantes, antinociceptivas e anti-inflamatórias**" junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o nº de protocolo 220/16.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_ e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

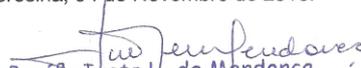


#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Bioprospecção do derivado do ácido gálico bergenia com ênfase nas propriedades antioxidantes, antinociceptiva e anti-inflamatórias**", registrada nº 220/16, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS- Farmacologia\_ Campus Ministro Reis Veloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **04/11/2016**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Novembro/ 2016 à Dezembro/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de Animais	164
Peso/ Idade	25-30g/ 2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCA/UFPI

Teresina, 04 de Novembro de 2016.

  
Prof.<sup>a</sup> Ivete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

ANEXO P - Certificado de aprovação de projeto intitulado "**Inovação tecnológica em doenças negligenciadas: planejamento, síntese e avaliação pré-clínica para o tratamento de esquistossomose**" junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o nº de protocolo 023/14.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 30 de Maio de 2014.

Ilmo.

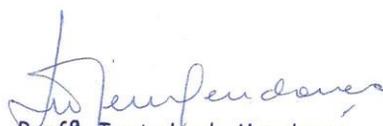
**Prof. Dr. RIVELILSON MENDES DE FREITAS**  
**Departamento: Bioquímica e Farmacologia- CCS/UFPI**

Senhor Pesquisador

Em reunião na presente data (30 de Maio de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **023/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Inovação tecnológica em doenças negligenciadas: planejamento, síntese e avaliação pré-clínica de um bioproduto para o tratamento da esquistossomose**", sob a sua responsabilidade. Informamos que no projeto serão usados 155 Camundongos isogênicos (78 machos e 77 fêmeas) e 75 Ratos isogênicos (38 machos e 37 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

  
**Prof<sup>a</sup>. Ivete L. de Mendonça**  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora