

Patrícia Rodrigues Orsi

**Atividade antiinflamatória intestinal e antiulcerogênica
gástrica e duodenal de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne**

Botucatu

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS BOTUCATU

Patrícia Rodrigues Orsi

**Atividade antiinflamatória intestinal e antiulcerogênica
gástrica e duodenal de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências
Biológicas, Área de Concentração:
Farmacologia**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Orsi, Patrícia Rodrigues.

Atividade antiinflamatória intestinal e antiulcerogênica gástrica e duodenal de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne / Patrícia Rodrigues Orsi. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luiz Claudio Di Stasi

Capes: 21001006

1. Intestinos – Doenças – Inflamação. 2. Úlcera péptica. 3. Farmacologia.

Palavras-chave: Antioxidante; Compostos fenólicos; Doença inflamatória intestinal; Fibra alimentar; *Hymenaea stigonocarpa*; Úlcera péptica.

Auxílio Financeiro:



(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)



(Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo)

Prólogo

O projeto de doutorado possibilitou a formação específica em farmacologia, com os estudos direcionados na atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos a colite experimental e a úlcera péptica. Durante a execução do projeto de doutorado, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer minha formação profissional.

Atividades realizadas durante o meu doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas área de concentração Farmacologia.

1. Disciplinas Cursadas

2º semestre de 2008:

- Empreendedorismo- Prof. Dr (a). Cláudia Helena Pellizzon, 4 créditos.
- Tópicos de atualização de Ciências – Prof.Dr. Ciro Moraes Barros, 1 crédito.

1º semestre de 2009:

- Tópicos de atualização de Ciências – Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, 1 crédito.
- Parâmetros de sensibilidade a Drogas: Modelos experimentais- Prof.Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira, 4 créditos.
- Neurofarmacologia e Comportamento- Prof. Dr (a) Mirtes Costa, 3 créditos.

2º semestre de 2009:

- Tópicos de atualização de Ciências – Prof. Dr.Ciro Moraes Barros, 1 crédito.

1º semestre de 2010:

- Tópicos de atualização de Ciências – Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, 1 crédito.
- Tópicos Especiais em Farmacologia - Farmacologia de plantas medicinais com atividade antinociceptiva (analgésica) e/ou antiinflamatória Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, 2 créditos.

- Metodologia e redação científica- Prof. Dr. Gilson Volpato, 4 créditos.

2. Estágio docência

- Realizado no primeiro semestre de 2009, na disciplina de toxicologia para a turma de Biomedicina.
- Realizado no segundo semestre de 2010, na disciplina de farmacologia para a turma de Biologia.

3. Participação em eventos Científicos

- 3.1. Participação do XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, realizado no centro de convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008 em São Paulo, SP, Brasil. Carga horária 24h.
- 3.2. Participação do mini-curso “Produtos naturais e doenças do trato gastrointestinal” no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, realizado no centro de convenções Frei Caneca, de 16 a 19 de setembro de 2008 em São Paulo, SP, Brasil. Carga horária 3h.
- 3.3. Palestra assistida: Análise de expressão gênica e mutação pontual por PCR em Tempo Real (23 de agosto de 2010);
- 3.4. Palestra assistida: Pirosequenciamento (23 de agosto de 2010);
- 3.5. Palestra assistida: Webportal de busca e informação de genes e vias metabólicas, Extração automatizada de DNA, RNA e proteínas (23 de agosto de 2010);
- 3.6. VI Encontro de Pós-graduação da faculdade de Medicina de Botucatu (1 a 3 de setembro de 2010);
- 3.7. I curso de Acupuntura Teórico-Prático com duração de 12 horas (11 e 12 de setembro de 2010);
- 3.8. Curso de preparo e análise de amostras Biológicas para Microscopia eletrônica, com duração de 8 horas (1 de setembro de 2010);

- 3.9. II curso de Atualização em pesquisa clínica (23 a 24 de setembro de 2010)
- 3.10. Participação do I Simpósio de Farmacologia da UNESP de 03 a 04 de Junho de 2011.

4. Trabalhos apresentados em Congresso

- 4.1. Paepalantine synergistic effect on sulfasalazine intestinal anti-inflammatory activity in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Rodrigues-Orsi P**, Cestari SH, Witaicenis A, Luchini AC, Seito LN, Di Stasi LC. XX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4.2. Intestinal anti-inflammatory activity of Dafnetin (7,8 dihydroxycoumarin) on acute and chronic experimental rat colitis model. **Rodrigues-Orsi P**, Luchini AC, Cestari SH, Seito LN, Witaicenis A, Di Stasi LC. XX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4.3. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin on acute and chronic experimental rat colitis model. Luchini AC, **Rodrigues-Orsi P**, Cestari SH, Seito LN, Witaicenis A, Di Stasi LC. XX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4.4. Synergic effects of the coumarin and 4-hydroxycoumarins on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine in the trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) rat colitis model. Luchini AC, **Rodrigues-Orsi P**, Cestari SH, Seito LN, Witaicenis A, Di Stasi LC. XX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4.5. Protective effects of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) in acute and chronic experimental models of rat colitis. Witaicenis A, Cestari SH, **Rodrigues-Orsi P**, Luchini AC, Seito LN, Di Stasi LC. XX Simpósio

Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.

- 4.6. Synergic effects of esculetin, 4-methylesculetin, sulfasalazine and prednisolone in trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Witaicenis A, Cestari SH, **Rodrigues-Orsi P**, Luchini AC, Seito LN, Di Stasi LC. XX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4.7. Preventative effects of natural coumarins fraxetin, scopoletin, esculin and 4-methyl-umbelliferone on trinitrobenzenesulphonic acid rat colitis model. Seito LN, Witaicenis A, Luchini AC, **Rodrigues-Orsi P**, Cestari SH, Di Stasi LC. XX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de setembro de 2008.
- 4.8. Synergic effect of the coumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine. Luchini AC, Cestari SH, **Rodrigues-Orsi P**, Seito L.N, Witaicenis A, Di Stasi L. 40^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental realizado em São Paulo- SP nos dias 16 a 19 de Outubro de 2008.
- 4.9. Synergic effect of the coumarin on intestinal anti-inflammatory activity of sulfasalazine. Luchini AC, Cestari SH, **Rodrigues-Orsi P**, Seito L.N, Witaicenis A, Di Stasi L. 40^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Realizado em Águas de Lindóia-SP, de 16 a 19 de Outubro de 2008.
- 4.10. A comparative study of esculetin, 4-methyl-esculetin, prednisolone and sulfasalazine in acute model of rats colitis. Witaicenis, A.; Seito, L.N.; **Orsi, P.R.**; Luchini, A.C.; Justulin Jr, L.A.; Felisbino, S.; Di Stasi, L.C. Apresentado no 2^o Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, de 8 a 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal.
- 4.11. Preventive effects of *Hymenaea stigocarpa* Mart. on rat colitis induced by trinitrobenzenesulphonic acid” **Rodrigues-Orsi, P**, Seito, L.N, Di Stasi, L.C, apresentado no V simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, realizado em Itajaí –SC nos dias 18, 19 e 20 de outubro de 2010.

- 4.12. Avaliação dos efeitos preventivos e curativos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart na atividade antiulcerogênica e na colite experimental” no I Simpósio de Farmacologia da UNESP, realizado em Botucatu nos dias 03 a 04 de Junho de 2011.
- 4.13. Chemical fingerprint and determination of the major constituents of *Hymenaea stigonocarpa* barks and fruits. Severi JA, Orsi PR, Vilegas W, Di Stasi LC, apresentado no VIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e I International Symposium of Pharmacognosy, realizado em Ilhéus–BA nos dias 18 a 22 de abril de 2012.

5. Trabalho Submetido para publicação

- **5.1.** *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models.

*“Viva como se fosse morrer amanhã, e
aprenda como se fosse viver para sempre”.*

Gandhi

Dedicatória

A Deus, por mais esta conquista.

*Ao meu marido Ricardo e ao meu filho Otávio, os
dois amores da minha vida, que a cada beijo, abraço,
carinho fazem a minha vida mais feliz, me
encorajando a seguir sempre em frente.*

*Aos meus pais Maria Helena e Ozias, e meus
irmãos Rodrigo e Danilo, por estarem comigo em
todos os momentos da minha vida.*

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi, agradeço pela contribuição na minha formação, por esses anos de aprendizado, pela oportunidade e orientação.

À Professora Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, agradeço pela co-orientação.

Aos professores membros da banca que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito.

O meu obrigado aos amigos que conquistei durante todos esses anos: Carol Luchini, Farina, Viviane, Aline, Léo, Jú Severi, Ana Elisa, Kita, Alexandre, Adriano, Laura, Adriana, Andréa, Flávia (Kalose) e Luis.

Ao Leonardo Noboru Seito o meu muito obrigado por todo auxílio que me deu durante este período, desde a coleta da planta até sua participação nos experimentos de colite e úlcera.

Em especial o meu muito obrigado, A Flávia Kalose que me ensinou e me ajudou nos experimentos de úlcera, sua ajuda foi fundamental nesta etapa.

Láisa, Kita, Katharine, Raquel, Hélio, Paty Mazolim e Célio, muito Obrigado pela colaboração de vocês nos experimentos de úlcera.

Obrigada a Juliana Severi por todo auxílio na fitoquímica da planta.

À Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira, pelas análises Bioquímicas realizadas no Laboratório do Hospital de Medicina Veterinária.

Ao Professor Dr. Osmar Cavassan pela identificação Botânica da planta estudada.

Ao Técnico Mário do laboratório de medicina experimental por auxiliar na preparação da ração com o fruto do jatobá.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cristina, Janete, Luis, Paulão, pela amizade e auxílio.

Ao pessoal da Pós-Graduação por estarem sempre prontos a ajudar.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	xvi
Lista de figuras.....	xviii
Lista de tabelas.....	xix
Lista de figuras do artigo.....	xx
Lista de tabelas do artigo.....	xxi
Resumo.....	xxii
Abstract.....	xxiv
I. Introdução.....	1
1. Doença inflamatória intestinal.....	2
2. Úlcera péptica.....	10
3. Radicais livres.....	16
4. Antioxidantes.....	18
5. Polifenóis na terapêutica.....	19
6. Fibras na terapêutica.....	20
7. Planta selecionada para o estudo: <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne.....	22
II. Objetivos gerais e específicos.....	24
III. Material e Métodos.....	25
1. Coleta da planta.....	25
2. Preparação do extrato metanólico da casca do caule (EMHs) e da dieta com o fruto (DFHs) de <i>H. stigonocarpa</i>	25
3. Caracterização química e composição nutricional de <i>H. Stigonocarpa</i>	25
4. Biomonitoramento por atividade antioxidante	
4.1. Modelo de lipoperoxidação em membranas de cérebro de ratos.....	27
4.2. Avaliação da atividade sequestradora de radicais livres com DPPH•.....	28
5. Procedimentos experimentais	
5.1. Fármacos utilizados.....	28
5.2. Animais.....	29
5.3. Toxicidade aguda e “Screening” hipocrático.....	29
5.4. Estudo da atividade de <i>H. stigonocarpa</i> em modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.....	30

5.4.1.1. Avaliação da atividade do EMHs na fase aguda do processo inflamatório intestinal.....	30
5.4.1.2. Avaliação da atividade da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto <i>H. stigonocarpa</i> (DFHs) no processo inflamatório intestinal.....	31
5.4.2. Avaliação do processo inflamatório intestinal.....	32
5.4.2.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos do cólon, consumo alimentar e do peso corporal.....	32
5.4.2.2. Determinações bioquímicas.....	33
5.5. Determinação da motilidade intestinal.....	34
5.6. Avaliação da diarreia.....	35
5.7. Estudo da Atividade Antiulcerogênica.....	35
5.7.1. Avaliação das lesões.....	35
5.7.2. Modelos de lesões ulcerogênicos estudados.....	36
5.7.3. Avaliação da atividade tóxica subaguda do EMHs e da DFHs.....	40
5.7.4. Determinação bioquímica da mucosa gástrica e duodenal.....	40
6. Análise estatística.....	41
IV. Resultados. Parte 1.....	42
1. Rendimento do Extrato metanólico da casca do caule (EMHs) e da polpa do fruto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	42
2. Caracterização química de <i>H. Stigonocarpa</i>	42
3. Atividade antioxidante.....	45
4. Toxicidade aguda e “Screening” hipocrático.....	46
Parte 2: Colite Experimental.....	48
1. Resultados do extrato metanólico da casca do caule de <i>H. stigonocarpa</i> (EMHs) em modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS.....	48
2. Resultados da dieta com a farinha da polpa do fruto de <i>H. stigonocarpa</i> (DFHs) em modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS.....	54
V. Discussão e conclusão.....	60
Discussão e conclusão da atividade antiinflamatória intestinal.....	60
VI. Resultados e discussão. Parte 3.....	67
Artigo submetido ao <i>Journal of Ethnopharmacology: Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models.....	67

VII. Considerações finais.....	107
VIII. Conclusões.....	110
IX. Perspectivas	111
X. Referências.....	112

Lista de Abreviaturas

AGCC= ácidos graxos de cadeia curta

ALT= alanina aminotransferase

ANOVA = análise de variância

5-ASA= 5-aminosalicílico

AST= aspartato aminotransferase

AZA= azatioprina

CAT= catalase

CE₅₀ = Concentração Eficiente de 50%

COX-2= ciclooxigenase 2

DAINEs= drogas antiinflamatórias não-esteroidais

DC= Doença de Crohn

DFHs= dieta com a polpa do fruto de *Hymenaea stigonocarpa*

DII= Doença inflamatória intestinal

DTNB= ácido ditiobisnitrobenzóico

EMHs= extrato metanólico da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*

eNOS= óxido nítrico sintase endotelial

FA= fosfatase alcalina

FI= fibras insolúveis

FS= fibras solúveis

GPx= glutathiona peroxidase

GSH= glutathiona reduzida

GSSG= glutathiona oxidada

H⁺, K⁺ -ATPase= bomba protônica de hidrogênio e potássio

H₂ = receptor histamínico do tipo 2

IBP= inibidores da bomba de prótons

IC₅₀= concentração inibitória de 50%

IFN- gama= Intérferon gama

i-NOS = óxido nítrico sintase induzível

MDA= malonildialdeído

6-MP= 6-mercaptopurina

MPO= mieloperoxidase
NF- κ B= fator de necrose tumoral kappa B
nNOS= óxido nítrico sintase neuronal
NO = óxido nítrico
NOS = óxido nítrico sintase
PGE2 = prostaglandina E2
PGs = prostaglandinas
RCU= Retocolite Ulcerativa
SH= grupamentos sulfídricos
SOD= superóxido dismutase
TBA= ácido tiobarbitúrico
Th1= T-helper 1
Th2= T-helper 2
6-TG= 6-tioguanina
TNBS = ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF- α = fator de necrose tumoral alfa
 γ -GT= gama glutamiltransferase

Lista de Figuras

Figura 1: Foto de <i>Hymenaea stigonocarpa</i>	23
Figura 2: Perfil cromatográfico dos extratos dos frutos e cascas de <i>H. stigonocarpa</i> por HPLC-UV-PAD.....	44
Figura 3. Avaliação do peso corporal de camundongos macho e fêmea tratados com dose única do EMHs na dose de 5000 mg/Kg.....	46
Figura 4: Avaliação do consumo de ração por grupo dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (EMHs).....	50
Figura 5: Avaliação do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (EMHs).....	51
Figura 6. Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (EMHs).....	52
Figura 7: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (EMHs).....	53
Figura 8: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (EMHs).....	53
Figura 9: Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (EMHs).....	54
Figura 10: Avaliação do consumo de ração por grupo dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (DFHs).....	56
Figura 11: Avaliação do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (DFHs).....	57
Figura 12. Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (DFHs).....	58
Figura 13: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (DFHs).....	58
Figura 14: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (DFHs).....	59
Figura 15: Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS (DFHs).....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição da ração Labina-Purina, e da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto nas proporções 5 e 10%.....	26
Tabela 2. Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.....	32
Tabela 3: Rendimento do EMHs e do fruto de <i>H. stigonocarpa</i>	42
Tabela 4: Principais compostos secundários detectados em <i>H. stigonocarpa</i>	43
Tabela 5. Atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica.....	45
Tabela 6. Porcentagem de DPPH• seqüestrado e EC ₅₀ das amostras.....	45
Tabela 7 A. Efeito da administração aguda do EMHs sobre os órgãos de camundongos macho.....	47
Tabela 7 B. Efeito da administração aguda do EMHs sobre os órgãos de camundongos fêmea.....	47
Tabela 8. Efeito do Extrato metanólico da casca do caule de <i>H. stigonocarpa</i> (EMHs) nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, prednisolona (2 mg/Kg) e sulfassalazina (25 mg/Kg) no escore macroscópico, extensão da lesão, relação peso comprimento colônico, diarreia e aderência em modelo de inflamação intestinal agudo induzido por TNBS.....	49
Tabela 9. Efeito da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto de <i>H. stigonocarpa</i> (DFHs) nas concentrações de 5 e 10% no escore macroscópico, extensão da lesão, relação peso comprimento colônico, diarreia e aderência em modelo de inflamação intestinal agudo induzido por TNBS.....	55

Lista de Figuras do artigo

Figure 1: Effects of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) on gastric lesions induced by ethanol in rats pretreated with L-NAME (an inhibitor of NO synthase).....	86
Figure 2: Gastroprotective activity of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) barks on levels of total glutathione and myeloperoxidase on model of gastric injury induced by ischemia/ reperfusion in rats.....	88
Figure 3: Effect of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) on lesion area, level of total glutathione and myeloperoxidase on model of duodenal injury induced by cysteamine in rats	90
Figure 4: Gastric healing effect of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) and fruit pulp by treatment during 7 or 14 days after injury induced by acetic acid in rats	92
Figure 5: Duodenal healing effect of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) and fruit pulp by treatment during 7 or 14 days after injury induced by acetic acid in rats	93
Figure 6: The HPLC-PAD fingerprints of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Hs) barks and pulp fruits	97

Lista de Tabelas do artigo

Table 1. Effects of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> of the bark (MHs) on antidiarrheal induced by castor oil in mice.....	80
Table 2. Effect of methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) on intestinal propulsion induced by activated charcoal in mice.....	81
Table 3. Effects of different doses from methanolic extract of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> of the bark (MHs) on models of gastric induced lesions in rats.....	83
Table 4. Effect of methanolic extract of the bark of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (MHs) and fruit pulp of <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Hs) (10%) on biochemical parameters of toxicity in rats submitted to the gastric lesions induced by acetic acid.....	95

Resumo

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne (Fabaceae), é uma espécie vegetal do Cerrado Brasileiro conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado. A casca do caule e o fruto de *H. stigonocarpa* são usados na medicina popular brasileira para o tratamento de úlceras, diarreia e como antiinflamatório. A terapêutica atualmente disponível para o tratamento da doença inflamatória intestinal e úlcera péptica apresenta-se como sintomático e paliativo, além de possuir sérios efeitos adversos. Com base nestas informações, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do extrato metanólico da casca do caule e a dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa* (EMHs e DFHs) no modelo experimental de doença inflamatória intestinal, ação antidiarréica e antiulcerogênica. O estudo incluiu (a) preparação do EMHs e da DFHs; (b) avaliação do perfil fitoquímico do EMHs e da polpa do fruto; (c) avaliação do EMHs e da DFHs no processo inflamatório intestinal induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos; (d) Avaliar os efeitos do EMHs e da DFHs sobre os parâmetros clínicos, macroscópicos e bioquímicos envolvidos no processo inflamatório colônico; (e) Investigar a ação antidiarréica do EMHs em camundongos e seus efeitos gastroprotetores, anti-secretório e cicatrizante no estômago e no duodeno de ratos; (f) Investigar o efeito do EMHs na motilidade intestinal em camundongos; (g) Investigar a ação cicatrizante da DFHs na úlcera gástrica e duodenal em ratos; (h) Avaliar os efeitos do EMHs e da DFHs na lesão gástrica e duodenal sobre os parâmetros toxicológicos, macroscópicos e bioquímicos. No modelo de colite experimental aguda induzida por TNBS o pré-tratamento com o EMHs na dose de 200 mg/Kg e a DFHs (10%) promoveram manutenção nos níveis de glutathione (GSH). A DFHs (10%) mostrou efeitos protetores nas lesões colônicas induzidas pelo TNBS, reduzindo a atividade da mieloperoxidase (MPO) e o conteúdo de malonildialdeído (MDA). Entretanto, a atividade da fosfatase alcalina (FA) não foi influenciada pelo EMHs ou pela DFHs. O EMHs (200 mg/Kg) mostrou efeito antidiarréico e foi capaz de proteger a mucosa gástrica dos prejuízos do etanol absoluto (68%) e dos efeitos danosos provocados pela droga antiinflamatória não-esteroidal (DAINE) (86%), comparados ao grupo controle (veículo), estes resultados foram acompanhados pela restauração dos níveis do conteúdo GSH e também por reduzir os níveis aumentados da MPO. O EMHs (200 mg/Kg) protegeu a mucosa duodenal das injúrias causadas pela

cisteamina (98%) e da ulceração na mucosa gástrica induzida por isquemia e reperfusão (I/R) (80%) quando comparado ao grupo controle (veículo), estes resultados foram acompanhados pela restauração dos níveis do conteúdo GSH. O óxido nítrico (NO) parece estar envolvido no efeito gastroprotetor do EMHs. O efeito cicatrizante na mucosa gástrica foi visto após 7 dias (EMHs- 53%) ou 14 dias (EMHs- 60 % e a DFHS- 61%) de tratamento. O tratamento com a DFHs por 7 dias demonstrou significativo efeito cicatrizante no duodeno (71%). Os tratamentos com EMHs ou DFHs por 14 dias não apresentaram qualquer sinal de toxicidade. Tanto o EMHs quanto a polpa do fruto mostraram atividade antioxidante *in vitro*. Compostos fenólicos, flavonóides, taninos e terpenos foram detectados na casca do caule e na polpa do fruto, enquanto saponinas foram detectadas somente na casca do caule. A DFHs (10%) apresentou atividade antiinflamatória no modelo de colite induzido por TNBS. O EMHs (200 mg/Kg) apresentou ações antidiarréica, gastroprotetora e cicatrizante e a DFHs (10%) apresentou ação cicatrizante. Estes efeitos preventivos e protetores observados na colite experimental e na atividade antiulcerogênica podem estar associados a ação antioxidante da planta, pois esta espécie apresenta taninos e flavonóides na casca do caule e no fruto. Em adição o efeito protetor da DFHs pode também estar relacionada a presença de fibras da dieta.

Palavras chaves: *Hymenaea stigonocarpa*, Doença Inflamatória intestinal, úlcera péptica, antioxidante, compostos fenólicos, fibra alimentar

Abstract

Hymenaea stigonocarpa Mart. ex Hayne (Fabaceae) is a species found in the Brazilian savannah popularly known as Jatobá-do-cerrado. The stem bark and fruit of *H. stigonocarpa* are used in Brazilian folk medicine as antiinflammatory to treat ulcers and diarrhoea. The currently used therapy for the inflammatory bowel disease and peptic ulcer treatment has serious adverse effects and it is palliative and symptomatic. Based on this, the aim of this study was to investigate the effects of the methanol extract of stem bark and diet enriched with flour from the pulp of the fruit of *H. stigonocarpa* (EMHs and DFHs) in an experimental model of inflammatory bowel disease, antidiarrhoeal and anti-ulcer action. The study included (a) preparation of EMHs and DFHs; (b) evaluation of phytochemical profile of stem bark and fruits; (c) evaluation of stem bark extract and fruit pulp diet efficacy in TNBS-induced rat colitis; (d) macroscopic, clinical, biochemical studies to assess the healing effects; (e) investigate the action of antidiarrheal EMHs in mice and its effects gastroprotetores, antisecretory and healing in the stomach and duodenum of rats; (f) investigate the effect of EMHs on intestinal motility in mice; (g) investigate the healing action of DFHs in gastric and duodenal ulcer in rats; (h) evaluate the effects of EMHs and DFHs in gastric and duodenal lesions on the toxicological, macroscopic and biochemical parameters. In the colitis experimental model, TNBS-induced acute pretreatment with 200 mg / Kg of EMHs and DFHs (10%) promoted maintenance levels of glutathione (GSH). The DFHs (10%) showed a protective effect in the TNBS-induced colonic damage, reducing the activity of myeloperoxidase (MPO) and the content of malondialdehyde (MDA). However, alkaline phosphatase (AP) activity was not influenced by EMHs or DFHs. The EMHs (200 mg/Kg) has an antidiarrheal effect and were able to protect gastric mucosa against absolute ethanol (68% protection) and also against the injurious effect of NSAIDs (86% protection) when compared to the group treated with vehicle. These results were accompanied by the prevention of GSH depletion and an inhibition of MPO activity when compared to animals treated with vehicle. EMHs markedly protected duodenal mucosa against injuries caused by cysteamine (98%) and also against I/R induced gastric ulceration (80%) when compared to the group treated with vehicle, these results were accompanied by the prevention of GSH depletion. NO appeared to be involved in this gastroprotective

effect. The healing effect was seen in the gastric mucosa treatment after 7 days (MHs – 53%) and 14 days (MHs – 60% and DFHs– 61%). Treatment with DFHs for 7 days demonstrates a significant duodenal healing effect (71%). Treatments with EMHs or DFHs for 14 days showed no signs of toxicity. The EMHs and fruit pulp showed antioxidant activity *in vitro*. Phenolic compounds, flavonoids, tannins and terpenes were detected in stem bark and fruit, while saponin was only detected in stem bark. The DFHs (10%) had anti-inflammatory activity in the model of colitis induced by TNBS. The EMHs (200 mg / Kg) showed antidiarrhoeal, gastroprotective and cicatrising effects and the DFHs showed healing effects. These preventive and protective effects observed in experimental colitis and antiulcerogenic activity may be associated with the plant antioxidant action, because this species has the tannins and flavonoids in stem bark and fruit. In addition to the protective effect of DFHs may also be related to the presence of dietary fiber.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*, inflammatory bowel disease, peptic ulcer, antioxidant, phenolics, dietary fiber.

I. Introdução

A procura por compostos bioativos de plantas medicinais permanece, na atualidade, como uma importante estratégia para a descoberta de novos medicamentos, justificando assim os numerosos estudos multidisciplinares existentes neste ramo da terapêutica.

As plantas sintetizam metabólitos secundários com funções principalmente de defesa ou atração, os quais podem protegê-las de fungos, viroses, insetos e demais predadores (Nahrstedt, 1989; Harbone, 1990), ou ajudá-las na reprodução atraindo polinizadores. Os metabólitos secundários variam amplamente em sua distribuição entre as espécies de plantas. Centenas de metabólitos secundários têm sido isolados de plantas e suas estruturas químicas elucidadas (Rhodes, 1994). Os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente apresentam atividades biológicas e do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva principalmente do grande número destas substâncias que apresentam atividades farmacológicas (Santos, 2010).

Informações do conhecimento tradicional de grupos étnicos sobre plantas medicinais e seus usos desempenham papel vital na descoberta de novos produtos como agentes terapêuticos (Almeida *et al.*, 2001). Pesquisas confirmam a eficácia de várias plantas medicinais no tratamento de doenças gastrintestinais, sendo que suas propriedades terapêuticas são atribuídas a diferentes compostos como alcalóides, flavonóides (Mota *et al.*, 2009) cumarinas (Luchini *et al.*, 2008; Witaicenis *et al.*, 2010; Witaicenis *et al.*, 2012), terpenóides e taninos (Vasconcelos *et al.*, 2010).

De acordo com dados etnofarmacológicos, as cascas e frutos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae), espécie vegetal da Cerrado Brasileiro conhecida popularmente como “jatobá-do-cerrado”, são usados na medicina popular brasileira para o tratamento de úlceras, diarreia e como anti-inflamatório (Grandi *et al.*, 1989).

Estudos fitoquímicos de diferentes partes de espécies *Hymenaea* têm demonstrado a presença de sesquiterpenos (Langenhein & Hall, 1983; Aguiar *et al.*, 2010), ácidos graxos (Matuda & Netto, 2005), diterpenos (Khoo *et al.*, 1973.; Cunningham *et al.*, 1973; Cunningham *et al.*, 1974; Marsaioli *et al.*, 1975; Nogueira *et*

al., 2001; Abdel-Kader *et al.*, 2002) e oligossacarídeos (Lima *et al.*, 1995). Além disso, o fruto é rico em fibras (Chang *et al.*, 1998) e alguns estudos têm relatado os efeitos clínicos de fibra alimentar como ferramentas terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais (Hond, *et al.*, 1998; Breuer *et al.*, 1991).

Até o presente momento nenhuma pesquisa foi realizada sobre o perfil fitoquímico do fruto, bem como da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa*. Além disso, apesar das indicações etnofarmacológicas desta espécie, não há nenhuma evidência farmacológica dos seus efeitos no trato gastrointestinal. Dessa forma é de fundamental importância investigar o perfil químico e farmacológico desta espécie. Sendo assim, explorar novos compostos na proteção do trato gastrintestinal, provenientes de plantas medicinais, é importante, pois a maioria das drogas sintéticas disponíveis no mercado para tratar úlcera péptica e a doença inflamatória intestinal produz vários efeitos indesejáveis, quando usadas a longo prazo.

1. Doença Inflamatória Intestinal

A doença inflamatória intestinal (DII) engloba duas doenças distintas: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Ambas caracterizam-se por uma inflamação crônica do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos prolongados de remissão dos sintomas (Gitnick, 1996), sendo marcadas pela ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados, tais como diarreia e constipação (Singh *et al.*, 2003).

As características e distribuição do processo inflamatório intestinal são distintas. A DC pode afetar todo o segmento do trato digestório da boca até o ânus. Uma importante característica da DC é que a inflamação pode envolver todas as camadas da parede do intestino. Na fase aguda da doença ocorre edema, mas, a longo prazo, podem ocorrer fibrose e estreitamento do lúmen intestinal (estenoses), com obstrução do intestino. A RCU é uma doença que se restringe ao cólon, a inflamação é superficial e raramente estende-se além da muscular da mucosa da parede do intestino (Reid & Carey, 2011).

Dados epidemiológicos confirmam que a DII afeta aproximadamente 1 a 2 em cada 1000 pessoas nos países desenvolvidos (Blumberg *et al.*, 2011). A prevalência da RCU e DC em indivíduos no Norte da Dinamarca é de 294 e 151 casos para cada

100.000 habitantes, respectivamente (Jacobsen *et al.*, 2006). No Brasil, são escassos os estudos relatando a incidência e prevalência das doenças inflamatórias intestinais, devido à existência de problemas nos sistemas de informação da área de saúde. Porém, um estudo epidemiológico realizado no hospital da Universidade Estadual Paulista- Campus de Botucatu-SP, o qual atende predominantemente pacientes da região centro-oeste paulista, demonstrou que a taxa da incidência foi de 4,48 e 3,50 casos para a RCU e DC para cada 100.000 habitantes, respectivamente. As prevalências atingiram os valores de 14,81 e 5,65 casos para a RCU e DC para cada 100.000 habitantes, respectivamente (Victoria *et al.*, 2009). A incidência dessas doenças inflamatórias intestinais nessa região é baixa e de acordo com os autores a crescente prevalência justifica políticas de saúde para as suas abordagens.

A idade em que mais se observa a ocorrência da DC é entre 20 a 30 anos, já na RCU a ocorrência desta doença é maior entre 30 a 40 anos (Cosnes *et al.*, 2011). As doenças inflamatórias intestinais não ocorrem em igual proporção entre os sexos, sendo a RCU mais freqüente em homens (60%), enquanto a DC afeta com maior freqüência as mulheres 20% a 30% (Cosnes *et al.*, 2011).

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais ainda não foi totalmente elucidada; no entanto, sabe-se que interações entre os fatores genéticos, ambientais e uma desregulação do sistema imune refletem em seu desenvolvimento (Mayer, 2010). Trata-se, portanto, de uma doença multifatorial e vários fatores podem ser ressaltados como, por exemplo, a alteração na função epitelial e na microbiota intestinal (Su *et al.*, 2009).

Várias observações clínicas sugerem que fatores genéticos contribuem para a susceptibilidade à DII. A ocorrência da DII entre parentes de primeiro grau é bem conhecida. Os familiares em primeiro grau de indivíduos afetados têm risco de 13 a 36 e 7 a 17 vezes, de desenvolver DC e RCU, respectivamente, quando comparados com a população em geral (Vermeire *et al.*, 2008).

As evidências mais recentes de que a predisposição genética é importante no tratamento da DII são fornecidos pelo sucesso nos estudos de genética molecular. A identificação bem sucedida de uma série de novos genes envolvidos na suscetibilidade na DII são evidências claramente convincentes de que fatores genéticos estão envolvidos na doença (Satsangi, 2008).

Estudos associados ao genoma têm identificado aproximadamente 100 *loci* que estão associados com a DII. Estes *loci* estão envolvidos com uma diversidade de genes e mecanismos fisiopatológicos incluindo reconhecimento microbiano, ativação de linfócitos, sinalização de citocinas e defesa do epitélio intestinal (Cho & Brant, 2011). Embora a DC e RCU estejam associadas com regiões genômicas envolvidas com estas doenças, há evidências para distintos genes envolvidos na DC e na RCU. A DC está predominantemente associada ao gene *NOD2* e aos genes que regulam a autofagia como, por exemplo, *ATG16L1*, *IRGM* e *LRRK2* (Cho & Brant, 2011). *NOD2* é expresso em monócitos e ativa o NF- κ B (fator de necrose tumoral kappa B), o qual é o fator transcricional envolvido com o início das respostas inflamatórias (Van Heel *et al.*, 2001; Mahida *et al.*, 2001). Na RCU, há uma predominante associação com o cromossomo 6p21, uma região do complexo principal de histocompatibilidade. A RCU também está predominantemente associada com *loci* nos cromossomos que se relacionam a genes da função de defesa epitelial intestinal (Cho & Brant, 2011).

Os fatores ambientais desempenham um importante papel no desenvolvimento da DII, como o tabagismo, dieta, estresse, microrganismos entre outros (Danese *et al.*, 2004). Dados na literatura demonstram que o cigarro protege contra a RCU embora aumente o risco de DC (Cosnes, 2008). Presume-se que a nicotina é o composto responsável pela interação do cigarro e a DII (Reddy & Tremaine, 2008). Estudos mostram que o cigarro modula os mecanismos celulares e humorais da imunidade, envolvendo, portanto o sistema imune intestinal. Outros mecanismos incluem aumento da produção de radicais livres de oxigênio, redução da capacidade antioxidante, alteração da permeabilidade intestinal, modificação da motilidade intestinal e alterações no fluxo sanguíneo da mucosa intestinal (Parsi, 2008).

Outro fator envolvido com a DII é o estresse psicológico, o qual pode aumentar a inflamação da mucosa e agravar o curso das doenças inflamatórias intestinais (Wahed *et al.*, 2009). De acordo com Dunckley & Travis (2008), o estresse não tem um papel iniciador na DII; porém, o estresse aumenta o risco das recidivas.

A ocorrência das doenças inflamatórias intestinais é maior em grandes áreas urbanas do que na área rural e em pessoas de classes econômicas mais altas. As pessoas que vivem em países desenvolvidos estão em ambientes cada vez mais

higienizados e adquirem helmintos com menor frequência. A redução da frequência de helmintos colonizando o intestino está correlacionada com um aumento na prevalência da DC (Elliott *et al.*, 2000). Os helmintos promovem uma resposta de citocinas da via celular T-helper 2 (Th2) (Bosani *et al.*, 2009), que pode prevenir o desenvolvimento das reações inflamatórias da via T-helper 1 (Th1) (Elliott *et al.*, 2000).

Os alimentos da dieta podem atuar como antígenos promovendo inflamação intestinal ou auxiliar na prevenção do processo inflamatório. O meio que circunda a mucosa intestinal é uma mistura complexa de antígenos de três origens: da dieta, da flora bacteriana normal e de seus produtos, sendo que estes últimos podem representar patógenos potenciais. O sistema imune da mucosa tem a capacidade de discriminar os estímulos prejudiciais dos inofensivos, prevenindo assim a invasão de patógenos e não produzindo uma resposta imune frente aos agentes inofensivos. A dieta alimentar pode ser uma fonte de antígenos luminal e, assim, ser um importante fator na imunopatogênese (Yamamoto *et al.*, 2009).

Alguns alimentos específicos podem estar relacionados com o desenvolvimento da inflamação intestinal, atuando como antígeno. Dentre estes se pode citar o leite de vaca (Yamamoto *et al.*, 2009) e o açúcar refinado (Mayberry *et al.*, 1981; Tragnone *et al.*, 1995). Por outro lado, existem alguns alimentos que são relatados como preventivos do processo inflamatório intestinal, como por exemplo, as frutas (Tragnone *et al.*, 1995; Reif *et al.*, 1997; Amre *et al.*, 2007), vegetais, fibras e produtos ricos em ômega-3 (Amre *et al.*, 2007).

O epitélio intestinal é a interface entre a microbiota intestinal e o tecido linfóide associado com o sistema gastrointestinal. As células epiteliais são uma barreira física contra a entrada excessiva de bactérias e outros antígenos no lúmen intestinal para dentro da circulação (Abraham & Cho, 2009). É descrito na literatura que pacientes com DII possuem um aumento na permeabilidade intestinal, que é consequência da ulceração da mucosa e de apoptose, o que acarreta em uma diminuição na função de barreira deste epitélio (Edelblum & Turner, 2009).

A função de barreira seletiva é mantida pela formação de complexos que ligam uma célula a outra através de desmossomos, junções de aderência e *tight junctions* (junções apertadas ou ocludentes). A integridade do epitélio intestinal é essencial para o perfeito funcionamento do trato gastrointestinal (Chichlowski & Hale, 2008).

Alterações patológicas no intestino podem permitir a abertura das *tight junctions* e ocorrer à passagem de grandes antígenos (Snoeck *et al.*, 2005). Estas anormalidades podem ser decorrentes de um defeito primário da função de barreira ou serem resultantes da inflamação (Turner, 2006).

A microbiota intestinal parece também estar intimamente envolvida com a patogênese da DII (Bosani *et al.*, 2009). Os microorganismos intestinais e seus produtos mostram um importante papel na iniciação e perpetuação da inflamação intestinal crônica (Farrell & La Mont, 2002). Agentes infecciosos específicos estão relacionados com um potencial papel etiológico na RCU e DC tais como, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia tracomatis*, *Escherichia coli*, *Cytomegalovirus* e *Saccharomyces cerevisiae* (Danese *et al.*, 2004). Por outro lado, existem as bactérias benéficas como as bactérias do gênero *Lactobacillus*, especialmente *L. casei* GG (Borrueel *et al.*, 2002), *L. bulgaricus* (Borrueel *et al.*, 2002), *L. reuteri* (Peran *et al.*, 2007), *L. fermentum* (Peran *et al.*, 2007), *L. salivarius ssp. salivarius* (Peran *et al.*, 2005), e do gênero *Bifidobacterium*, como por exemplo *B. longum* (Furrie *et al.*, 2005).

Para modificar a microbiota intestinal na RCU, ensaios clínicos têm realizado preparações com probióticos e prebióticos em pacientes (Kanauchi *et al.*, 2003). Um estudo realizado utilizando probióticos demonstrou normalização na função fisiológica, integridade da barreira epitelial do intestino, redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento na integridade das *tight junctions* entre as células epiteliais (Madsen *et al.*, 2001). Os efeitos protetores da microbiota intestinal na DII podem estar relacionados à formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no intestino grosso (Koleva *et al.*, 2012). Os AGCC, tais como os ácidos acético, propiônico e butírico são produzidos no intestino grosso por fermentação bacteriana anaeróbica a partir da fibra alimentar, amido resistente e do muco do cólon (Araki *et al.*, 2007). De fato, alguns estudos têm mostrado que os prebióticos incluindo as fibras da dieta, cevada germinada, inulina, lactulose e polidextrose, exercem efeitos benéficos em humano e nos modelos de colite experimental (Kanauchi *et al.*, 1998; Videla *et al.*, 2001; Kanauchi *et al.*, 2003; Camuesco *et al.*, 2005; Damaskos & Kolios, 2008; Witaicenis *et al.*, 2010).

O sistema imune da mucosa intestinal é muito bem coordenado para evitar a entrada de patógenos e agentes nocivos a não reagir frente às bactérias comensais e

antígenos provenientes da dieta, fenômeno denominado de tolerância oral (Mowat, 2003). Sabe-se que a perda da tolerância oral e o desenvolvimento de resposta imune contra as bactérias não patogênicas é o ponto chave para o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais. A perturbação deste equilíbrio pode ser responsável pela predisposição a DII (Abraham & Medzhitov, 2011).

A característica fundamental da DII é a acentuada infiltração na lâmina própria de células do sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e célula T *natural killer*), e do sistema imune adaptativo (células B e células T). O aumento da quantidade, bem como ativação destas células na mucosa intestinal, eleva a produção de uma grande variedade de mediadores da inflamação, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β e Intérferon gama (IFN- gama) (Abraham & Cho, 2009).

Bouma e Strober (2003) demonstraram, por meio de diferentes modelos experimentais e estudos em humanos, que a doença de Crohn está mais fortemente relacionada com linfócitos T helper 1 (Th1) e a retocolite ulcerativa com linfócitos T helper 2 (Th2), isso levando em consideração as diferentes citocinas que predominam em cada doença. Sabe-se, que os mecanismos imunes envolvidos na iniciação e perpetuação da RCU e DC são distintos. Na DC os níveis de TNF-alfa, INF-gama, interleucinas (IL) IL-12 e IL-1 estão aumentados, enquanto na RCU é observado aumento na secreção de IL-5, IL-14, IL-10 e IL-13, sendo maior o desequilíbrio da homeostasia no sistema imune na DC do que na RCU (Šventoraitytė *et al.*, 2008).

A terapêutica atualmente utilizada para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais inclui um grande número de fármacos, dentre os quais estão os aminossalicilatos, glicocorticóides, imunossupressores, imunomoduladores (Chambrun & Sandborn, 2012), antibióticos (Guslandi, 2011) e a terapia biológica (Williams & Goh, 2011).

Os aminossalicilatos são o grupo de drogas mais comuns para o tratamento primário da DII; compreendem a classe dos derivados do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), que possuem como representantes principais a sulfassalazina, balsalazina, olsalazina e mesalazina (Campregher & Gasche, 2011).

A sulfassalazina é um conjugado de mesalazina (5-ASA) ligado à sulfapiridina por uma ligação diazo, e dissocia-se em 5-ASA e sulfapiridina pelas bactérias

azoredutases do cólon. O componente 5-ASA é aceito como a molécula com propriedade terapêutica e a sulfapiridina é responsável pela maioria dos efeitos adversos (Jafri & Pasricha, 2003). O seu mecanismo de ação está relacionado à atividade antiinflamatória, promovida pela inibição da via da cicloxigenase e da 5-lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, bem como à sua propriedade antioxidante (Jafri & Pasricha, 2003; Campregher & Gasche, 2011).

Apesar da sulfassalazina ser amplamente utilizada para o tratamento da retocolite ulcerativa, seu uso é limitado devido ao grande número de efeitos adversos. Estes efeitos compreendem desde dores de cabeça, náuseas e anorexia, os quais estão relacionados aos níveis séricos de sulfapiridina, até dispepsia, reações alérgicas, febre, hemólise, neutropenia e anemia (Ransford & Langman, 2002), sendo que grande parte destes efeitos podem ser revertidos com a diminuição da dose de sulfassalazina, o que também diminui sua eficácia. Em adição, efeitos hepato e nefrotóxico (Linares *et al.*, 2009) e de promoção de infertilidade masculina (Alonso *et al.*, 2009) estão associados ao uso deste fármaco.

Os glicocorticóides, são normalmente prescritos para o tratamento da DII moderada a severa (Florin *et al.*, 1998), como a prednisolona e prednisona. Os glicocorticóides são amplamente utilizados como potentes agentes antiinflamatórios para a indução da remissão na DC e RCU (Sands, 2000; Podolsky, 2002), não sendo eficazes para a manutenção da remissão (Martins & Peppercorn, 2004). A sua utilização terapêutica, entretanto, é restrita devido à ocorrência de severos efeitos adversos sistêmicos, incluindo osteoporose, perda de massa muscular, aumento no risco do diabetes e inibição no reparo de feridas; estes efeitos aumentam com a dose e duração do tratamento (Stanbury & Graham, 1998; Rogler, 2010).

O mecanismo geral de ação destes fármacos consiste na ligação da molécula do esteróide com os receptores intracelulares que controlam a transcrição gênica. O complexo receptor esteróide promove a formação de dímeros que migram para o núcleo da célula e ligam-se ao DNA, modificando a transcrição gênica, induzindo a síntese de algumas proteínas, como por exemplo, a lipocortina-1, e inibindo a síntese de outras, como da AP-1 e do NFkB (Marx, 1995). Devido a esse mecanismo, os glicocorticóides afetam a função de várias células envolvidas no processo inflamatório, como a expressão de várias citocinas e seus respectivos receptores, além da

diminuição das moléculas de adesão, do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Rogler, 2010). Sua atividade antiinflamatória se caracteriza pela inibição dos primeiros eventos do processo inflamatório (Andus & Targan, 1994).

Os imunossuppressores derivados da tioguanina como azatioprina (AZA) e 6-mercaptopurina (6-MP), também têm sido utilizados no tratamento da DII, apresentando efeitos na doença ativa, bem como na manutenção da remissão tanto da DC como da RCU (Rogler, 2010). A AZA é um pró-fármaco, gerando a 6-MP (Jafri & Pasricha, 2003); ambas sofrem transformações metabólicas para 6-tioguanina (6-TG) que é o metabólito efetor final e exerce atividade imunossupressora (Rogler, 2010). Tanto a AZA como o 6-MP e o seu metabólito ativo, o 6-TG suprimem a proliferação de linfócitos e podem ter várias outras propriedades antiinflamatórias (Jafri & Pasricha, 2003). Apesar dos efeitos imunossupressores dos derivados da tioguanina, estes promovem efeitos adversos, como toxicidade da medula óssea (Breen *et al.*, 2005), hepatotoxicidade e pancreatite (De Boer *et al.*, 2005).

O metotrexato, outro imunossupressor usado para tratamento da artrite reumatóide, também tem sido introduzido no tratamento da DII. O metotrexato age inibindo a diidrofolato redutase, impedindo a produção de tetraidrofolato, que é necessário para a síntese de DNA, promovendo assim a formação de um DNA defeituoso, o que resulta em apoptose, principalmente das células T. Dentre os efeitos adversos destacam-se a ocorrência de mielossupressão, hepato e nefrotoxicidade e fibrose pulmonar (Rogler, 2010). A ciclosporina, tacrolimo (Rogler, 2010) e o mofetil micofenalato (Oz & Ebersole, 2008), são também exemplos de imunossuppressores utilizados na DII.

Os agentes anti-TNF, também denominados de terapia biológica compreendem outra classe de fármacos, atualmente utilizadas para o tratamento da DC. Dentre os mais utilizados estão o infliximab, adalimumab e o certolizumab (Yun & Hanauer, 2009), estes são anticorpos monoclonais quiméricos (camundongo/humano). Os anti-TNF são eficazes na indução e manutenção da remissão na DC bem como no tratamento das fístulas (Williams & Goh, 2011). O mecanismo de ação dos agentes anti-TNF é por meio da indução de apoptose nas células mononucleares periféricas sanguíneas e células T; entretanto, o efeito terapêutico exato dos anti-TNF não está completamente elucidado em nível molecular (Atreya & Neurath, 2008). Os principais

efeitos adversos consistem em desenvolvimento de autoimunidade, aumento do risco de infecções, ocorrência de tuberculose e reações durante a infusão que podem ser desde dores no peito, falta de ar, dispnéia, dores de cabeça e febre, até reações anafiláticas (Navarro & Hanauer, 2003). Além dos efeitos adversos, existem pacientes que não respondem, param de responder ou desenvolvem intolerância a essa terapia biológica (Yun & Hanauer, 2009), aliado ao alto custo desses medicamentos, o que inviabiliza o seu uso pela maioria dos pacientes da população brasileira.

Os antibióticos, como o metronidazol e o ciprofloxacino são utilizados no tratamento da DC ativa leve a moderada (Jafri & Pasricha, 2003). Rifaximina é um agente antibacteriano que tem promovido resultados na indução da remissão na DC e na RCU, e pode também ter papel na manutenção da remissão (Guslandi, 2011). A rifaximina tem mostrado resultados modulando a microbiota colônica de pacientes com DC, pelo aumento da concentração de *Bifidobacterium* (Maccaferri *et al.*, 2010). Entretanto, os antibióticos podem induzir efeitos indesejáveis, especialmente durante terapia a longo prazo (Guslandi, 2011). Os efeitos adversos mais comuns observados do metronidazol incluem náuseas e neuropatia periférica (Hanauer & Stathopoulos, 1991).

Apesar dos derivados do 5-ASA, glicocorticóides, imunomoduladores, terapia biológica e antibióticos apresentarem benefícios no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, tais fármacos apresentam riscos para os pacientes (Hanauer & Stathopoulos, 1991; Ransford & Langman, 2002; Navarro & Hanauer, 2003; Breen *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2005; Rogler, 2010; Guslandi *et al.*, 2011). Além disso, a terapêutica disponível não representa a cura da DII, sendo que os fármacos disponíveis possuem sérios efeitos adversos, além de existirem pacientes que não respondem a nenhum dos fármacos existentes. Estas informações são importantes para a busca por novos produtos com atividade antiinflamatória intestinal, bem como para a prevenção dessas graves doenças.

2. Úlcera Péptica

O trato gastrointestinal é constituído pelo tubo digestivo e suas glândulas secretoras anexas, sendo responsável pela digestão e absorção dos nutrientes encontrados no bolo alimentar, funcionando ao mesmo tempo, como barreira seletiva

de proteção entre o meio externo e o interno (Porth & Kunert, 2004). O estômago é protegido por uma barreira da mucosa que previne a agressão do epitélio gástrico e das camadas mais profundas da parede do estômago por secreções gástricas e outros agentes destrutivos (Porth & Kunert, 2004). A falha nesta barreira de proteção é a causa da ulceração péptica (Guyton & Hall, 1998).

A úlcera péptica afeta 10% da população mundial (Zapata-Colindres *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos há aproximadamente 500 mil novos casos e 4 milhões de reincidências de úlcera péptica anualmente (Fendrick *et al.*, 2005). A sua prevalência mundial difere, a úlcera duodenal é dominante na população Ocidental e as úlceras gástricas são mais freqüentes na Ásia, especialmente no Japão (Yuan *et al.*, 2006). Num estudo realizado no Brasil por Marques *et al.* (2011), no centro de Endoscopia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP, 33,4% dos pacientes que apresentaram úlcera péptica, 26,5% destes tinham úlcera duodenal. Ainda neste estudo observou-se que a prevalência da úlcera duodenal é maior na população brasileira que são infectados com a bactéria *Helicobacter pylori* associadas com a idade (54 anos) e o sexo masculino. De acordo com Sonnenberg *et al.*, (1996), 70% dos pacientes que apresentam úlcera péptica têm entre 25 e 64 anos.

A úlcera péptica causa grandes perdas econômicas e gastos com saúde por causa da baixa produtividade do trabalhador, atividades limitadas, visitas médicas e hospitalizações. Os gastos anuais com a úlcera péptica nos Estados Unidos, incluindo custos diretos e indiretos são estimados em cerca de US\$ 9,5 bilhões (Frendrick *et al.*, 2005).

Alguns indivíduos que têm úlcera péptica podem ser assintomáticos, representando um fator de risco para o paciente. Um estudo em Taiwan revelou que 67% de pacientes que apresentam úlcera péptica não apresentam sintomas notáveis (Lu *et al.*, 2004). Pacientes assintomáticos com úlcera péptica desenvolvem complicações fatais como hemorragia e perfurações (Jorde & Burhol, 1987).

As úlceras provavelmente podem resultar de vários mecanismos (Richardson, 1993). A úlcera péptica resulta da ruptura do equilíbrio existente entre os fatores agressivos (secreção e ação do ácido clorídrico e da pepsina) e de defesa (secreção e ação do muco e bicarbonato) (Klein-Jr *et al.*, 2010). Entretanto, pesquisas recentes apontam a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e o uso de drogas

antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) como os principais responsáveis para o desenvolvimento da úlcera péptica (Kang *et al.*, 2012).

Adicionalmente, outros fatores estão envolvidos na patogênese da úlcera péptica gástrica, incluindo predisposição genética, secreção ácida alterada, rápido esvaziamento gástrico, defeito nos mecanismos de defesa da mucosa, estresse físico e psicológico, tabagismo (Quan & Talley, 2002) e ingestão de bebidas contendo álcool (Zapata-Colindres *et al.*, 2006) ou cafeína (Richardson, 1993).

O estômago pode ser anatomicamente dividido em fundo, corpo e antro (Constanzo, 2007). Do ponto de vista secretor, as diferentes regiões do estômago são: a cárdia, localizada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior, contendo apenas glândulas secretoras de muco; a região oxíntica, no corpo do estômago, correspondendo a 80% da sua área total, possuindo grande número de células parietais, que secretam o HCl e o fator intrínseco, além de células principais que têm somente o pepsinogênio como produto de secreção e a região antro-pilórica, contendo glândulas com células G que secretam gastrina e células D secretoras de somatostatina (Sanioto, 2009; Constanzo, 2007).

O estômago secreta cerca de 2,5 litros de suco gástrico diariamente. A regulação da secreção de ácido pelas células parietais é importante na úlcera péptica e constitui, portanto, um alvo específico para a ação de fármacos (Rang *et al.*, 2004). A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo controlado por fatores centrais (neurais) e periféricos (endócrino e parácrino). A acetilcolina (ACh) (fator neural), gastrina (fator endócrino) e a histamina (fator parácrino) são as três substâncias químicas endógenas responsáveis por estimular a célula parietal a secretar ácido clorídrico, que atuam respectivamente sobre os receptores muscarínicos (M₃), colecistoquinina (CCKB) e histamina (H₂), localizados na membrana basolateral da célula parietal. Existem duas vias principais de sinalização na célula parietal: via dependente da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e a via dependente do Ca⁺². Enquanto histamina utiliza a primeira via, a gastrina e a ACh exercem seus efeitos por meio da última. A via dependente de AMPc resulta na fosforilação das proteínas efetoras da célula parietal e a via dependente do Ca⁺² leva à um aumento de Ca⁺² citosólico. Ambas as vias ativam a bomba protônica de hidrogênio e potássio (H⁺, K⁺ -

ATPase) localizadas em túbulos ou vesículas citoplasmáticas (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

A introdução de antagonistas dos receptores H2 e de inibidores da bomba de prótons têm sido associada com tratamentos para úlcera (Orlando *et al.*, 2007). Entretanto, o sucesso para a prevenção ou tratamento da úlcera não depende somente do bloqueio da secreção ácida, mas também dos fatores protetores da mucosa. A integridade da mucosa é mantida pelos mecanismos de defesa, os quais incluem fatores pré-epiteliais (barreira de muco e bicarbonato), barreira epitelial (superfície das células epiteliais justapostas secretando muco, gerando bicarbonato, peptídeos, prostaglandinas (PGs) e proteínas *heat shock*), renovação contínua de células (regulada por fatores de crescimento e PGE2), fluxo sanguíneo contínuo através de microvasos da mucosa, barreira endotelial, produção de PGs e óxido Nítrico (NO) (Laine *et al.*, 2008).

O muco que protege a mucosa gástrica pode ser de dois tipos: não solúvel com água e hidrossolúvel (Fromm, 1987). O muco não solúvel forma um gel fino, estável, que adere à superfície da mucosa gástrica e fornece proteção dos efeitos proteolíticos (digestão de proteínas) da pepsina. Também forma uma camada intransponível que acumula bicarbonato, formando uma interface alcalina entre o conteúdo do lúmen gástrico e a superfície mucosa. O muco hidrossolúvel é lavado da superfície mucosa e misturado ao conteúdo estomacal; sua natureza viscosa torna-o um lubrificante que previne danos mecânicos à superfície da mucosa. Adicionalmente, aos seus efeitos sobre a permeabilidade mucosa e produção de bicarbonato, agentes lesivos, tais como aspirinas e DAINEs, inibem e modificam as características do muco gástrico (Porth, 2004).

As prostaglandinas desempenham um papel importante na proteção da mucosa gástrica. Elas exercem seus efeitos através da melhora do fluxo sanguíneo, aumentando a secreção dos íons bicarbonato e estimulando a produção de muco (Porth, 2004). As DAINEs inibem a síntese das prostaglandinas, contribuindo para formação da úlcera (Wolfe *et al.*, 1999). O hábito de fumar e idade mais avançada têm sido associados com a redução das concentrações gástricas e duodenais das prostaglandinas; estas observações podem explicar a predisposição a doenças ulcerosas em fumantes e pessoas mais idosas (Cryer *et al.*, 1992).

O óxido nítrico (NO) é importante para a manutenção da integridade epitelial da mucosa gástrica do estômago (Tulassay & Herszényi, 2010), além de regular a microcirculação, motilidade gástrica, secreção ácida e muco do estômago (Desai *et al.*, 1992; Pique *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993). O NO é sintetizado pela NO sintase (NOS) a partir de oxigênio (O₂) e L-arginina. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzida (iNOS), e duas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS) e nos neurônios (nNOS) (Cho, 2001; Uchida *et al.*, 2001). O NO sintetizado no endotélio auxilia na cicatrização da mucosa gástrica devido o aumento do fluxo sanguíneo (Whittle, 1994) e angiogênese (formação de uma nova rede vascular, sendo essencial para cura de úlceras crônicas gastroduodenais) (Ziche *et al.*, 1994). Entretanto, a geração aumentada de iNOS pode contribuir para a patogênese de várias desordens gastroduodenais incluindo úlcera péptica (Souza *et al.*, 2004). Assim, o equilíbrio das expressões eNOS vs iNOS nos tecidos gástricos é crucial para a manutenção de sua integridade.

O papel gastroprotetor dos grupamentos sulfidrílicos (SH), presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema antioxidante, já foi demonstrado em modelos de indução de úlcera por etanol e DAINEs, nos quais ocorre uma depleção destes compostos (Hernandez-Munoz *et al.*, 2000; Bayir *et al.*, 2006). O pré-tratamento com bloqueadores de grupos SH, como o *N-ethylmaleimide* demonstrou potencializar significativamente a indução de úlceras gástricas (Kushima *et al.*, 2009).

A terapêutica utilizada para o tratamento das úlceras pépticas incluem os inibidores da bomba de prótons (IBP) (Oh, 2011), antagonistas de receptores H₂ (Huang & Hunt 2001), citoprotetores (Chávez-Piña *et al.*, 2011) e a erradicação das infecções por *Helicobacter pylori*, a qual utiliza uma terapia tripla, incluindo um IBP e dois antibióticos (Gisbert & Calvet, 2011). Entretanto, muitas destas drogas produzem sérios efeitos adversos.

Os supressores mais eficazes da secreção de ácido gástrico são os inibidores da H⁺, K⁺ -ATPase. Existem diferentes inibidores da bomba de prótons disponíveis para o uso clínico como, por exemplo, o omeprazol (Larsson *et al.*, 1983; Konturek *et al.*, 1984), lansoprazol (Sato *et al.*, 1989) e pantoprazol (Kromer *et al.*, 1990).

Os inibidores da bomba de prótons (IBP) são pró-fármacos que são ativados em meio ácido. Entram na célula parietal a partir do sangue e, devido sua natureza básica,

acumulam-se em canálculos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+ , K^+ -ATPase, inibindo a produção ácida (Hoogewerf & Parisha, 2003).

O lansoprazol também exerce proteção da mucosa reduzindo o estresse oxidativo e concomitantemente aumentando as defesas antioxidantes (Agnihotri *et al.*, 2007). Entre os efeitos adversos observados pelos inibidores da bomba de prótons estão osteoporose, infecção entérica, pneumonia, nefrite intersticial aguda e redução da absorção da vitamina B12 (Oh, 2011).

Os antagonistas do receptor H_2 da histamina inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores H_2 na membrana basolateral das células parietais. Os antagonistas de receptores H_2 , como a cimetidina, a ranitidina, a famotidina e a nizatidina possuem estruturas químicas diferentes que possibilitam variação nas interações com outros fármacos e alteração no perfil dos efeitos adversos (Huang, 2001; Hoogewerf & Parisha, 2003). Esses agentes são eficazes na supressão da secreção ácida noturna, a qual reflete principalmente a atividade da célula parietal basal (Huang, 2001); esse fator tem relevância clínica no tratamento da úlcera duodenal (Hoogewerf & Parisha, 2003).

Os efeitos adversos dos antagonistas do receptor H_2 incluem diarreia, cefaléia, tontura, fadiga, dor muscular e prisão de ventre. Podem ocorrer ginecomastia em homens e galactorrêia em mulheres devido à ligação da cimetidina aos receptores androgênicos e à inibição da hidroxilação do estradiol catalisada pelo citocromo P450. Em pacientes do sexo masculino há também relatos de redução na contagem de espermatozoides e impotência reversível. Esses efeitos são observados, sobretudo, após o uso prolongado de cimetidina em altas doses (Hoogewerf & Parisha, 2003).

Entre os agentes citoprotetores, destaca-se a carbenoxolona um triterpenóide semi-sintético obtido de *Glycyrrhiza glabra* (Lewis & Hanson, 1991) que apresenta ação anti-ulcerogênica (Doll *et al.*, 1962; Doll *et al.*, 1965; Dembieska-Kiec *et al.*, 1991) e aceleração no processo de cicatrização de úlceras em humanos (Doll *et al.*, 1962). A carbenoxolona exibe ação citoprotetora gástrica através da participação das prostaglandinas endógenas (Dembieska-Kiec *et al.*, 1991). O tratamento com a

carbenoxolona em ratos após injúria gástrica com etanol aumenta os níveis de óxido nítrico no tecido gástrico; este mecanismo está envolvido com a gastroproteção da carbenoxolona (Chávez-Piña *et al.*, 2011). A carbenoxolona também estimula a produção de muco que reveste e protege o estômago (Rang *et al.*, 2004).

A Carbenoxolona inibe a enzima cortisona 5 β -redutase e a 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase responsáveis pela regulação do metabolismo do cortisol e aldosterona (Baker, 1994; Dzubak *et al.*, 2006). Essa inibição aumenta a meia-vida do cortisol, o que leva a um prolongamento de sua atividade biológica. Conseqüentemente, os pacientes podem desenvolver um quadro de hiper-aldosteronismo, responsável pela encefalopatia hipertensiva, ganho de peso, edema e hipertensão (Lewis & Hanson, 1991; Farina *et al.*, 1998; Dzubak *et al.*, 2006).

A erradicação das infecções por *H. pylori* utiliza uma terapia tripla, um IBP combinado com dois antibióticos geralmente claritromicina com amoxicilina (Malfertheiner *et al.*, 2007). Entretanto, a resistência das bactérias aos antibióticos é provavelmente a causa de falha na terapêutica em pacientes com doenças infecciosas, especialmente a infecção por *H. pylori* (Graham, 1998; Megraud, 1998; Megraud, 2004). A cura para úlcera péptica através da terapia tripla usualmente utilizada para a infecção por *H. pylori* é menor quando comparada com outras infecções bacterianas (Gisbert & Calvet, 2011). Nas infecções bacterianas a expectativa para a cura é de 95% a partir da primeira terapia (Graham & Shiotani, 2008). Entretanto, num estudo realizado por Gisbert & Calvet (2011) em pacientes espanhóis, observou-se que não há uma evidência definitiva de uma taxa decrescente na erradicação da *H. pylori* nos últimos anos com a terapia tripla padrão, o que torna evidente a necessidade de novas estratégias terapêuticas.

3. Radicais Livres

Radical livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química dos átomos ou moléculas (Júnior, 1998). O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição (Júnior, 2001).

Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e é identificado como fator relaxante do endotélio e vasodilatador (Júnior, 2001). Estes radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados EROs (espécies reativas do oxigênio) e ERNs (espécies reativas do nitrogênio). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana (Barreiros & David, 2006).

O ataque dos radicais livres sobre os lipídeos de membrana gera o processo de peroxidação lipídica, dando lugar a uma reação em cadeia que perpetua o ciclo de formação destes agentes agressores, ao mesmo tempo em que origina uma desestruturação da membrana e a conseqüente morte celular. Os radicais livres podem também reagir com proteínas, dando lugar a alterações da funcionalidade normal da célula. Finalmente, quando os ácidos nucleicos são afetados pelos radicais livres, pode-se originar uma síntese protéica defeituosa ou o aparecimento de mutações no material genético celular, com conseqüente perigo de desenvolvimento de processos do tipo tumoral (Roessner *et al.*, 2008).

Os principais radicais livres observados na doença inflamatória intestinal são o óxido nítrico (NO), superóxido (O_2^-), peróxido de nitrito ($ONOO_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hipoclorito (OCl^-) (McKenzie *et al.*, 1996) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Kettle & Winterbourn, 1991), sendo os neutrófilos na Retocolite ulcerativa e os monócitos na Doença de Crohn, a principal fonte para a produção destes radicais livres (Karp & Koch, 2006), principalmente após a instalação da doença. O HOCl é um oxidante produzido por neutrófilos, a partir do H_2O_2 e do Cl^- pela enzima mieloperoxidase (MPO), e contribui para os danos produzidos nas células inflamatórias (Kettle & Winterbourn, 1991).

Os radicais livres derivados do oxigênio também apresentam um importante papel na patogênese da úlcera gástrica induzida por isquemia-reperusão (Perry *et al.*,

1986), etanol e drogas antiinflamatórias (Del Soldato *et al.*, 1986; Pihan *et al.*, 1987) em ratos. A geração excessiva de radicais livres de oxigênio, resultado do consumo do etanol, aumenta o processo de peroxidação lipídica e diminui as defesas do sistema antioxidante do estômago (Cadirci *et al.*, 2007). Além disso, os radicais livres gerados por neutrófilos podem estar relacionados a um retardo na cicatrização de úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos (Shii *et al.*, 1992).

De fato, há uma relação existente entre o aumento nos níveis de radicais livres na DII (Kruidenier & Verspaget, 2002) e na úlcera péptica (Hamaishi *et al.*, 2006). Em adição, estudos sugerem que tanto os danos intestinais nas DII como os prejuízos da mucosa na úlcera péptica estão relacionados com o aumento da produção de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes endógenas (Koutroubakis *et al.*, 2004; Alimi *et al.*, 2011).

4. Antioxidantes

Com base no exposto acima, observa-se que a produção excessiva ou o descontrole na regulação dos radicais livres estão relacionados com as doenças inflamatórias intestinais e úlcera péptica. Sendo assim, é essencial que as células e tecidos possuam um sistema de defesa para controlar os níveis de radicais livres e evitar esses processos inflamatórios. Para isso as células dispõem de um sistema de defesa antioxidante que pode ser classificado como enzimático ou não-enzimático (Kruidenier & Verspaget, 2002).

O sistema de defesa enzimático está presente nas células de mamíferos e consiste de um importante componente de defesa contra radicais livres. Entre as principais enzimas deste sistema estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx). Além disso, antioxidantes não-enzimáticos endógenos, como a glutatona reduzida (GSH), e os antioxidantes não-enzimáticos encontrados nas frutas, vegetais e extratos de plantas, alguns minerais como zinco, vitamina E, C e os flavonóides auxiliam no combate aos radicais livres (Kruidenier & Verspaget, 2002).

A GSH mostra um papel chave no estado “redox” das células através de alguns mecanismos, incluindo proteção das células contra as espécies reativas de oxigênio e manutenção da enzima GSH peroxidase (Sies, 1999). A diminuição dos níveis de GSH

são indicativos de estresse oxidativo e têm sido detectados na DII em humanos (Hamer *et al.*, 2009), na colite experimental (Witaicenis *et al.*, 2010; Luchini *et al.*, 2008; Di Stasi *et al.*, 2004), úlcera péptica em ratos (Santos *et al.*, 2012) e úlcera gástrica em humanos (Bhattacharjee *et al.*, 2002).

Com base no exposto, a inibição ou neutralização dos radicais livres, juntamente com a ativação dos sistemas antioxidantes endógenos, pode ser benéfico no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (Hamer *et al.*, 2009) e na úlcera (Bhattacharjee *et al.*, 2002), sendo esta uma importante abordagem para a pesquisa de novos fármacos.

5. Polifenóis na terapêutica

Os polifenóis são fitoquímicos abundantes em alimentos e bebidas derivados de plantas. O consumo de polifenóis parece proteger contra doenças, em virtude de suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (Marrugat *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2007).

Os flavonóides constituem um importante grupo de compostos polifenólicos amplamente distribuídos na natureza e que manifestam uma importante atividade antioxidante (Formica & Regelson, 1995; Cook & Saman, 1995), além de terem a capacidade de inibir algumas enzimas, como a ciclooxigenase (COX) e a 5-lipoxigenase, cuja atividade se encontra aumentada em processos inflamatórios, assim como modular a atividade de células do sistema imune (Middleton & Kandaswami, 1993).

Outros compostos polifenólicos são os taninos, um grupo diverso de metabólitos secundários presentes em plantas. Tradicionalmente, os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos condensados (proantocianidinas) e hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) (Santos & Mello, 2010). Estão presentes na maioria das plantas, podendo variar de concentração nos tecidos vegetais, dependendo da idade e tamanho da planta, parte coletada, época ou, ainda, do local de coleta (Teixeira *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1999).

Acredita-se que os taninos exercem seus efeitos terapêuticos na saúde humana, pelo menos em parte, em virtude de três características gerais que são comuns em maior ou menor grau, aos dois grupos de taninos: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, alumínio, cálcio, entre outros), 2) atividade

antioxidante e seqüestradora de radicais livres e, 3) habilidade de se complexar com outras moléculas como proteínas e polissacarídeos (Santos & Mello, 2010). Esta última característica é particularmente importante no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamação, através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, ocorrendo, abaixo desta, o processo natural de cura (reestruturação do epitélio e formação de vasos). Processo similar ocorre em casos de úlcera gástrica em que a camada tanino/proteína complexados protege a mucosa do estômago (Audi *et al.*, 1999). Alguns grupos de taninos também agem no metabolismo do ácido araquidônico, em leucócitos, exercendo um importante papel na reversão da inflamação (Okuda, 2005).

Na DII, diferentes compostos polifenólicos, como flavonóides (Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Gálvez *et al.*, 1997; Crespo *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2001; Sanchez de Medina *et al.*, 2002), a isocumarina paepalantina (Di Stasi *et al.*, 2004), a cumarina e a 4-hidroxicumarina (Luchini *et al.*, 2008), a esculetina e a 4- metilesculetina (Witaicenis *et al.*, 2010) têm mostrado efeitos benéficos nos modelos de colite agudo e crônico. Os polifenólicos como as xantonas, saponinas, triterpenóides, flavonóides (Lewis & Hanson, 1991) e taninos (Vasconcelos *et al.*, 2010) são referidos como compostos antiulcerogênicos.

6. Fibras na terapêutica

O consumo adequado de fibras da dieta vem sendo recomendado pelas agências de saúde pública governamental como um meio de manter e melhorar o bem-estar (Brownawell *et al.*, 2012). Alguns estudos epidemiológicos mostram que o consumo de fibras pode evitar o risco de desenvolver algumas doenças crônicas (Slavin, 2008).

Em 2002, uma nova definição para fibras foi publicado pelo Instituto de medicina dos Estados Unidos (Institute of Medicine, 2002). A fibra alimentar consiste de carboidrato não digerível e lignina. A fibra funcional consiste somente de carboidrato não digerível. A fibra total é a soma da fibra alimentar com a fibra funcional. A fibra alimentar presente em plantas inclui: celulose, pectina, gomas, hemicelulose, b-glucano, lignina e alguns amidos resistentes. A fibra funcional

presente em plantas inclui amido resistente, pectina e gomas (Institute of Medicine, 2002).

Quanto à solubilidade, as fibras podem ser classificadas em fibras solúveis (FS) e fibras insolúveis (FI) de acordo com a solubilidade de seus componentes em água. A maior parte das pectinas, gomas e certas hemiceluloses são FS, enquanto celulose, algumas pectinas, grande parte das hemiceluloses e lignina são FI (Cavalcanti, 1989; Asp *et al.*, 1992)

A fermentação das fibras ocorre no cólon pela ação das bactérias anaeróbicas. O grau de fermentação colônica das fibras sofre interferência da composição da microbiota intestinal e características químicas e físicas, ou seja, o tipo de fibra, solubilidade, fonte, forma e o tamanho das partículas (Coppini *et al.*, 2004). Entre os produtos da fermentação bacteriana das fibras estão os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); os mais importantes da fermentação das hemiceluloses e pectinas são o ácido acético, butírico e propiônico. São removidos do lúmen intestinal por difusão iônica e facilitam a absorção do sódio e potássio (Coppini *et al.*, 2004).

A fibra alimentar tem mostrado ser benéfica na manutenção da remissão na colite ulcerativa humana e experimental e seu efeito protetor tem sido relacionado a um aumento na produção de ácido graxo de cadeia curta no lúmen intestinal, incluindo acetato, propionato e butirato (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002). O butirato têm sido relatado como um fator importante na manutenção da função da mucosa do cólon e principal fonte de combustível dos colonócitos (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2005). Estudos sugerem que alguns produtos do alimento, incluindo a fibra alimentar, cevada germinada, inulina, lactulose e polidextrose exercem efeitos benéficos no processo inflamatório intestinal humano e experimental (Kanauchi *et al.*, 2001; Kleessen *et al.*, 2001; Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002; Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2003; Gálvez *et al.*, 2005; Camuesco *et al.*, 2005; Witaicenis *et al.*, 2010).

As fibras solúveis de frutas e vegetais parecem proteger também contra a úlcera duodenal (Misciagna *et al.*, 2000). A capacidade protetora das fibras presentes na cevada foi observada em ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por estresse, mostrando forte atividade antiulcerogênica (Yoshizawa *et al.*, 2004). Dunjic *et al.* (1983), estudando a pectina da banana verde em ratos, observaram que esta fibra solúvel pode proteger a mucosa gástrica por aumentar a camada de muco. Efeito

semelhante foi obtido por Souza Brito *et al.* (1997) ao estudarem a banana verde como agente antiulcerogênico em ratos.

7. Planta selecionada para o estudo: *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne

De acordo com as informações apresentadas acima, novos compostos com atividade antioxidante representam uma importante estratégia na obtenção de novos fármacos ativos para a DII e para úlcera péptica. Sendo assim, investigar as plantas medicinais tem-se tornado alvo de estudo para o tratamento destas doenças.

Hymenaea stigonocarpa (Figura 1) pertence à família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, é uma das famílias botânicas que apresentam ampla distribuição geográfica (Faria *et al.*, 2006). *H. stigonocarpa* conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado, jataí ou jutaí, é uma espécie arbórea, heliófila, de até 12 m de altura e se distribui nas regiões sazonais, no cerradão e no cerrado *sensu stricto* do centro e sudeste do Brasil (Ratter *et al.*, 1996). Floresce entre os meses de dezembro e fevereiro e frutifica entre setembro e novembro, apresentando frutos com formato aproximadamente cilíndrico a oblongo (Lee & Langenheim, 1975) com comprimento entre 6 e 18 cm e 3 a 6 cm de diâmetro (Rizzini, 1971; Silva *et al.*, 1994). Suas sementes são grandes, e sua madeira é de alta densidade (aproximadamente 0,90 g.cm⁻³) (Carvalho, 2007).

De acordo com dados etnofarmacológicos as cascas do caule e os frutos de *H. stigonocarpa* são usados para o tratamento da tosse, bronquite, dor de estômago, contusão, fratura, fortificante, sinusite, vermífugo, úlceras, diarreia e como antiinflamatória (Grandi *et al.*, 1989; Pott & Pott, 1994). A casca do caule, frutos, seiva e resina de *H. stigonocarpa* são usadas na forma de decocção, xarope, infusão, cataplasma ou pomada (Grandi *et al.*, 1989).

O fruto desta espécie (Figura 1 C) é em forma de vagem arredondada, de cor escura e possui sementes envolvidas por uma polpa amarelo-pálida, farinácea, adocicada, comestível, de sabor e aroma característicos. Esta polpa é bastante apreciada na culinária regional, podendo ser consumida *in natura* ou utilizando sua farinha para a elaboração de bolos, pães, biscoitos, mingaus, dentre outras iguarias (Andersen & Andersen, 1988; Almeida, *et al.*, 1998).

A caracterização química e centesimal da farinha do fruto de *H. stigonocarpa* foi realizado por Silva (2001), cujos resultados apontam um alto teor de fibra. Segundo a autora, a farinha do jatobá possui um alto teor de fibra alimentar e baixo conteúdo de proteínas, quando comparadas com outras leguminosas. Entre os minerais encontrados na farinha do fruto de *H. stigonocarpa* estão o potássio, magnésio, cálcio, fósforo, zinco, ferro e o sódio (Silva, 1997).

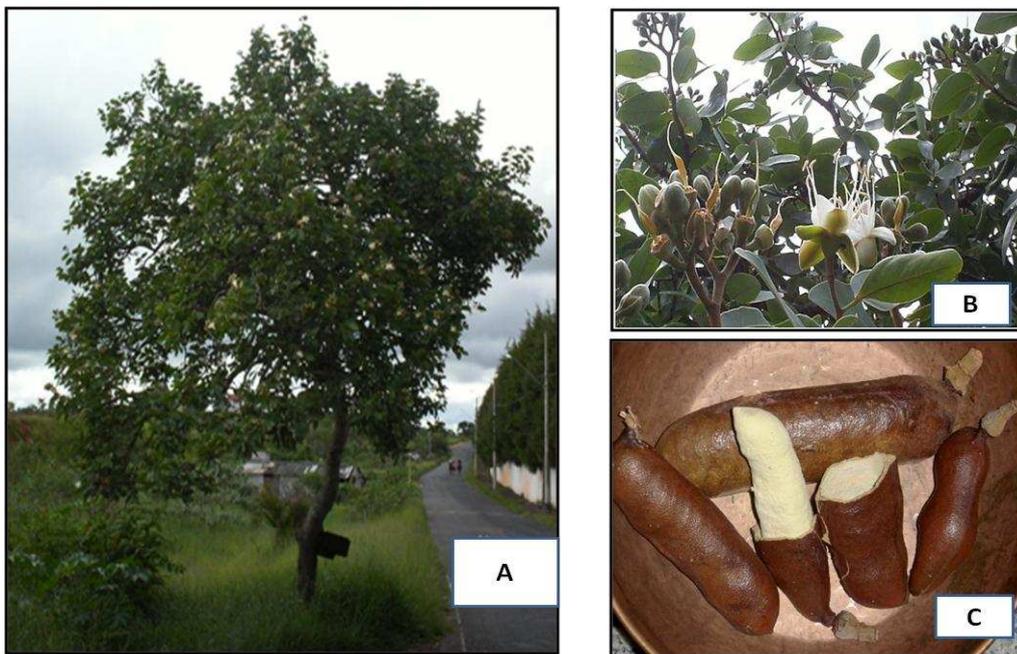


Figura 1. Fotos de *Hymenaea stigonocarpa*: (A) Árvore mostrando Folhas e flores , (B) detalhe das flores, (C) fruto. Fonte (A) e (B) fotos de Patricia Rodrigues Orsi(C) foto de Tânia Agostini-Costa

II. Objetivos gerais e específicos

O objetivo geral do presente projeto foi estudar a planta *Hymenaea stigonocarpa* que apresenta indicações etnofarmacológicas para úlcera, diarreia e inflamação, mas sem evidência farmacológica para estes efeitos. Sendo assim, investigar esta espécie como um potencial terapêutico para o tratamento e/ou prevenção das úlceras gástricas e duodenais e na colite experimental oferece uma nova opção terapêutica, visto que os fármacos de referência utilizados para estas doenças produzem efeitos adversos.

Com base no exposto os objetivos específicos do presente trabalho foram:

1. Avaliar os efeitos de *Hymenaea stigonocarpa* no processo inflamatório intestinal induzido por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Para esta proposta foram avaliados os efeitos da administração oral do extrato metanólico da casca do caule (EMHs) e da dieta com a farinha da polpa do fruto (DFHs) de *H. stigonocarpa*.

2. Avaliar os efeitos do EMHs e da DFHs sobre os parâmetros clínicos, macroscópicos e bioquímicos envolvidos no processo inflamatório colônico.

3. Investigar a ação antidiarréica do EMHs em camundongos e seus efeitos gastroprotetores, anti-secretório e cicatrizantes no estômago e no duodeno de ratos.

4. Investigar o efeito da motilidade intestinal do EMHs em camundongos.

5. Investigar a ação cicatrizante da DFHs na úlcera gástrica e duodenal em ratos.

6. Avaliar os efeitos do EMHs e da DFHs sobre os parâmetros toxicológicos, macroscópicos e bioquímicos na lesão gástrica e duodenal.

III. Material e Métodos

1. Coleta da planta

As cascas do caule e o fruto de *Hymenaea stigonocarpa* foram coletados em Botucatu, São Paulo, em março de 2009. A autenticação botânica da espécie foi realizada pelo botânico Prof. Dr. Osmar Cavassan. A exsicata da espécie está depositada no Herbário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp- Campus de Bauru) sob o número 5691.

2. Preparação do extrato metanólico da casca do caule (EMHs) e da dieta com a polpa do fruto (DFHs) de *H. stigonocarpa*

Após a coleta, as cascas foram secas em estufa (50 °C) e moídas, enquanto que os frutos foram previamente abertos para remoção das sementes e então a polpa igualmente seca e moída, obtendo-se 1545 g de pó das cascas e 1206 g de pó dos frutos. O pó das cascas foi submetido ao processo de extração por maceração com metanol anidro (24h de contato com o solvente, 1,5 L de líquido extrator, três repetições). O material pulverizado (farinha do fruto), foi adicionado na ração Labina-Purina numa proporção de 5 e 10% e misturado com água (secagem a 40°C, por 48h).

3. Caracterização química e composição nutricional de *H. stigonocarpa*

A caracterização fitoquímica qualitativa foi realizada com o extrato da casca do caule e da polpa dos frutos a fim de serem identificados os principais grupos de metabólitos secundários presentes. Esta abordagem tem por base a observação de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característicos para algumas classes de substâncias (Wagner *et al.*, 1984; Matos, 2009). Dessa forma, os testes visaram à identificação de compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas, taninos, antraquinonas, cumarinas, terpenos, glicosídeos cardiotônicos, alcalóides, saponinas e glicosídeos cianogênicos. Para isso, alíquotas de 5g do extrato metanólico da casca e da polpa do fruto foram solubilizados em etanol 70%, sonicadas por dois minutos e utilizadas nesta etapa do estudo.

Complementariamente foram determinados os perfis cromatográficos (do inglês *fingerprint*) do extrato da casca e da polpa do fruto. Para isso, uma alíquota de 20 mg do extrato da casca do caule e da polpa do fruto de *H. stigonocarpa* foi

solubilizada em 400 µL de metanol (MeOH) com auxílio de ultrassom e submetida à etapa de *clean up* em cartucho Agilent SampliQ C₁₈ (1 x 1,1 cm d.i.), utilizando 1600 mL de MeOH como eluente. As soluções resultantes foram filtradas em microfiltro Millipore de Politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,22 µm e utilizadas nas análises por HPLC-UV-PAD. O sistema de eluição foi otimizado no modo gradiente, utilizando-se como solventes acetonitrila (Solvente B) e água (Solvente A), ambos acidificados com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). O monitoramento dos picos eluídos foi feito por varredura na faixa espectral de 200-400 nm e o registro final dos cromatogramas feito em 254 nm por exibir o maior número de picos.

A composição química da dieta com a farinha da polpa de fruto de *H. stigonocarpa* (DFHs) foi calculada a partir dos nutrientes contidos na Ração Labina-Purina com a adição de 5 e 10% da farinha do fruto (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da ração Labina-Purina, e da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto nas proporções 5 e 10% (DFHs) (g/100g).

Ingredientes	Ração Labina-Purina	DFHs 5%	DFHs 10%
Proteína	23,00	21,85	20,70
Minerais ¹	12,00	11,40	10,80
Fibras	5,00	4,75	4,50
Vitaminas ²	1,00	0,95	0,90
Gordura	10,00	9,50	9,00
Ácidos graxos	5,50	5,22	4,95
Amido de milho	32,00	30,4	28,80
Açúcar	6,00	5,7	6,0
Farelo de soja	2,50	2,37	2,25
Farelo de trigo	3,00	2,85	2,70
Farinha do fruto	-	5,00	10,00

¹ Minerais (mg/Kg): Mg (1,7); Mn, 110,0; I, 1,0; Co, 2,0; Fe, 180,0; Zn, 110,0; Cu, 30,0; Se, 0,2; Na, 2,8; P, 8,5; Ca, 13,0.

² Vitaminas (mg/Kg/dieta): vitamina A (25600 UI); vitamina D3 (4000 UI); vitamina E (82 mg); vitamina K (6.4 mg), vitamina B12 (40 µg); vitamina B6 (11 mg), ácido fólico (13 mg); colina (2800 mg), biotina (0.16 mg), niacina (220mg), tiamina (11 mg) e ácido pantotênico (90 mg).

A Farinha do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* (g/100g) contém: proteína bruta (7,6%), lipídeos (3,03%), cinzas (4,60%), fibra solúvel (11,01%), fibra insolúvel (42,86%) e carboidratos (18,54%); minerais em mg/100g : potássio (1121); magnésio (125); cálcio (134); fósforo (96); zinco (1,36); ferro (1,2); sódio (7 mg).

4. Biomonitoramento por atividade antioxidante

4.1. Modelo de lipoperoxidação em membranas de cérebro de ratos

O modelo *in vitro* adotado neste estudo seguiu o protocolo de acordo com Witaicenis *et al.*, 2010 adaptado da técnica descrita por Stocks *et al.* (1974). A avaliação da atividade antioxidante neste estudo se baseia na determinação colorimétrica do malonildialdeído (MDA) formado após a peroxidação lipídica induzida em membranas celulares. A peroxidação lipídica é classicamente determinada pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA).

Nestes experimentos, foram utilizados cérebro de ratos branco (livre de qualquer procedimento experimental). Os cérebros foram pesados e triturados com homogeneizador automático, em gelo, com tampão PBS na proporção 1:4 (p/v) (19 partes da solução A - NaH_2PO_4 10 mM, e 81 partes da solução B - Na_2HPO_4 10 mM, pH 7). O homogenato foi submetido à centrifugação a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e estocado à -80°C em alíquotas de 1mL. Para a realização do ensaio, o homogenato estocado foi descongelado em temperatura ambiente e diluído em PBS na proporção 1:10 (v/v). A reação de lipoperoxidação foi realizada em tubos *ependorf* de 2 mL. Os grupos testes foram: Branco com incubação, branco sem incubação, controle incubado (DMSO 20%, solvente usado para solubilizar o EMHs e a polpa do fruto), controle não incubado, controle máximo (tecido, sulfato férrico e ácido ascórbico) e tubos testes (utilizando-se de 5 a 8 concentrações do EMHs e da polpa do fruto em soluções de reação e quercetina com 5 concentrações de 2,5 a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em soluções de reação). Para cada amostra, exceto nos brancos, foi adicionado 50 μL da solução de sulfato ferroso ($\text{SO}_4\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$) e ácido ascórbico, ambos para provocar a lipoperoxidação. Os *ependorffs* com as soluções foram incubados á 37°C por 12 minutos em banho-maria sob agitação constante. Em seguida foi adicionado 0,5 mL do ácido tiobarbitúrico (TBARS) 0,5% em ácido tricloroacético (TCA) 20%. Os tubos foram fechados e colocados novamente sob aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos sem agitação. Alíquotas de 1mL foram colocados em *ependorff* de 1,5 mL e centrifugados a 3000rpm, por 15 minutos a 4°C. Foi retirado 200 μL do sobrenadante da amostra e colocado em placa de 96 poços para realização de leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 532nm. O cálculo da porcentagem de

inibição da produção de malonildialdeído foi calculado em relação aos valores obtidos com as amostras do controle máximo (cérebro, ferro e ácido ascórbico a 100µM) e a IC₅₀ determinada por regressão.

4.2. Avaliação da atividade sequestradora de radicais livres com DPPH•

A atividade seqüestradora de radicais livres foi avaliada segundo as metodologias de Blois (1958) e Brand-Willians *et al.* (1995), adaptado para microplaca de 96 poços. As medidas foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 517 nm, tendo como controle positivo padrão o ácido gálico (0 a 15 µM/mL em metanol 70%). O extrato metanólico da casca do caule e do fruto (em metanol 70%) foi preparado nas concentrações de 0 a 900 µg/mL. Em 100 µL das amostras-testes adicionou-se 200 µL da solução de DPPH (100 µM, 40 µg/mL). As medidas das absorvâncias das misturas reacionais foram feitas após 30 minutos de incubação, ao abrigo da luz. Utilizou-se como controle a mistura de metanol 70% (100 µL) com DPPH (200 µL). Os testes foram realizados em triplicata. A partir dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada é determinada a atividade seqüestradora de radicais livres (ou como percentuais de DPPH• remanescentes % DPPH_{REM}), conforme a equação:

$$\%ASRL = [(A_C - A_{\text{amostra ou padrão}})/A_C] \times 100$$

$$A_C = \text{Média da absorvância do DPPH + metanol 70\%}$$

$$A_{\text{amostra ou padrão}} = \text{Média da absorvância da amostra analisada}$$

Os resultado final foi expresso como CE₅₀ (Concentração Eficiente) da amostra-teste por regressão linear da equação gerada do gráfico %SRL *versus* concentração das amostras ou padrão. A CE₅₀ refere-se à quantidade necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%.

5. Procedimentos experimentais

5.1. Fármacos utilizados

Todos os produtos químicos foram fornecidos pela Sigma (Sigma, Chemical Co, St. Louis, USA). Nos experimentos de colite experimental prednisolona e sulfasalazina foram utilizados como controle positivo. Nos experimentos de úlcera gástrica e

duodenal, cimetidina, carbenoxolona ou lansoprazol foram usadas como controle positivo. Todos os fármacos foram administrados por via oral, em dose-volume de 10 mL/Kg. Nos experimentos foi utilizado um grupo controle (negativo) que recebeu solução salina 0,9%. A salina foi utilizada como veículo na qual foi solubilizado o extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (EMHs) e os fármacos.

5.2. Animais

Para o estudo da atividade antiinflamatória intestinal de *H. stigonocarpa* foram utilizados Ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar (180-200 g). Para o estudo da atividade antiulcerogênica utilizou-se ratos machos (150-250 g) e para o estudo de toxicidade aguda foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos e fêmeas, da linhagem Swiss (25–35 g). Para avaliar a motilidade intestinal e diarreia foram utilizados camundongos machos (25–35 g). Os animais utilizados foram providos do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu - São Paulo. Os animais foram aclimatados às condições do biotério do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, por um período de 20 dias antes dos experimentos. Este biotério possui uma temperatura ambiente controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os ratos e camundongos ficaram alojados em caixas, separados por grupo, com no máximo seis animais, e nos experimentos com a dieta ficaram em caixas individuais. Os animais foram alimentados com ração de manutenção Labina-Purina e água corrente *ad libitum*. O período de jejum está de acordo com o utilizado para cada metodologia e especificado nos respectivos itens. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal deste Instituto (Protocolo n. 42/04 – CEEA).

5.3. Toxicidade aguda e “Screening” hipocrático

Estudos foram realizados a fim de se constatar possíveis efeitos tóxicos agudos do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (EMHs) que podem estar relacionados a alterações de comportamento, a ocorrência de mortes e de modificações macroscópicas dos órgãos.

Camundongos machos e fêmeas foram divididos em grupos (n=10) e receberam os respectivos tratamentos: veículo salina (controle) ou EMHs na dose única submáxima de 5000 mg/Kg. Os tratamentos foram realizados por via oral e os parâmetros comportamentais observados, foram aqueles descritos por Souza Brito (1994), sendo as análises feitas aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração do EMHs. Os parâmetros de toxicidade aguda foram monitorados através do registro do número de mortes de animais por grupo. Como parâmetro adicional de toxicidade, o peso dos animais foi monitorado durante 14 dias após o início do experimento e ao final deste período todos os animais foram mortos para análise dos órgãos: coração, fígado, rins, pulmão, baço, testículos (macho) e ovários (fêmeas). Estes foram devidamente pesados, no intuito de se avaliar possíveis alterações morfológicas detectadas macroscopicamente.

5.4. Estudo da atividade de *H. stigonocarpa* em modelo de inflamação intestinal induzida por TNBS.

5.4.1. Desenho experimental:

5.4.1.1. Avaliação da atividade do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (EMHs) na fase aguda do processo inflamatório intestinal.

Na fase aguda os estudos foram realizados com os seguintes grupos experimentais (n=7):

- A. Grupo branco: animais sem colite e sem tratamento
- B. Grupo controle: animais com colite e sem tratamento
- C. Grupo tratado com o EMHs nas doses de: 100, 200 e 400 mg/Kg
- D. Grupo com os fármacos:
 - D1. Animais tratados com prednisolona 2mg/Kg
 - D2. Animais tratados com sulfassalazina 25 mg/Kg

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris *et al.* (1989), com pequenas modificações. Os animais foram submetidos a um período de jejum de 24 horas e posteriormente anestesiados com éter e mortos em câmara de gás CO₂.

Em seguida, foi realizada a administração retal (intracolônica) de 0,25mL de uma solução de 10mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol a 50% v/v. A administração foi realizada com a ajuda de um catéter (diâmetro de 2mm), o qual foi introduzido pelo ânus do animal até uma distância de 8cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do hapteno até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo branco foram submetidos ao mesmo procedimento, mas com administração de solução salina em substituição ao TNBS.

Os tratamentos foram administrados por via oral utilizando-se uma sonda esofágica, e foram realizados às 96, 72, 48, 24 e 2 horas antes da indução da colite, assim como dois dias depois. Os animais dos grupos controle e branco receberam salina por via oral. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução do processo inflamatório. Como padrão de comparação utilizou-se o grupo controle, o grupo branco e grupo dos fármacos de referência.

5.4.1.2. Avaliação da atividade da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto *H. stigonocarpa* (DFHs) no processo inflamatório intestinal.

Os grupos utilizados para este experimento foram (n=7):

- A. Grupo branco: animais sem colite e sem tratamento
- B. Grupo controle: animais com colite e sem tratamento
- C. Grupo tratado com DFHs nas proporções 5 e 10%

Os ratos foram divididos em quatro grupos com sete animais em cada grupo. O grupo branco recebeu a ração Labina-Purina (dieta normal) por 23 dias. O grupo controle colítico também recebeu dieta normal por 21 dias antes da indução da colite, assim como, dois dias depois. Dois grupos receberam a DFHs nas proporções 5 e 10% nas mesmas condições que o grupo controle colítico. A DFHs foi colocada na gaiola como alimento (40 g diário) e os animais foram colocados em caixas individuais para monitoramento do consumo. Todos os animais foram mortos 48 horas após a indução da colite em câmara de gás CO₂. Como padrão de comparação utilizou-se o grupo controle e o grupo branco.

5.4.2. Avaliação do processo inflamatório intestinal

Ao final de cada período de tratamento, os animais foram mortos, os cólons retirados e analisados quanto aos prejuízos intestinais considerando-se parâmetros macroscópicos e bioquímicos.

5.4.2.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos do cólon, consumo alimentar e do peso corporal

Durante o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram avaliados em diferentes parâmetros de caráter geral tais como: consumo de alimento, peso corporal e aparecimento de fezes diarréicas. Na análise macroscópica foram avaliados o peso e o comprimento do cólon, a existência de aderências entre o intestino e órgãos adjacentes e a análise da severidade e extensão do prejuízo intestinal, de acordo com uma escala descrita previamente por Bell *et al.* (1995) (Tabela 2), que determina tanto a gravidade como a extensão da lesão intestinal.

Tabela 2. Critério de avaliação da severidade e extensão da lesão colônica.

Escore	Critério
0	Sem prejuízo
1	Hiperemia, sem úlceras
2	Úlcera linear sem inflamação significativa
3	Úlcera linear com inflamação em um sítio
4	Dois ou mais sítios de ulceração/inflamação
5	Dois ou mais sítios de ulceração e inflamação ou um sítio de inflamação maior que 1 cm ao longo da extensão do cólon
6-10	Se o prejuízo cobrir mais que 2 cm ao longo da extensão do cólon (o escore é aumentado em 1 ponto para cada centímetro adicional)

Após a análise macroscópica, o cólon foi dividido em quatro fragmentos longitudinais, três deles foram congelados a -80°C para determinação de proteínas e a atividade da fosfatase alcalina, mieloperoxidase, conteúdo de malonildialdeído

colônico, enquanto um fragmento foi processado para determinação dos níveis de glutathiona total.

5.4.2.2. Determinações bioquímicas

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica, sendo estes realizados a frio durante aproximadamente 45 segundos, com ajuda de um homogeneizador automático, provido de um pistilo de téflon e um recipiente de vidro de 10mL de capacidade.

A. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase em fragmentos de cólon de rato foi realizada pelo método de Krawisz *et al.* (1984) e os resultados expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido, onde 1 unidade de atividade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25°C. A atividade da mieloperoxidase se utiliza como marcador da infiltração de neutrófilos, mesmo que esta enzima não seja específica deste tipo celular.

B. Determinação do conteúdo de glutathiona total

A determinação do conteúdo de glutathiona total foi realizada de acordo com o método descrito por Anderson (1985), que está baseado na oxidação total da glutathiona reduzida (GSH) presente em uma amostra à sua forma oxidada (GSSG), mediante a incubação da amostra com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). O DTNB reduzido adquire uma coloração amarelada, que pode ser determinada espectrofotometricamente. A GSSG gerada é reduzida por ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADPH. A GSH formada se oxida novamente, gerando um ciclo contínuo, no qual a velocidade de redução do DTNB (com o seu conseqüente incremento de absorbância a 412nm) é proporcional à quantidade total de glutathiona (GSH+GSSG). Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido.

C. Determinação de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina

A determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade da fosfatase alcalina foi realizada pelos métodos clássicos descritos por Smith *et al.* (1985) e Bessey *et al.* (1946), respectivamente.

D. Determinação do conteúdo de malonildialdeído (MDA) colônico

A determinação do conteúdo de malonildialdeído colônico foi realizada de acordo com o método descrito por Zingarelli *et al.* (1999), seguindo algumas modificações.

As amostras de tecido foram homogeneizadas em solução de KCl 1.15% na proporção de 1:5. O homogenato foi centrifugado a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Foram utilizados 400µL do sobrenadante, que foi adicionado em tubo de vidro com tampa de rosca, onde também foram adicionados 200 µL de lauril sulfato de sódio 8,1%, 1500 µL de ácido acético 20%, pH 3.5, 1500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% diluído em ácido acético e 400 µL de água destilada. Para curva padrão, foram utilizados 100 µL de diferentes concentrações de malonildialdeído, 700µL de água destilada e os demais reagentes.

Os frascos contendo essa mistura foram colocados em banho-maria a 95°C durante uma hora. Após isso as amostras foram transferidas para *ependorffs* e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos; 200 µL do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532nm. O valor da concentração de MDA foi multiplicado por 50 e os resultados foram expressos em nanomoles/grama de tecido.

5.5. Determinação da motilidade intestinal

Seguindo o método descrito por Stickney & Northup. (1959), camundongos Swiss macho, em jejum de seis horas e divididos em cinco grupos (n=7), receberam seus respectivos tratamentos por via oral: salina, morfina 2,5 mg/Kg ou EMHs nas doses 100, 150 e 200 mg/Kg. Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% por via oral num volume de 10mL/Kg. Os animais foram sacrificados 30 minutos após o último tratamento. O passo seguinte foi retirar todo o intestino

delgado juntamente com o estômago, para medir o comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado. Os dados obtidos foram transformados na razão da distância percorrida pelo carvão pelo comprimento total do intestino para análise estatística.

5.6. Avaliação da Diarréia

Cinco grupos de camundongos Swiss (n=7) foram tratados por via oral com salina, EMHs (100, 150 e 200 mg/Kg) ou loperamida (5 mg/Kg) 30 minutos antes da administração do óleo de rícino (0,2 mL/animal). Imediatamente após a ingestão do óleo de rícino, cada animal foi colocado em caixa individual, cujo fundo da caixa foi forrado com papel, e os animais foram observados por cinco horas. Os seguintes parâmetros foram monitorados: tempo inicial da evacuação (minuto), classificação da evacuação - 1 (fezes normal), 2 (fezes semi-sólida), e 3 (fezes líquida) e índice da evacuação (IE), expressas de acordo com a fórmula: $IE = 1 \times (n^{\circ} \text{ fezes } 1) + 2 \times (n^{\circ} \text{ fezes } 2) + 3 \times (n^{\circ} \text{ fezes } 3)$ (Awouters, 1978, modificado por Mukherjee *et al.*, 1998).

5.7. Estudo da Atividade Antiulcerogênica

5.7.1. Avaliação das lesões

Cada modelo experimental apresenta os seus respectivos grupos controle positivo (cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona) e negativo (salina) dependendo da especificidade de cada modelo. Os animais, antes de cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum*. Após cada experimento os animais foram mortos com gás CO₂, os estômagos foram cortados ao longo da grande curvatura, levemente lavados com água e pressionados sob uma placa de vidro e escanados. As lesões ulcerogênicas foram medidas através do programa AvSoft[®] Bioview Spectra, Brasil e expressas em mm². Em alguns modelos que estão especificados abaixo, o estômago ou o duodeno foram cortados em tiras para dosagem bioquímica, após serem scaneados para determinação das lesões.

5.7.2. Modelos de lesões ulcerogênicas estudados

A. Úlcera gástrica induzida por etanol

Este experimento foi realizado baseado no modelo descrito por Morimoto *et al.* (1991) e Glavin and Szabo (1992). Ratos machos Wistar foram distribuídos em 6 grupos (n=8) e ficaram em jejum por 18 horas antes do início do experimento e receberam os seguintes tratamentos por via oral: salina, lansoprazol (30 mg/Kg) ou EMHs (50, 100, 150 e 200 mg/Kg). Após 60 min, todos os grupos receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto (agente lesivo) para induzir úlcera gástrica. Após uma hora, os animais foram mortos em câmara de gás CO₂, os estômagos foram removidos e cortados em tiras para realização das dosagens bioquímicas e foram analisados de acordo com os procedimentos descritos previamente.

B. Indução de úlcera gástrica por Droga antiinflamatória não esteroideal (DANE).

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Guidobono *et al.*, 1997, com modificações. As lesões gástricas foram induzidas com indometacina (50 mg/Kg, via oral) em ratos macho Wistar (n=8) após 18 horas de jejum. EMHs (50, 100, 150 e 200 mg/Kg), cimetidina (100 mg/Kg) ou salina foram administrados por via oral 30 minutos antes da indução das lesões gástricas. Os animais foram mortos em câmara de gás CO₂ seis horas após o tratamento com o agente ulcerogênico. Os estômagos foram removidos e cortados em tiras para realização das dosagens bioquímicas, e as lesões gástricas foram analisadas como descrito anteriormente.

C. Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico.

Este ensaio foi realizado de acordo com o método de Shay (1945) com algumas modificações, onde os parâmetros do suco gástrico foram avaliados sob o efeito do EMHs administrado oral ou intraduodenalmente no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico do extrato. Após 18 horas de jejum os ratos, sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura do piloro. A

administração do EMHs (200 mg/Kg), cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) ou salina (controle negativo), foi realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal ou 30 minutos antes nos tratamentos por via oral. A dose única do EMHs (200 mg/Kg) foi utilizada com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, por ser considerada a mais efetiva na proteção das lesões.

Logo após a ligadura do piloro, suturou-se as incisões e uma hora depois, todos os animais receberam histamina (100 mg/Kg) por via subcutânea. Quatro horas após a cirurgia os ratos foram mortos em câmara de gás CO₂ e a incisão reaberta. Logo em seguida foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) para a retirada do estômago. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital, através da fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml/4h e o pH determinado por fitas de pH (Macherey- Nagel).

D. Determinação de Muco aderido à parede gástrica.

Este procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Come *et al.* (1974) e modificado por Rafatullah *et al.* (1990). Após 18 horas de jejum, os grupos de ratos (n=8) sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal, logo abaixo da apófise xifóide para a amarradura de piloro. A administração da salina, carbenoxolona (200 mg/Kg) ou EMHs (200 mg/Kg) foram realizadas por via oral uma hora antes da amarradura do piloro. Após quatro horas, os animais foram mortos, a porção glandular do estômago separada, pesada e imersa em solução de Alcian Blue para o procedimento de quantificação do muco. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 598 nm, após realização de uma curva padrão com várias concentrações de Alcian blue. Os resultados foram expressos em µg de Alcian blue/g de tecido.

E. Determinação do papel do óxido nítrico (NO) na gastroproteção

Este procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Matsuda *et al.* (1999). Ratos Wistar machos em jejum por 18 horas foram divididos em seis grupos (n=7), onde três grupos receberam injeção intraperitoneal de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester) (70 mg/Kg), inibidor da NO-sintase, enquanto os outros três

grupos receberam salina pela mesma via. Após 30 minutos, os grupos receberam administração oral dos respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg ou EMHs 200 mg/Kg). Após 60 minutos, os animais foram tratados pela via oral com 1mL de etanol absoluto. Os animais foram mortos após uma hora da administração do etanol, os estômagos removidos e abertos na grande curvatura para determinar a área de lesão gástrica (mm²).

F. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

Este procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Matsuda *et al.* (1999). Após 18 horas de jejum, ratos Wistar machos, foram divididos em seis grupos (n=7), onde três grupos receberam injeção intraperitoneal de N-etilmaleimida (NEM) (10 mg/Kg), um bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos, enquanto os outros três grupos receberam salina pela mesma via. Após 30 minutos, os grupos receberam administração oral dos respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg ou EMHs 200 mg/Kg). Após 60 minutos, os animais foram tratados pela via oral com 1 mL de etanol absoluto. Os animais foram mortos após uma hora da administração do etanol, os estômagos removidos e abertos na grande curvatura para determinar a área de lesão gástrica (mm²).

G. Lesões da mucosa gástrica induzidas por isquemia-reperfusão

As lesões da Isquemia–reperfusão (I/R) foram realizadas em três grupos de ratos (n=10) pelo método proposto por Ueda *et al.* (1989). Os ratos ficaram em jejum por 18 horas e receberam água *ad libitum* antes do experimento. Os animais receberam salina, lansoprazol (30 mg/Kg) ou EMHs (200 mg/Kg) por via oral. Em seguida, os animais foram anestesiados com Ketamina (0,08 mL/100g) e Xilazina (0,04 mL/100g) por via intramuscular e permaneceram sedados durante todo o procedimento. Foi feita uma incisão de aproximadamente três cm, do lado esquerdo do abdômen onde a aorta e a veia cava são primeiramente identificadas para facilitar a localização da artéria celíaca. Após a identificação, a artéria celíaca foi isolada, submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências e eventual tecido adiposo. Um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria e permaneceu clampado durante 30 minutos. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido (para

permitir a reperfusão) permanecendo assim por 60 minutos. Os grupos não-tratados (sham) foram submetidos a uma incisão abdominal, mas não sofreu I/R. Após 60 min de reperfusão, os animais foram mortos em câmara de gás CO₂, e seus estômagos foram removidos e cortados em tiras para realização das dosagens bioquímicas. A injúria da mucosa gástrica foi analisada de acordo com os procedimentos descritos previamente.

H. Úlcera duodenal induzida por cisteamina

A úlcera duodenal foi induzida em ratos por duas administrações oral de cisteamina (400 mg/Kg) em solução salina com um intervalo de quatro horas. EMHs (200 mg/Kg), lansoprazol (30 mg/Kg) ou salina foram administrados 30 minutos antes da primeira dose de cisteamina. Um grupo não-tratado (sham) foi utilizado para avaliar os parâmetros normal da mucosa duodenal. Todos os animais foram mortos em câmara de gás CO₂ 48 horas após a primeira administração da cisteamina. Cada duodeno foi aberto ao longo do lado antimesentérico. O escore duodenal foi determinado utilizando a seguinte escala: 0 = nenhuma lesão, 1 = erosão na superfície da mucosa, 2 = úlcera profunda ou úlcera transmural, e 3 = úlcera perfurada (Szabo, 1978). Após determinação do escore da lesão e scaneamento do duodeno, este foi cortado em tiras para realização das dosagens bioquímicas. A área da lesão duodenal foi analisada de acordo com os procedimentos descritos previamente.

I. Avaliação da atividade cicatrizante

Os experimentos foram realizados de acordo com o método por Okabe *et al.*, (1971) modificado por Konturek *et al.*, (1988). As lesões foram induzidas na mucosa gástrica e duodenal em ratos machos Wistar (n=8 por grupo) que ficaram em jejum por 18 horas antes do início do experimento com água *ad libitum*. Uma incisão foi feita no abdômen dos animais anestesiados, e um molde plástico (4,2 mm de diâmetro) foi colocado sob o estômago no primeiro experimento e sob a superfície serosa na parede duodenal, aproximadamente 5 mm distal ao piloro no segundo experimento. Ácido acético (80%, 70 µl) foi colocado no molde e deixado por 20 s no estômago e 10s na parede duodenal. O estômago e o duodeno foram lavados com salina (20 °C) para remoção do ácido acético. Imediatamente em contato com o ácido, houve a formação

da lesão hemorrágica profunda. Logo em seguida, realizou-se a sutura e os animais retornaram ao biotério em caixas de contenção normais, com alimento e água *ad libitum* para sua completa recuperação. Os animais foram tratados durante 7 ou 14 dias consecutivos começando um dia após a cirurgia. Todos os tratamentos, incluindo EMHs (200 mg/Kg), lansoprazol (30 mg/Kg) ou salina, foram administrados por via oral e a dieta DFHs (10%) foi colocada na gaiola como alimento (40 g diário para monitoramento do consumo). Os animais que receberam a dieta ficaram em caixas individuais. Após o último dia da administração do extrato e do consumo da dieta, os ratos foram mortos e seus estômagos e duodeno foram removidos e cortados em tiras para realização das dosagens bioquímicas e teste de toxicidade. A úlcera gástrica e duodenal foram medidas por paquímetro e analisada de acordo com os procedimentos descritos previamente.

5.7.3. Avaliação da atividade tóxica subaguda do EMHs e da DFHs

Foi avaliada a atividade tóxica subaguda do estômago e duodeno dos animais submetidos ao tratamento diário com o EMHs e a DFHs durante 14 dias no modelo da atividade cicatrizante. No final do experimento da atividade cicatrizante os seguintes órgãos foram retirados: coração, pulmões, fígado, baço e rins para avaliar se houve alterações nos órgãos dos grupos tratados e controle. Além disso, o sangue dos animais foi coletado para análise de alterações de parâmetros bioquímicos e enzimáticos, que compreendem a avaliação dos níveis séricos de gama glutamiltransferase (γ -GT), uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A quantificação foi feita utilizando-se analisador bioquímico automático SBA-200 e kits cinéticos e colorimétricos CELM®, Brasil, disponibilizado para uso pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, sob orientação da Prof. Dr(a). Regina Kiomi Takahira.

5.7.4. Determinação bioquímica da mucosa gástrica e duodenal

Foi determinada a atividade da mieloperoxidase (Krawisz *et al.*, 1984) e o conteúdo da glutatona total (Anderson 1985) em homogeneizados da mucosa gástrica

e duodenal. O protocolo utilizado foi o mesmo para as determinações bioquímicas realizadas em homogeneizados de mucosa intestinal colônica descrito anteriormente.

6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett, quando o número de grupos era maior que dois. Na análise entre dois grupos, recorreu-se ao uso do teste "t". Dados não paramétricos (escores) foram expressos como mediana e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. Dados descontínuos foram analisados pelo teste X^2 . A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$.

IV. Resultados

Parte 1.

1. Rendimento do Extrato metanólico da casca do caule (EMHs) e da polpa do fruto de *Hymenaea stigonocarpa*.

O rendimento do EMHs e da polpa do fruto foi calculado após o procedimento descrito anteriormente no Material e Métodos (item 2) e segue na tabela 3.

Tabela 3. Rendimento do EMHs e do fruto de *Hymenaea stigonocarpa*

Parte da planta	Matéria vegetal seca (g)	Extrato seco (g)	Rendimento (%)
Casca do caule	1545,00	118,76	7,6
Parte da planta	Matéria vegetal fresca (g)	Matéria vegetal seca (g)	Rendimento (%)
Polpa do fruto	1546,00	1206,00	22,0

2. Caracterização química de *H. Stigonocarpa*

O perfil fitoquímico de uma espécie vegetal é uma abordagem inicial que pode auxiliar nos estudos posteriores visando a identificação de compostos ativos. A tabela 4 traz os resultados dos testes para classes gerais de compostos secundários que incluem substâncias com importantes atividades farmacológicas. Estas análises indicaram que as principais classes de substâncias presentes foram de compostos fenólicos, flavonóides, taninos e terpenos no EMHs e no fruto, e saponinas somente no EMHs. Compostos pertencentes às classes das antraquinonas, cumarinas, alcalóides e glicosídeos cianogênicos não foram identificados.

Tabela 4. Principais compostos secundários detectados em *H. stigonocarpa*. Os sinais (+) indicam detectados e os sinais (-) não detectados.

Classe de compostos investigada	Caule	Fruto
Compostos fenólicos		
FeCl ₃ 5%	+	+
Flavonóides		
AlCl ₃ 5%	+	-
Taubock	+	+
Shinoda	+	+
Pew	-	+
Pacheco	-	+
Taninos		
Gelatina 2%	+	+
FeCl ₃ 5%	+	+
Antraquinonas		
Bornträger	-	-
Cumarinas		
KOH 10%	-	-
Terpenos e glicosídeos cardiotônicos		
Liebermann-Buchard	+	+
Pesez	-	-
Kedde	-	-
Keller-Kiliani	+	+
Saponinas		
Agitação	+	-
Alcalóides		
Hager	-	-
Mayer	-	-
Bertrand	-	-
Dragendorff	-	-
Glicosídeos cianogênicos		
Guignard	-	-

A análise cromatográfica do extrato da casca do caule e da farinha da polpa do fruto por HPLC-PAD indicou que ambos possuem semelhanças qualitativas de composição química e confirma a evidência da presença de compostos fenólicos (Fig. 2 A). Com base na análise dos espectros de ultravioleta dos picos presentes e comparação com padrões disponíveis, verifica-se em ambos cromatogramas substâncias eluídas na região de $t_r= 0-26$ min que apresentam uma banda fraca em torno de 280 nm, um ombro próximo de 220 nm e máximo entre 205-210 nm (Fig. 2 B), característicos de catequinas (dc) (Fig. 2 C) (Rohr *et al.*, 2000). Na região de $t_r= 26-34$ min verifica-se um segundo grupo de substâncias que exibem bandas com máximos de absorção na região de 216 e 270 nm (Fig. 2 D) e espectro característicos de derivados do ácido gálico (dag) (Fig. 2 E) (Rohr *et al.*, 2000). Na região de $t_r= 39-48$ min

observa-se um pico alargado de baixa resolução, com espectros de UV semelhante ao de dc, indicativo da presença de taninos condensados.

Além disso, uma vez que as duas amostras foram preparadas e analisadas similarmente por HPLC-UV, a inspeção das intensidades de absorção dos picos presentes nos cromatogramas indica que o extrato da casca do caule apresenta maior teor de compostos fenólicos, se comparado aos frutos.

Dessa maneira, com o auxílio do detector PAD e comparação com padrões, duas classes de substâncias foram identificadas na casca do caule e no fruto de *H. stigonocarpa* catequinas monoméricas/oligoméricas (taninos condensados ou proantocianidinas) e derivados do ácido gálico.

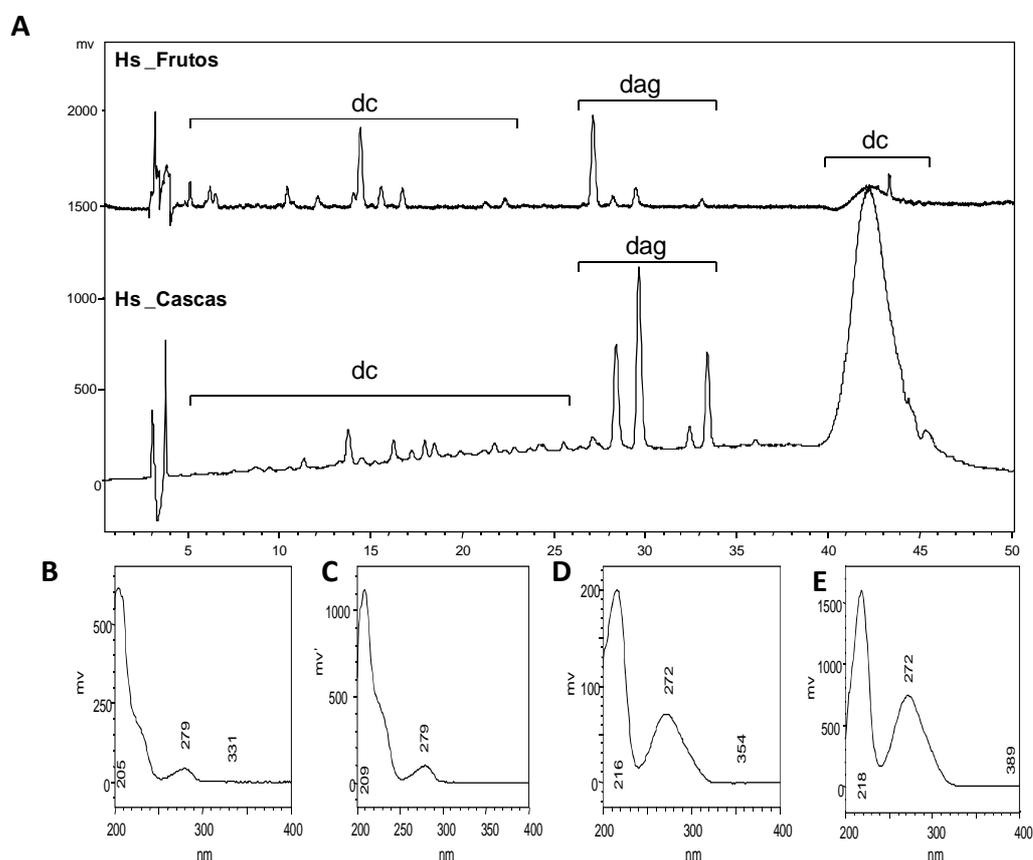


Figura 2: Perfil cromatográfico dos extratos dos frutos e cascas de *H. stigonocarpa* por HPLC-UV-PAD (A). Espectro de UV do padrão catequina (dc) (B), dos compostos identificados como dc (C), do padrão ácido gálico (D) e dos compostos identificados como dga. Coluna Phenomenex Synergi-hydro RP18 (150 × 4,6 mm d.i., 4 μm). Eluente A: H₂O + 0,1% TFA; eluente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de eluição 10-23% de B em A

em 35 min, de 23-90% de B em 50 min. Fluxo 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, λ= 254 nm.

3. Atividade antioxidante

O EMHS e a farinha da polpa do fruto apresentaram atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato induzida por ferro e ácido ascórbico, onde a IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da lipoperoxidação) foi 5,25 ± 0,23 µg/mL e 27,33 ± 0,09 µg/mL, respectivamente. No mesmo teste, a quercetina, flavonóide antioxidante usado como referência, apresentou uma IC₅₀ de 0,33 ± 0,01 µg/mL (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade antioxidante no modelo de peroxidação lipídica

Amostra	IC ₅₀ µg/mL
EMHS	5,25 ± 0,23
Farinha da polpa do fruto de Hs	27,33 ± 0,09
Ácido gálico (padrão)	0,33 ± 0,01

A EC₅₀ (concentração antioxidante capaz de reduzir a 50% da concentração inicial do radical livre DPPH•) do EMHS e da farinha da polpa do fruto foram calculados pela equação do gráfico de % DPPH• seqüestrado em função da concentração das amostras. De acordo com a avaliação da capacidade antioxidante do EMHS e da farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*, ambos apresentam atividade antioxidante. No mesmo teste, o ácido gálico foi utilizado como antioxidante de referência (tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de DPPH• seqüestrado e EC₅₀ das amostras.

Amostra	EC ₅₀ µg/mL
EMHS	10,78
Farinha da polpa do fruto de Hs	442,25
Ácido gálico (padrão)	1,89

4. Toxicidade aguda e “Screening” hipocrático

A administração da dose de 5000 mg/Kg do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (EMHs) em camundongos macho e fêmea não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados (dados não apresentados) quando comparados aos obtidos com o grupo de animais tratados com salina. O monitoramento diário do peso dos animais não indicou variação significativa em relação ao grupo controle negativo (figura 3) e também não ocorreram mortes durante o período de observação (tabela 7 A e 7B).

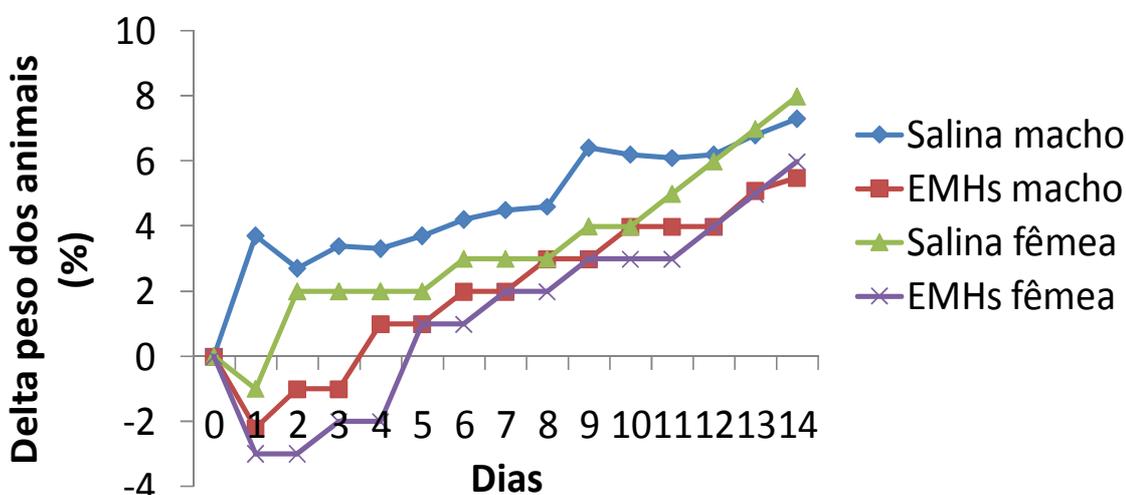


Figura 3. Avaliação do peso corporal de camundongos macho e fêmea tratados com dose única do EMHs na dose de 5000 mg/Kg. Dados expressos em média do $(\text{Peso final} \times 100 / \text{peso inicial}) - 100$.

Outro parâmetro analisado foi o peso relativo dos órgãos, obtidos da razão entre o peso do órgão e peso total do animal que foi transformada em Arcoseno para fins de adequação estatística (tabela 7 A e 7 B). Após a realização do teste “t”, verificou-se que não há diferença estatística entre os órgãos analisados ($P > 0,05$) entre os grupos salina e EMHs comparados entre os camundongos do mesmo sexo (tabela 7 A e 7 B).

Tabela 7 A. Efeito da administração aguda do EMHs sobre os órgãos de camundongos macho. Dados expressos em média \pm E.P.M.

Trat. (v.o.)	Coração	Fígado	Pulmão	Baço	Rins	Testículos	Mortalidade (%)
Salina	4,29 \pm 0,17	14,25 \pm 0,25	4,16 \pm 0,06	4,15 \pm 0,44	7,22 \pm 0,24	4,18 \pm 0,15	0
EMHs 5.000mg/Kg	4,12 \pm 0,14	14,12 \pm 0,41	5,46 \pm 0,61	4,69 \pm 0,41	6,87 \pm 0,19	4,26 \pm 0,14	0

Tabela 7 B. Efeito da administração aguda do EMHs sobre os órgãos de camundongos fêmea. Dados expressos em média \pm E.P.M.

Trat. (v.o.)	Coração	Fígado	Pulmão	Baço	Rins	ovários	útero	Mortalidade (%)
Salina	4,25 \pm 0,16	14,80 \pm 0,30	4,51 \pm 0,08	3,64 \pm 0,14	6,59 \pm 0,12	2,61 \pm 0,22	13,30 \pm 1,04	0
EMHs 5.000mg/Kg	3,95 \pm 0,05	14,10 \pm 0,32	4,45 \pm 0,16	3,54 \pm 0,13	6,59 \pm 0,22	2,46 \pm 0,36	13,7 \pm 2,09	0

Parte 2 – Colite Experimental

1. Resultados do extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (EMHs) em modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS.

1.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos do cólon, consumo alimentar e do peso corporal.

A administração intracolônica de TNBS resulta em inflamação no epitélio colônico, que pode ser evidenciada após 48 horas por meio de necrose na camada mucosa, ocorrência de espessamento, hiperemia na parede intestinal, incidência de diarreia e aderência do intestino com os órgãos adjacentes.

Os animais tratados com prednisolona, sulfassalazina e as três doses do EMHs testadas apresentaram um escore inferior ao grupo controle (tabela 8), porém nenhuma diferença estatística foi observada.

Analisando a extensão da lesão, o grupo controle apresentou uma extensão média de $3,4 \pm 0,48$ cm; apesar dos animais tratados com o EMHs nas doses de 100 e 200 mg/Kg apresentarem uma extensão de lesão inferior, nenhuma diferença estatística foi observada. Os animais tratados com os fármacos de referência sulfassalazina e prednisolona apresentaram extensão de lesão menor que o grupo controle diferindo estatisticamente (tabela 8).

Ao avaliar a relação peso/comprimento colônico (mg/cm), os animais do grupo tratado com prednisolona apresentaram uma relação de $128,68 \pm 5,05$ vs. $151,67 \pm 6,02$ grupo controle, com diferença estatística de $P < 0,05$; porém, nenhum outro tratamento promoveu alteração neste parâmetro (tabela 8).

Todos os grupos dos animais colíticos apresentaram sinais de diarreia. Quanto à incidência de aderência, esta foi observada em 57% dos animais do grupo controle, em 14% dos animais tratados com EMHs (200 mg/Kg) e sulfassalazina, e em nenhum animal tratado com prednisolona (tabela 8).

Tabela 8. Efeito do Extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa* (EMHs) nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, prednisolona (2 mg/Kg) e sulfasalazina (25 mg/Kg) no escore macroscópico, extensão da lesão, relação peso comprimento colônico, diarreia e aderência em modelo de inflamação intestinal agudo induzido por TNBS.

Grupo Experimental (n=7)	Escore macroscópico (0-10) a	Extensão da Lesão (cm) b	Relação peso/comprimento (mg/cm) b	Diarreia (%) c	Aderência (%) c
Branco	0***	0**	102,74 6,45**	0***	0
Controle	8(5-8)+++	3,4 ± 0,48++	151,67 ± 6,02++	85+++	57
EMHs 100mg/Kg	7(5-8)+++	2,9 ± 0,39++	140,84 ± 8,82++	71	57
EMHs 200mg/Kg	6(5-8) +	2,6 ± 0,46++	143,21 ± 6,97++	100+++	14
EMHs 400mg/Kg	7(6-8)+++	3,4 ± 0,32++	134,70 ± 11,82+	86+++	60
Prednisolona 2mg/Kg	5(2-6)	1,5 ± 0,30**+	128,68 ± 5,05*	57	0
Sulfasalazina 25mg/Kg	4(3-7)	1,8 ± 0,41*++	142,07 ± 6,29++	71	14

^a Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), ^b extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M., ^c diarreia e aderência foram analisados pelo teste χ^2 , onde * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 comparados ao grupo controle. +P<0,05; ++P<0,01; +++ P < 0,001 comparado ao grupo branco (não-colítico).

A instalação do processo inflamatório intestinal está associada a uma redução no consumo de ração e no peso corpóreo do animal. Após a administração do TNBS, o consumo de alimento ficou reduzido e somente os animais do grupo branco (não colítico) restabeleceram normalmente o consumo após o jejum (5º dia) (Figura 4) e, conseqüentemente, seu peso corporal (Figura 5).

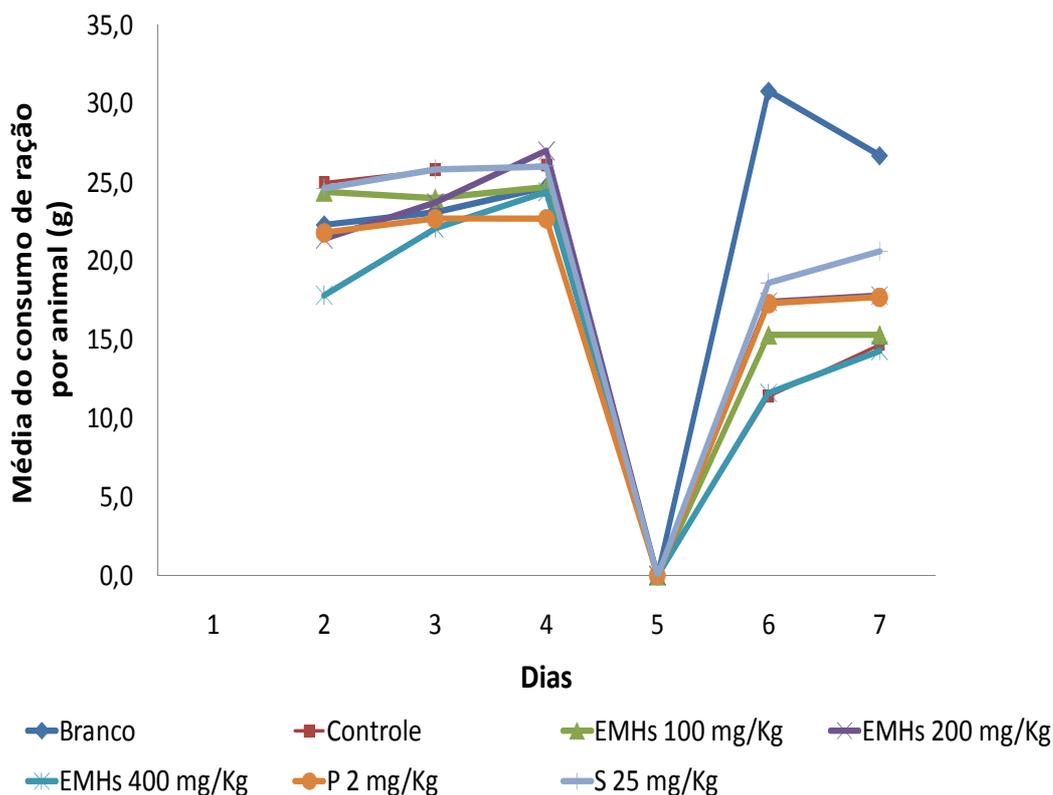


Figura 4: Avaliação do consumo de ração por grupo dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais. (EMHs- extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa*; P- prednisolona; S- sulfassalazina)

A redução no consumo de ração reflete na redução do peso corpóreo. Os animais tratados com EMHs 200 mg/Kg e sulfassalazina restabeleceram o ganho de peso corpóreo mesmo após a administração do TNBS; porém, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (Figura 5).

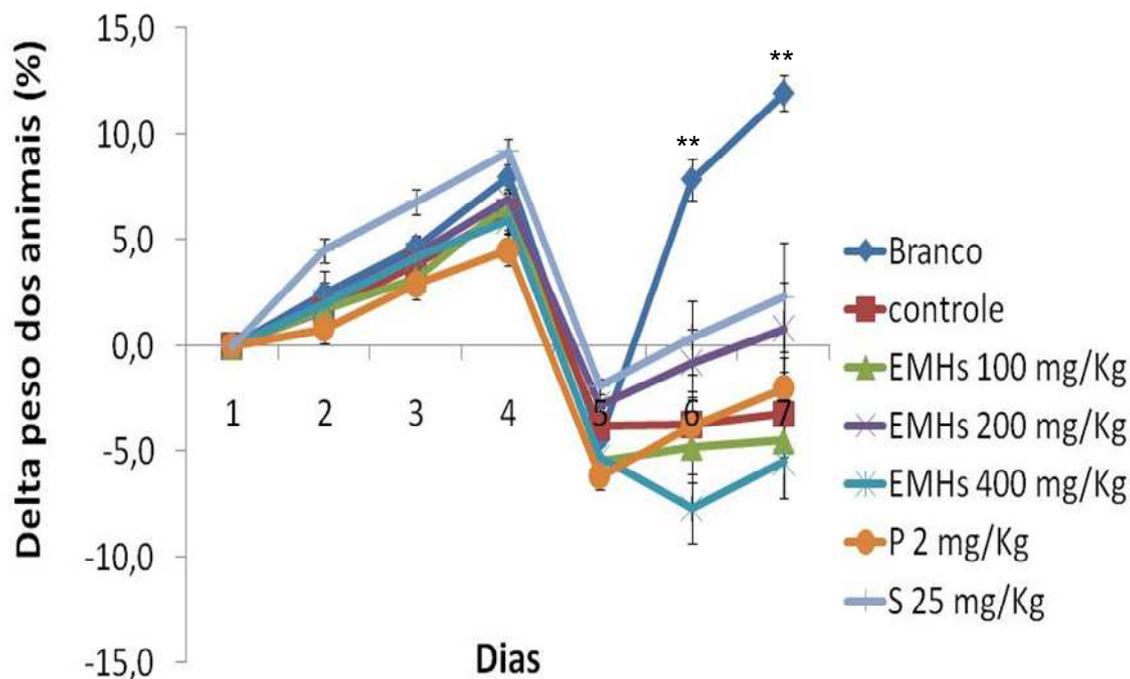


Figura 5: Avaliação do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do (Peso final X 100/peso inicial) -100 ± E.P.M. com ** P<0,01 comparado com o grupo controle TNBS. (EMHs- extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa*; P- prednisolona; S- sulfassalazina).

1.2. Determinação Bioquímica

Bioquimicamente, os mediadores inflamatórios estão em intensa atividade após a administração de TNBS, dados que podem ser observados pela atividade da mieloperoxidase (MPO) (Figura 7) e da fostatase alcalina (FA) (Figura 8), quando comparados os animais do grupo controle e os animais não colíticos (branco). Estes resultados são acompanhados por uma significativa redução no conteúdo de glutatona colônica (Figura 6) e no aumento do conteúdo de malonildialdeído (MDA) (Figura 9), como consequência do estresse oxidativo ao qual o cólon lesado está submetido.

O pré-tratamento dos animais com EMHs (200 mg/Kg) e prednisolona promoveu manutenção nos níveis de glutatona colônica, quando comparados ao grupo controle colítico (Figura 6). Apesar do tratamento com o EMHs (200 mg/Kg) promover a manutenção no conteúdo de GSH, nenhuma diferença estatística foi

observada em relação ao conteúdo de malonildialdeído (MDA); entretanto, nos grupos tratados com sulfassalazina ou prednisolona, o conteúdo de MDA foi reduzido diferindo estatisticamente do grupo controle (Figura 9).

Somente as drogas de referência foram capazes de reduzir os níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) em relação ao grupo controle (Figura 7); no entanto, nenhum tratamento foi capaz de reduzir a atividade da fosfatase alcalina (FA) (Figura 8).

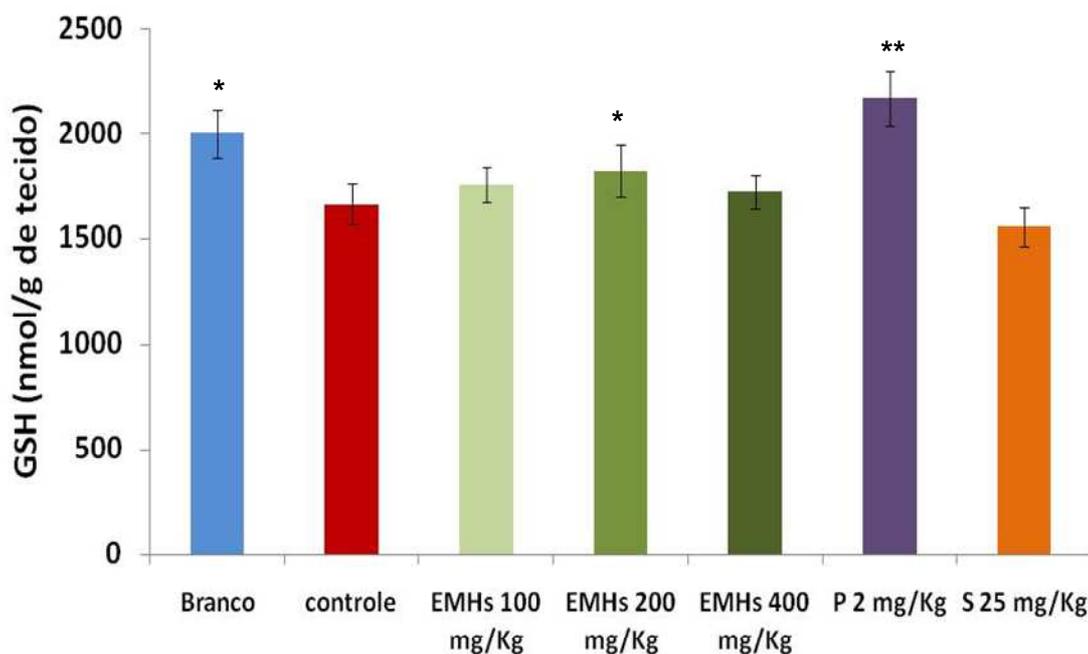


Figura 6. Avaliação dos níveis de glutatona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparados ao grupo controle. (EMHs- extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa*; P- prednisolona; S- sulfassalazina).

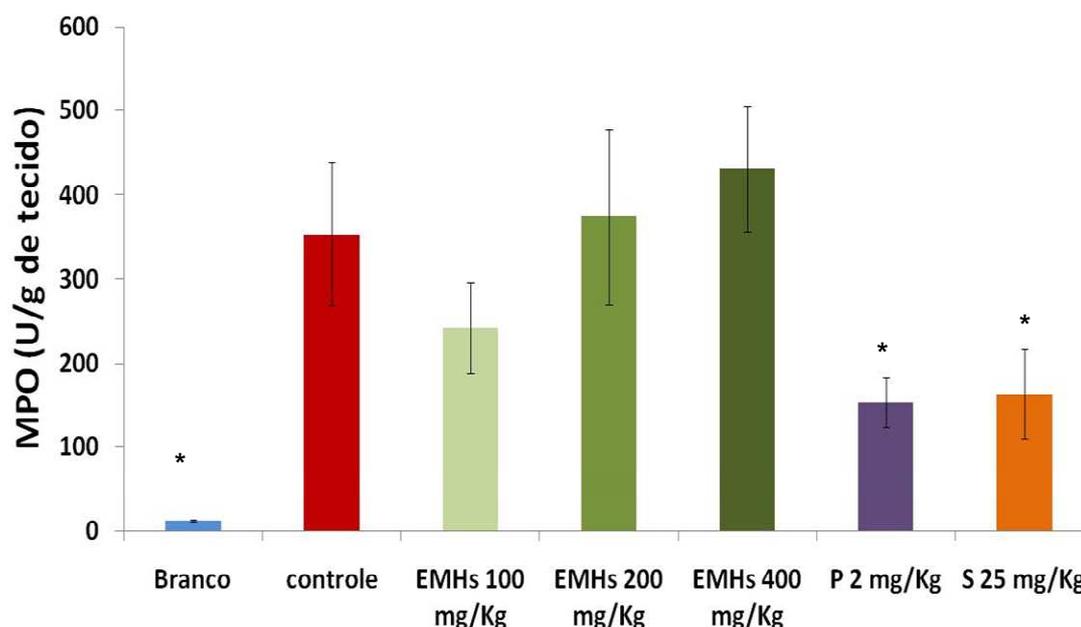


Figura 7: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M com * $P < 0.05$ comparados ao grupo controle. (EMHs- extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa*; P- prednisolona; S- sulfassalazina).

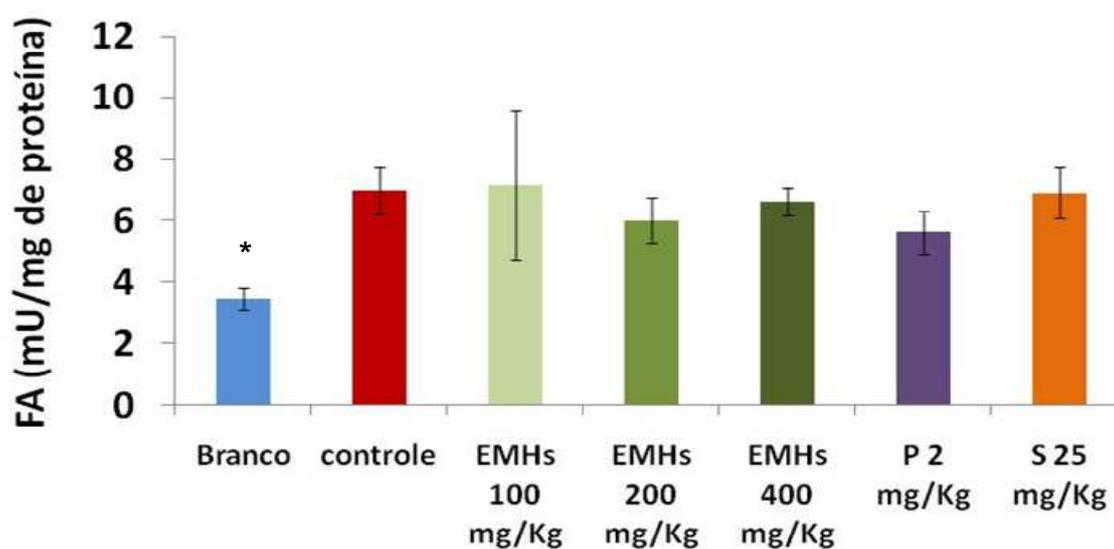


Figura 8: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $P < 0.05$, comparados ao grupo controle. (EMHs- extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa*; P- prednisolona; S- sulfassalazina).

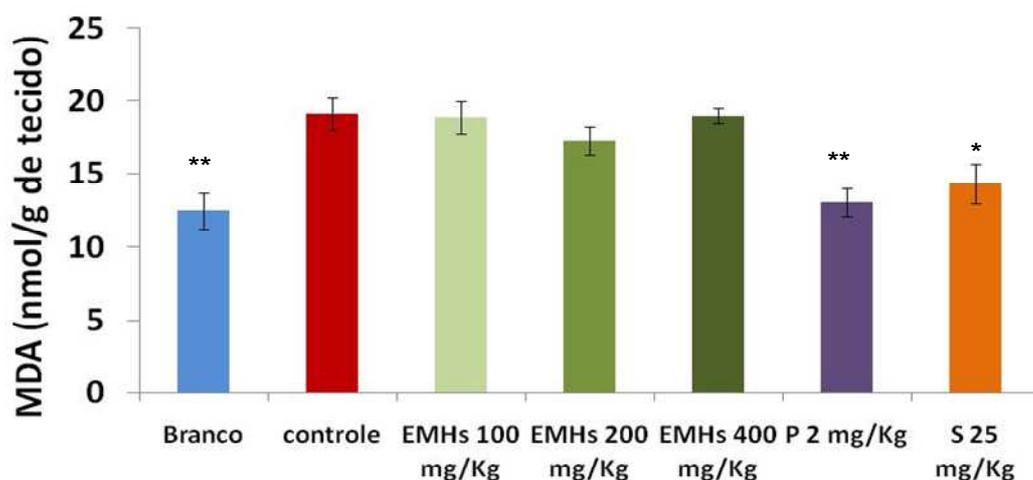


Figura 9: Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, comparados ao grupo controle. (EMHs- extrato metanólico da casca do caule de *H. stigonocarpa*; P- prednisolona; S- sulfassalazina).

2. Resultados da dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa* (DFHs) em modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS.

2.1. Avaliação dos parâmetros macroscópicos do cólon, consumo alimentar e do peso corporal.

Assim como para avaliar a atividade do extrato, o modelo experimental utilizado para avaliar os efeitos da dieta foi o modelo de inflamação intestinal aguda, com o intuito de observar a ação preventiva da dieta. Este modelo se caracteriza pela inflamação no epitélio colônico com a presença de necrose na camada mucosa. A ulceração e a inflamação no cólon do rato são caracterizadas pela doença na parede colônica, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, (observados pela atividade da mieloperoxidase) e formação de granulomas. Esta lesão é máxima 48 horas após a administração do TNBS.

A indução da colite em ratos pelo TNBS resultou na inflamação colônica, a qual foi evidenciada após 48 horas, por severa lesão na mucosa estendendo-se de 4,3 a 6,2 cm ao longo do cólon (Tabela 9). Este processo inflamatório foi associado a um aumento significativo na relação peso/ comprimento e na incidência de diarreia (100%)

nos animais controle colíticos quando comparados ao grupo branco (não-colítico) (Tabela 9).

Os animais tratados com a DFHs (10%) por 3 semanas apresentaram uma diminuição no escore macroscópico além de uma diminuição significativa na extensão da lesão em relação ao grupo controle (Tabela 9). Este grupo não apresentou incidência de aderência, porém não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa* (DFHs) nas concentrações de 5 e 10% no escore macroscópico, extensão da lesão, relação peso comprimento colônico, diarreia e aderência em modelo de inflamação intestinal agudo induzido por TNBS.

Grupo Experimental (n=7)	Escore macroscópico (0-10) a	Extensão da Lesão (cm) b	Relação peso/comprimento (mg/cm) b	Diarreia (%) c	Aderência (%) c
Branco	0***	0**	97,66 ± 4,40**	0***	0
Controle	10(8-10)+++	5,54 ± 0,27++	159,44 ± 5,76++	100+++	57
DFHs 5%	8(8-9)++	4,41 ± 0,17++	158,17 ± 6,14++	100+++	28
DFHs 10%	7,5(6-9)*	3,38 ± 0,63**++	156,13 ± 7,15++	71++	0

^a Os valores de escore estão expressos em mediana (intervalo), ^b extensão da lesão, relação peso-comprimento colônico estão expressos em média ± E.P.M., ^c diarreia e aderência foram analisados pelo teste χ^2 , onde * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 comparados ao grupo controle. +P<0,05; ++P<0,01; +++ P < 0,001 comparado ao grupo branco (não-colítico).

Na avaliação do consumo de ração, foi observada uma redução no consumo pelos animais do grupo controle quando comparado aos animais do grupo branco (não-colítico) (Figura 10). Os animais que receberam a DFHs (5 e 10%) restabeleceram o consumo após a indução em relação ao grupo controle, mas não apresentaram diferença estatística (Figura 10).

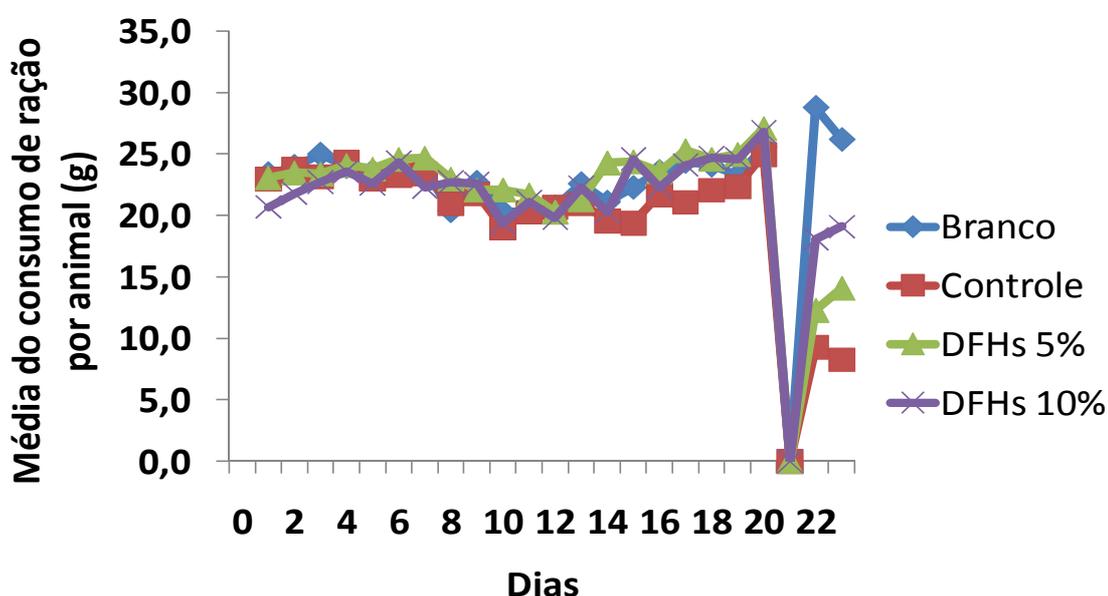


Figura 10: Avaliação do consumo de ração por grupo dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em consumo/ número de animais. (DFHs- dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*).

Os animais do grupo branco (não colítico) restabeleceram normalmente o seu peso corporal após o jejum (21º dia) (Figura 11), diferindo do grupo controle no 23º dia. Os animais tratados com a DFHs (10%) tiveram um ganho de peso superior aos animais do grupo controle após a indução da colite, o que pode ser observado na figura 11.

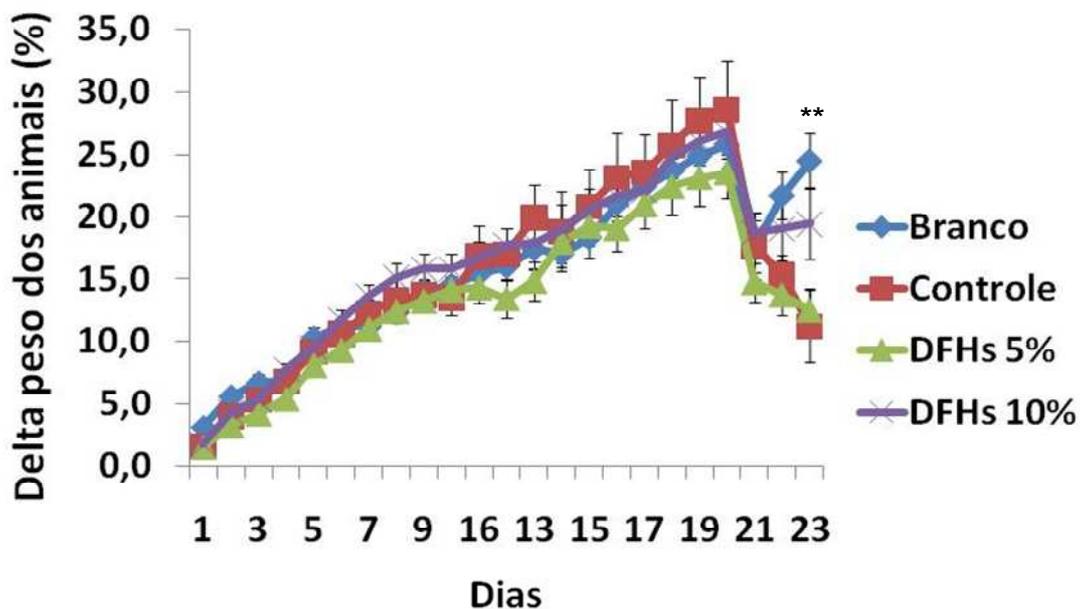


Figura 11: Avaliação do peso corporal dos animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média do (Peso final X 100/peso inicial) -100 ± E.P.M. com ** P<0,01 comparado com o grupo controle TNBS. (DFHs- dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*).

2.2. Determinação Bioquímica

Após a administração do TNBS os danos colônicos do grupo controle foram caracterizados por uma significativa redução de 37% nos níveis de glutathiona (GSH), um aumento de 57% no conteúdo de malonildialdeído (MDA), um aumento na atividade de mieloperoxidase (MPO) e da fosfatase alcalina de 44,7 e 2 vezes respectivamente em relação ao grupo branco (não colítico).

A DFHs (10%) promoveu a manutenção nos níveis de GSH (Figura 12) e reduziu os níveis de MDA (Figura 15). A DFHs (10%) também reduziu a atividade da MPO (Figura 13), porém não reduziu a atividade da FA (Figura 14). A DFHs (5%) promoveu efeito apenas em um parâmetro bioquímico, reduzindo a atividade da MPO (Figura 13).

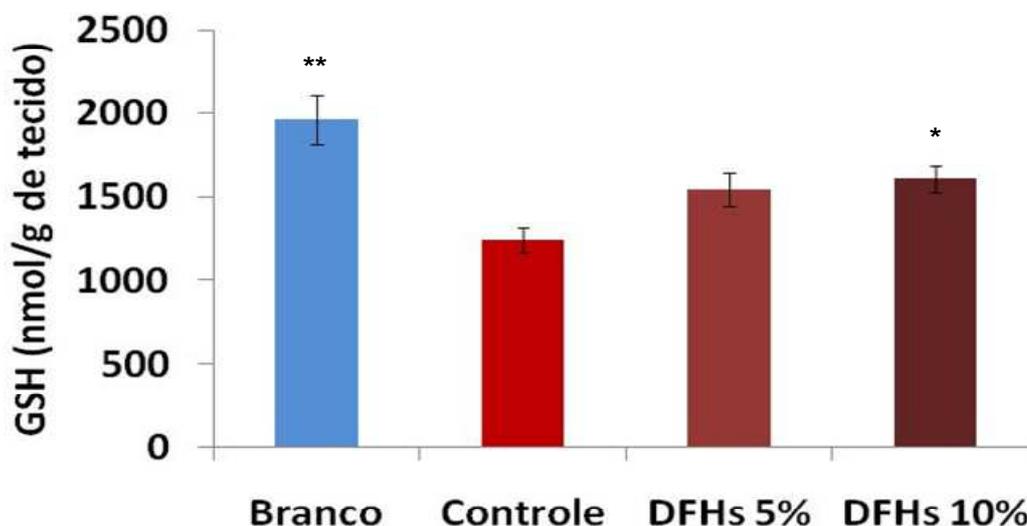


Figura 12. Avaliação dos níveis de glutathiona colônica (GSH) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparados ao grupo controle. (DFHs- dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*).

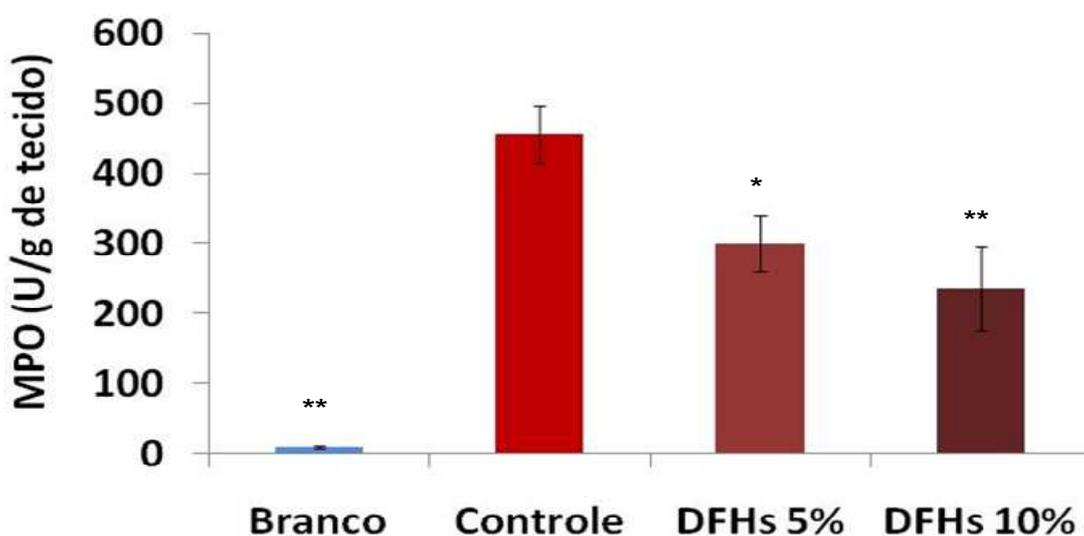


Figura 13: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M com * $P < 0.05$; ** $P < 0,01$ comparados ao grupo controle. (DFHs- dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*).

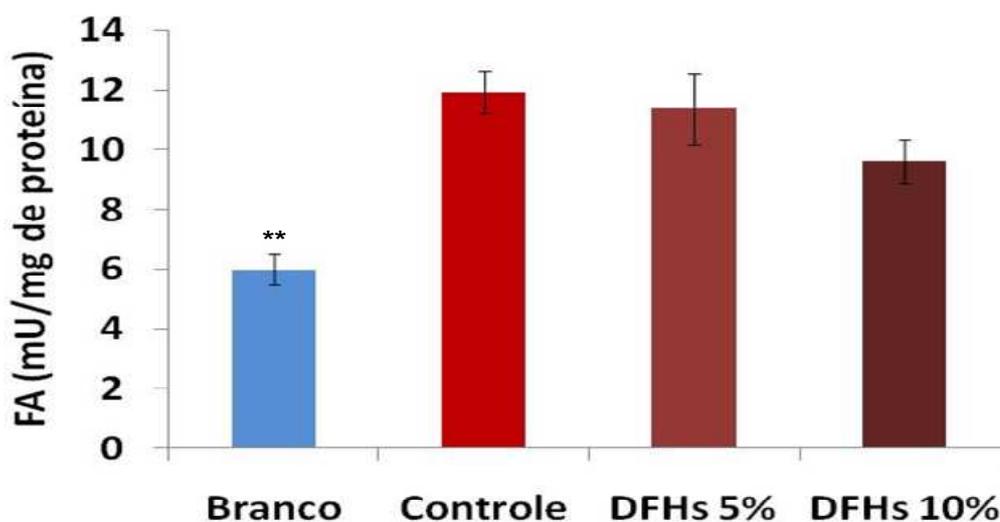


Figura 14: Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com **P<0.01, comparados ao grupo controle. (DFHs- dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*).

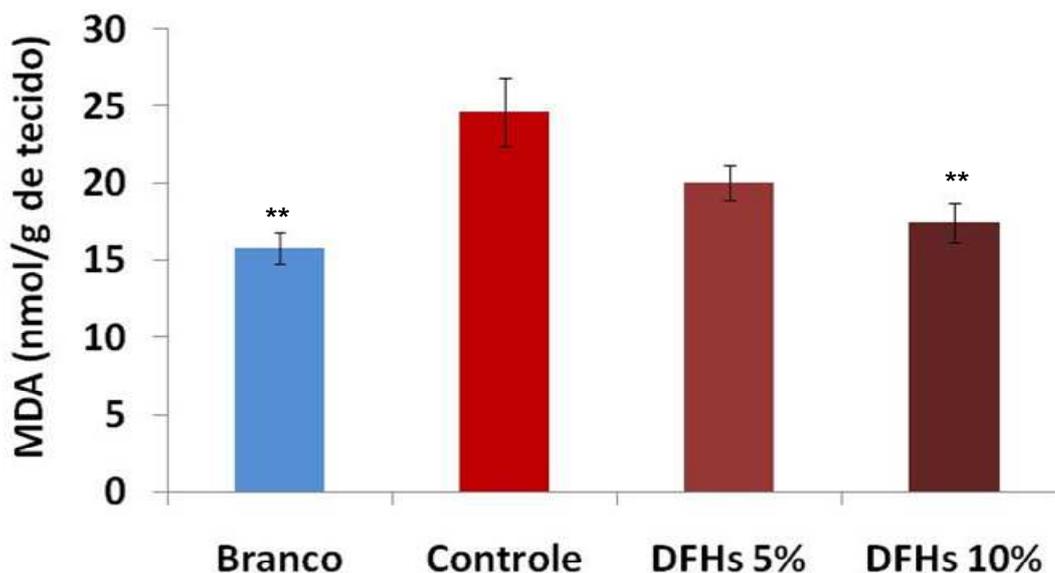


Figura 15: Avaliação dos níveis de malonildialdeído (MDA) em animais submetidos ao modelo experimental de colite aguda induzida por TNBS. Dados expressos em média \pm E.P.M. com **P<0,01, comparados ao grupo controle. (DFHs- dieta com a farinha da polpa do fruto de *H. stigonocarpa*).

V - Discussão e conclusão

Discussão e conclusão da atividade antiinflamatória intestinal

Devido ao uso etnofarmacológico da casca do caule e dos frutos de *Hymenaea stigonocarpa* para tratar dor gástrica, úlcera, diarreia e inflamação (Grandi *et al.*, 1989), os efeitos desta planta medicinal foi estudada no presente projeto no processo inflamatório intestinal induzido pelo TNBS em ratos. A casca do caule e o fruto são usados na medicina popular na forma de xarope e como alimento, respectivamente (Andersen & Andersen, 1988; Grandi *et al.*, 1989; Almeida, 1998); sendo assim, o presente projeto teve como objetivo determinar os efeitos protetores da extrato metanólico da casca do caule (EMHs) por meio da administração oral e da dieta enriquecida com a farinha da polpa do fruto (DFHs) na forma de alimento.

No primeiro experimento, foi avaliado o efeito do EMHs nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg no processo inflamatório intestinal. Após o pré-tratamento com o EMHs, a dose de 200 mg/Kg promoveu a manutenção dos níveis de glutathione (GSH); contudo, não melhoraram os dados de observação experimental, assim como a incidência de diarreia e nem reduziram os níveis teciduais de malonildialdeído (MDA), mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA).

No segundo experimento, foi avaliado os efeitos preventivos da dieta enriquecida com 5 e 10% da farinha da polpa do fruto e os resultados demonstraram que a DFHs 10% preveniu o processo inflamatório intestinal induzido pelo TNBS, o qual foi evidenciado por reduzir o escore macroscópico e extensão da lesão e, bioquimicamente pela manutenção dos níveis de GSH, redução do conteúdo de MDA e da atividade da MPO. A DFHs 5% não protegeu dos efeitos macroscópicos e reduziu somente a atividade da MPO entre os parâmetros bioquímicos avaliados.

Em relação aos parâmetros macroscópicos, o processo inflamatório colônico está associado a um aumento da relação peso/comprimento deste tecido, além da ocorrência de diarreia, aderência aos órgãos adjacentes, redução no consumo de alimento e conseqüente redução no peso corpóreo.

Entre os sintomas da DII está a redução do peso corporal, que ocorre devido a uma redução no consumo alimentar, resultado de dor abdominal e diarreia durante a fase ativa da doença (Campos *et al.*, 2002). No modelo de doença inflamatória

intestinal induzida por TNBS a perda de peso é observada somente na primeira semana após a administração (Morris *et al.*, 1989) sendo então necessário um período de recuperação para que os animais restabeleçam o consumo de alimento e o peso corporal. No presente estudo, a diferença estatística no ganho de peso entre os grupos branco e controle foi observada nos dois protocolos experimentais de fase aguda. Quanto aos animais pré-tratados, que receberam o EMHs 200 mg/Kg e sulfassalazina, estes restabeleceram o ganho de peso corpóreo mesmo após a administração do TNBS; porém, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle. Os animais que receberam a DFHs 10% restabeleceram o consumo e tiveram um ganho de peso superior após a indução da colite em relação ao grupo controle, mas não estatisticamente significativa.

A diarreia é um sintoma da DII que é mediada pelas células T, e indica perda da capacidade absorptiva intestinal (Mush *et al.*, 2002). Após a indução da colite por TNBS em ratos, o processo inflamatório está associado aos sinais de diarreia nos animais colíticos como observado nos experimentos de Witaicenis *et al.*, 2010. Além disso, ocorre a presença de aderências entre o cólon e o órgão adjacente que é o resultado da inflamação transmural, característica comum da Doença de Crohn em humanos (Levine, 1994) e da colite experimental induzida por TNBS como observado por Witaicenis *et al.*, 2012. De acordo com os resultados obtidos neste projeto, no primeiro ensaio experimental os animais tratados com EMHs (200 mg/Kg), sulfassalazina e prednisolona foram capazes de diminuir a incidência de aderência em relação ao grupo controle; porém, não foi estatisticamente significativa. No segundo ensaio experimental, todos os grupos apresentaram sinais de diarreia, porém os animais que receberam a DFHs 10% não apresentaram aderência do cólon aos órgãos adjacentes.

O aumento do peso do tecido do cólon inflamado também é considerado um indicador da severidade e extensão da resposta inflamatória (Peterson *et al.*, 2011). Somente o pré-tratamento com prednisolona, no primeiro ensaio experimental, foi capaz de diminuir a relação peso /comprimento colônico. De fato este parâmetro é difícil de ser revertido por tratamento farmacológico, pois a lesão deste modelo experimental é severa e extensa (Veljaca *et al.*, 1995), conseqüentemente, isto também ocorre com os parâmetros de escore macroscópico e extensão da lesão.

A colite induzida pelo TNBS via intracolônica, promoveu lesão no cólon dos animais nos dois modelos experimentais. No primeiro ensaio experimental, somente o pré-tratamento com a prednisolona e sulfassalazina diferiram estatisticamente do grupo controle quanto à extensão da lesão. O pré-tratamento com a dieta DFHs 10% promoveu efeitos benéficos nos danos causados no tecido, reduzindo o escore e a extensão de lesão do cólon, diferindo do grupo controle.

Do ponto de vista bioquímico, o modelo de doença inflamatória intestinal induzida por TNBS, promove depleção da glutathiona (GSH), aumento da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e fosfatase alcalina (FA).

Os efeitos protetores promovidos pelo EMHs (200 mg/Kg) e pela DFHs 10% na manutenção dos níveis de GSH é indicativo de uma ação antioxidante da planta. A glutathiona (GSH, L-g-glutamil-L-cistenilglicina) é um tripeptídeo, contendo glutamato, glicina e cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos. A glutathiona existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Júnior *et al.*, 2001). Baixas concentrações de GSH têm sido reportadas em algumas doenças (Júnior *et al.*, 1998). A GSH em sua forma reduzida possui um grupo sulfidrílico, que pode atuar seqüestrando radicais livres como o oxigênio (O_2^-), peroxinitrito e hidroperóxidos lipídicos; além disso, está relacionada diretamente com o processo de reparação da lesão oxidativa no DNA e proteção contra moléculas reativas de oxigênio (Kruidenier & Verspaget, 2002). A presença de estresse oxidativo na mucosa colônica no processo inflamatório intestinal é confirmada pela depleção dos níveis de glutathiona, como observado em humanos (Sido *et al.*, 1998) e em modelos experimentais (Di Stasi *et al.*, 2004; Luchini *et al.*, 2008; Witacenis *et al.*, 2010; Witacenis *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo é um mecanismo potencial de lesão tecidual que contribui para a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, o que reforça a pesquisa de novos compostos com atividade antioxidante como novas terapias para o tratamento destas doenças (McKenzie *et al.*, 1996; Dryden *et al.*, 2005); portanto, estratégias para inibir os radicais livres são um importante ponto de partida na busca de novos medicamentos para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

No tecido colônico de pacientes com DII o estresse oxidativo é também caracterizado pelo aumento nos níveis de malonildialdeído (MDA) (Dagli *et al.*, 1997; Kruidenier *et al.*, 2003). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Lima & Abdalla, 2001). O modelo experimental de colite induzida pelo TNBS promove alterações nos sistemas antioxidantes da mucosa intestinal, o que pode levar a um estresse oxidativo, que pode ser confirmado pelo aumento do conteúdo de MDA colônico como mostrado neste e em outros estudos (Loguercio *et al.*, 2003). O pré-tratamento com a DFHS (10%) ou com os fármacos de referência prednisolona e sulfassalazina, foram capazes de diminuir o estresse oxidativo colônico, após a administração do TNBS, demonstrado pela diminuição no conteúdo de malonildialdeído.

Algumas intervenções terapêuticas têm demonstrado capacidade de melhorar a DII por meio da sua capacidade antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica. Entre estas intervenções incluem a Vitamina E (González *et al.*, 2001), tempol (Cuzzocrea *et al.*, 2000), flavonóides (Gálvez *et al.*, 2001), paepalantina (Di Stasi *et al.*, 2004) e cumarinas (Luchini *et al.*, 2008; Witaicenis *et al.*, 2010; Witaicenis *et al.*, 2012). No presente estudo, o EMHs e o fruto apresentaram atividade antioxidante *in vitro* por meio do modelo de peroxidação lipídica com membrana de cérebro de rato e pela avaliação da atividade sequestradora de radicais livres com DPPH•, e *in vivo* por meio da manutenção dos níveis de GSH do cólon e do MDA, este último somente com o fruto.

Além das características descritas acima, a glutathione é descrita como o principal antioxidante para o ácido hipocloroso, produzido pelos neutrófilos por ação da enzima mieloperoxidase (MPO) (Winterbourn & Brennan, 1997), a qual é encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos destas células, sendo um importante marcador bioquímico que caracteriza a infiltração desse tipo celular e a inflamação tecidual. A MPO catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio, na presença de cloro a ácido hipocloroso (HClO), um potente agente oxidante que contribui para o mecanismo de defesa contra os agentes infecciosos, mas também pode atuar sobre as células, podendo causar muitos danos e enfermidades inflamatórias (Kettle & Winterbourn, 1991). A determinação da atividade da

mieloperoxidase no intestino por meio de ensaios bioquímicos pode ser usada para quantificar a inflamação (Krawisz *et al.*, 1984).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que no modelo experimental de colite, o pré-tratamento com o EMHs não foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO; entretanto, as drogas de referência prednisolona e sulfassalazina inibiram a atividade desta enzima. O pré-tratamento com a DFHs 10% promoveu redução na atividade da enzima MPO. O fato dos animais tratados com prednisolona, sulfassalazina e a DFHs 10% terem reduzido a atividade da enzima mieloperoxidase, indica que tanto os fármacos de referência quanto a dieta apresentam importante atividade antiinflamatória. A redução da atividade da enzima mieloperoxidase tem sido observada em ratos colíticos tratados com fibra alimentar (Rodriguez-Cabezas *et al.* 2002; Witaicenis *et al.*, 2010). De acordo com Andoh *et al.* (1999), o butirato é um dos metabólitos da fibra alimentar que exerce um potente efeito antiinflamatório *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, a redução da atividade da MPO apresentado pela DFHs 10% pode ser interpretada como uma manifestação antiinflamatória intestinal exercida pelas fibras presente no fruto. Entretanto, a ausência do efeito antiinflamatório do EMHs através da dosagem da MPO, não significa que o extrato não apresenta efeito antiinflamatório, pois não se conhecem os mecanismos de ação desta planta e outros mediadores inflamatórios podem estar envolvidos.

Entretanto, os resultados do presente projeto demonstraram que o pré-tratamento com o EMHs ou com a DFHs não foi capaz de reduzir a atividade da enzima fosfatase alcalina (FA) após 48 horas da instalação do processo inflamatório. De acordo com alguns estudos, esta enzima fica aumentada no processo inflamatório intestinal (Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2001; Sanchez de Medina *et al.*, 2002; Sanchez de Medina *et al.*, 2004). A FA é uma enzima de ocorrência natural que está distribuída nas células e nos tecidos. A isoforma da FA intestinal está expressa em grande quantidade no revestimento intestinal (Goldberg *et al.*, 2008; Tuin *et al.*, 2009) e é considerada um marcador de diferenciação das células epiteliais do intestino (Fukushima *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2005).

Com relação a atividade antioxidante, tanto o EMHs quanto a DFHs apresentaram atividade; porém, somente a DFHs apresentou atividade

antiinflamatória, a qual foi relacionada com o uso popular do fruto para inflamação (Grandi *et al.*, 1989). Apesar do uso tradicional desta planta medicinal, não há estudos farmacológicos dos seus efeitos no trato gastrointestinal. Entretanto, estudos químicos têm relatado que o fruto de *H. stigonocarpa* é rico em fibras e carboidratos (Silva *et al.*, 2001). A fibra alimentar tem promovido benefícios na manutenção da remissão na colite humana e experimental e sua propriedade protetora têm sido atribuída ao aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no lúmen, incluindo o acetato, propionato e o butirato (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002). Os AGCC tem um importante papel na manutenção da homeostase do intestino, e o butirato é uma importante fonte de energia para os colonócitos, além de controlar o crescimento e a diferenciação celular (Rodríguez-Cabezas *et al.*, 2002; Gálvez *et al.*, 2005). Embora o mecanismo pelo qual o butirato previne a inflamação do cólon, câncer de cólon e outras desordens não está claro, têm sido sugerido que o butirato pode exercer seus efeitos protetores por meio da atividade antioxidante (Abrahamse *et al.*, 1999; Rosignoli *et al.*, 2001).

Em adição, o estudo fitoquímico do presente projeto revelou a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos e terpenos no EMHs e no fruto, e saponinas somente no EMHs. A grande maioria dos compostos antioxidantes como flavonóides, derivados de cumarinas e taninos especialmente proantocianidinas, têm sido relatada na literatura como compostos antiinflamatório intestinal (Gálvez *et al.*, 2001; Di Stasi *et al.*, 2004; Luchini *et al.*, 2008; Yoshioka *et al.*, 2008; Witaicenis *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Alguns terpenos também foram relatados como agentes protetores por prevenir o processo inflamatório intestinal (Santos *et al.*, 2004; Juhás *et al.*, 2008).

Em conclusão, o pré-tratamento com o EMHs e a DFHs foi capaz de prevenir a depleção da GSH, mas somente a DFHs diminuiu o conteúdo do MDA. Nos experimentos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, tanto o EMHs quanto o fruto apresentaram atividade. Entretanto, somente a DFHs previne parcialmente os danos colônicos induzidos pela administração do TNBS em ratos e estes efeitos protetores foram associados com a diminuição do estresse oxidativo intestinal, demonstrada pela manutenção dos níveis de GSH e inibição da atividade da MPO. Em adição, as propriedades antioxidantes observadas com o EMHs e a DFHs, bem como a

atividade antiinflamatória da DFHs, podem ser devido a presença dos compostos naturais presentes nesta planta, especialmente taninos e flavonóides. O efeito protetor da DFHs pode também estar relacionada a presença de fibras da dieta.

VI. Resultados e Discussão

Parte 3.

Artigo submetido ao *Journal of Ethnopharmacology*

ORIGINAL RESEARCH MANUSCRIPT

***Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models**

Patricia Rodrigues Orsi ^a, Flávia Bonamin ^b, Juliana Severi ^a, Raquel Cássia Santos ^b,
Wagner Vilegas ^{c,d}, Clélia Akiko Hiruma-Lima ^{b,*}, Luiz Claudio Di Stasi ^{a,*}

^a *Univ. Estadual Paulista-UNESP - Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.*

^b *Univ. Estadual Paulista-UNESP - Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.*

^c *Univ. Estadual Paulista-UNESP - Campus Experimental do Litoral Paulista, CEP 11330-900, São Vicente, SP, Brasil.*

^d *Univ. Estadual Paulista-UNESP - Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, CEP 14801-970, Araraquara, SP, Brasil.*

* Corresponding author: C.A. Hiruma-Lima and L.C. Di Stasi contributed equally to the supervision of this study. Tel.: 00+5501438116077; fax: 00+551438153744; e-mail:

(C.A. Hiruma-Lima – hiruma@ibb.unesp.br and L.C. Di Stasi – ldistasi@ibb.unesp.br)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae) is a medicinal species commonly found in the Brazilian savannah. The stem bark of this medicinal plant, popularly known as “jatobá-do-cerrado”, is widely used in tea form to treat gastric pain, ulcers, diarrhoea and inflammation, whereas its fruits pulp is edible.

Aim of the study: The aim of this study was to investigate the antidiarrheal and anti-ulcer effects of a methanolic extract derived from the stem bark (MHs) and diet with fruit pulp of *H. stigonocarpa*.

Materials and methods: The antidiarrheal action of MHs was measured against the intestinal motility and diarrhoea induced by castor oil in mice. The preventive action of MHs (50, 100, 150 and 200 mg/Kg, by oral route (p.o.) against peptic ulcers was evaluated in experimental rodent models challenged with absolute ethanol, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), ischemia-reperfusion (I/R) (200 mg/Kg, p.o.) and cysteamine (200 mg/Kg, p.o.). The main anti-ulcer mechanisms of action of MHs were analysed as follows: evaluation of the gastric juice parameters, assessment of mucus adherence to the gastric wall, determination of the role of nitric oxide (NO) and sulfhydryl compounds (SH), glutathione (GSH) levels and myeloperoxidase (MPO) activity. The healing effects from MHs (200 mg/Kg) and diet with fruit pulp (10%) against gastric and duodenal ulcers induced by acetic acid were also evaluated by treating rats over 7 or 14 consecutive days of treatment.

Results: The phytochemical profile of MHs and fruit pulp indicated the presence of phenolic compounds (mainly flavonoids and condensed tannins). MHs (200 mg/Kg, p.o.) displayed an antidiarrheal effect and were able to protect gastric mucosa against absolute ethanol (68% protection) and also against the injurious effect of NSAIDs (86% protection) when compared to the group treated with vehicle. These results were accompanied by the prevention of GSH depletion and an inhibition of MPO activity when compared to animals treated with vehicle ($P < 0.05$). MHs markedly protected duodenal mucosa against injuries caused by cysteamine (98%) and also against I/R induced gastric ulceration (80%) when compared to the group treated with vehicle. Furthermore, MHs also prevented the GSH depletion of gastric mucosa relative to the control group treated with vehicle. NO appeared to be involved in this gastroprotective

effect. MHs and diet with fruit pulp clearly demonstrated gastric healing actions after treatment for 7 (MHs – 53% inhibition) or 14 days (MHs – 60% inhibition and fruit pulp – 61% inhibition). Treatment with diet with fruit pulp for 7 days demonstrates a significant duodenal healing effect (71% inhibition) without any signs of toxicity.

Conclusions: MHs clearly demonstrate antidiarrheal, gastroprotective and cicatrising effects in experimental gastric and duodenal ulcers, and the diet with fruit pulp displays duodenal healing effects. The observed effects may be associated with the antioxidant effect, which may be due the presence of condensed tannins and flavonoids in the bark and fruit of *H. stigonocarpa*.

Keywords: *Hymenaea stigonocarpa*; Fabaceae; peptic ulcer; tannins; antidiarrheal; antioxidant.

1. Introduction

Peptic ulcer affects 10% of the world population (Zapata-Colindres *et al.*, 2006). Despite great advances in our understanding of this disease, its aetiology has not been completely elucidated. Knowledge of the pathophysiology of gastric ulcer disease remains incomplete (Glavin and Szabo, 1992). The peptic ulcer result of an imbalance between aggressive factors, such as acid-pepsin secretion, and protective mechanisms of the stomach, such as the mucosal barrier, mucus secretion, and cell regeneration (Klein-Jr *et al.*, 2010). Among various causes of peptic ulcers, lesions due to stress, alcohol consumption, *Helicobacter pylori* infection and the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs have all been shown to be mediated largely through the generation of reactive oxygen species, especially hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). On the other hand, the mucosal integrity is maintained by protective mechanisms, which include pre-epithelial factors, an epithelial “barrier”, continuous cell renewal via proliferation of progenitor cells, continuous blood flow through mucosal microvessels, an endothelial “barrier”, sensory innervation, and the generation of prostaglandins and nitric oxide (Laine *et al.*, 2008).

Although many synthetic drugs are available to treat peptic ulcers, most of these drugs have adverse reactions when used long-term (Bandyopadhyay *et al.*, 2002). For this reason, our laboratory has been interested in studying the potential protective effects afforded by natural compounds against peptic ulcers, and special interest was devoted to *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. *H.stigonocarpa* (Fabaceae) is a large tree popularly known as “jatobá-do-cerrado” that commonly grows in the Brazilian savannah. Phytochemical studies to date from different parts of the *Hymaenea* plant have demonstrated the presence of sesquiterpenes (Langenhein and Hall, 1983; Aguiar *et al.*, 2010), fatty acids (Matuda and Netto, 2005), diterpenes (Khoo *et al.*, 1973; Cunningham *et al.*, 1973; Cunningham *et al.*, 1974; Marsaioli *et al.*, 1975; Nogueira *et al.*, 2001; Abdel-Kader *et al.*, 2002), and oligosaccharides (Lima *et al.*, 1995). According to ethnopharmacological data, the stem bark and fruit of *H. stigonocarpa* are used in Brazilian folk medicine for the treatment of gastric pain, ulcers, diarrhoea, and as an anti-inflammatory (Grandi *et al.*, 1989). The stem bark, fruit, sap and resin of *H. stigonocarpa* are used in folk medicine in the following forms: decoction, syrup, infusion, sap, poultice, ointment or wine (Grandi *et al.*, 1989). The fruit pulp of *H. stigonocarpa* is also consumed in regional cuisine and the flour used fresh for the preparation of cakes, breads, cookies and hot cereal (Silva *et al.*, 2001). However, despite the ethnopharmacological indications from this medicinal species, there is no pharmacological evidence for their effects in the gastrointestinal tract (for either ulcers or diarrhoea). In this context, the aim of the present work was to investigate the antidiarrheal action of this species and the protective and healing effects of a methanolic extract of the bark of *H. stigonocarpa* and its fruit pulp on gastric and duodenal ulcers.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs and chemicals

Chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA): absolute ethanol (Sinth, Brasil), lansoprazole (Cruz Vermelha, Brasil), N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin, carbenoxolone, cimetidine, N-ethylmaleimide (NEM), Alcian Blue, cysteamine hydrochloride, histamine, castor oil, morphine, loperamide, methanol, hexadecyltrimethylammonium bromide,

trichloroacetic acid, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, ferrous sulphate, ascorbic acid, thiobarbituric acid, quercetin, ketamine hydrochloride, xylazine hydrochloride, acetic acid and NaOH.

HPLC-grade solvents were obtained from Tedia Company (Phillipsburg, USA). Deionised water (18 MΩ cm) was purified in house using a Milli-Q purification system (Millipore Co., Bedford, USA).

2.2. Plant material

The stem barks and fruits of *H. stigonocarpa* (Hs) were collected in savannah areas near Botucatu city, São Paulo State, in March 2009 by Dr. Leonardo Noboru Seito. Authentication was by the botanist Prof. Dr. Osmar Cavassan. A voucher specimen has been deposited at the Herbarium located at Unesp-Bauru (UNBA number 5691), Brasil.

2.3. Preparation of extracts

After collection, the stem barks were dehydrated, stabilised on an air circulation chamber at 50 °C for 48 hours and then milled by a mechanical grinder. The air-dried powdered barks of Hs (1545 g) were exhaustively extracted with methanol (48 h, 1.5 L, three times) at room temperature. Solvents were evaporated at 40 °C under reduced pressure to yield 118.76 g of the methanolic extract of *H. stigonocarpa* (7.6%) (MHs). For the preparation of the fruit flour, fruits were opened to gather the pulp and the seeds rejected. Then, the pulp was dehydrated and stabilised on an air circulation chamber at 40 °C for 24 hours. After drying, pulp residue was powdered in a knife mill and sequentially mixed with normal feed Labina-Purine up to 10%, using water as a vehicle. The mixture was automatically pelletised and dried in an air circulation chamber at 40 °C for 48 hours. Fingerprints of stem barks and fruits were complementary determined by means of high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection (HPLC-PAD). An aliquot (20 mg) of the bark extract and another one from the fruit were dissolved in methanol (400 µL) in an ultrasonic bath for 1 min and submitted to clean-up by solid phase extraction. Samples were loaded onto an Agilent SampliQ RP18 cartridge (1 x 1.1 cm d.i.) eluted with 1600 mL of methanol. The eluents were filtered through a 0.45 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filter and stored in amber vials. The analyses were performed on a

HPLC-PAD Jasco system equipped with a PU-2089 quaternary pump, an MD-2010 Plus Photodiode Array Detector, and an AS-2055 Plus autosampler. Separations were achieved with a Phenomenex Synergi Hydro column (C_{18} , 250 × 4.6 mm d.i., 4 μ m) equipped with a Phenomenex security guard (C_{18} , 4 × 3 mm d.i.). The mobile phase was composed of acetonitrile (eluent A) and water (eluent B), both acidified with 0.1% trifluoroacetic acid. The mobile phase ranged from 10-23% of B in 35 min to 23-90% of B in 50 min at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. The software EZCrom Elite version 3.1.7 (Agilent Technologies) was used for data acquisition and processing.

2.4. Animals

Male and female Swiss mice (25–35 g) and male Wistar rats (150–250 g) from the Central Animal House of the UNESP were used. The animals were fed with a certified Labina-Purine diet, with free access to tap water, under standard conditions of 12 h dark-12 h light cycle, humidity (60 ± 1.0%) and temperature (21 ± 1°C). The animals were fasted before all experimental procedures. Standard drugs and MHs (bark) were administered orally (gavage) using a saline solution (10 mL/Kg) as the vehicle, whereas fruit flour was added to the diet as food. The animals were housed in cages with raised floors made of wide mesh to prevent coprophagy. All experiments were performed in the morning and followed the recommendations of the Canadian Council on Animal Care (Olfert *et al.*, 1993). The UNESP Institutional Animal Care and Use Committee approved all of the employed protocols (42/04-CEEA).

2.5. Antioxidant activity

Additional *in vitro* experiments were performed to evaluate the antioxidant activity of different concentrations of MHs (1.14 -145.45 μ g/ml). This *in vitro* test was evaluated using a thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay (Witaicenis *et al.*, 2010) modified from the original protocol described by Stocks *et al.* (1974). Briefly, rat brain samples were obtained from two-month-old male Wistar rats. Tissue samples were homogenised 1:4 (w/v) in buffer containing 19 parts of NaH₂PO₄ (10 mM) and 81 parts of Na₂HPO₄ (10 mM) (pH 7.4) to obtain membrane supernatant after centrifugation (22176 × g/15 min/4 °C). This membrane suspension was diluted 1:10

(v/v) in the above-mentioned buffer solution. Next, buffers (in the assays without inhibitors) or different concentrations of MHs were added. Lipid peroxidation was non-enzymatically induced with 100 mol/L of both ferrous sulphate and ascorbic acid. After incubation at 37 °C for 12 min, the reaction was stopped and malondialdehyde (MDA) determined by 0.5% thiobarbituric acid reaction in 20% trichloroacetic acid. Measurement of the absorbance of the supernatants was read at 532 nm. The resultant products of the thiobarbituric acid reaction were taken as indicators of lipid peroxidation in membrane fractions. The flavonoid quercetin was used as a reference and tested in the same assay system.

2.6. Acute toxicity and Hippocratic Screening

Male and female Swiss mice were randomly divided into groups ($n = 10$) that orally received saline solution (10 mL/Kg) or MHs at the same dose of 5000 mg/Kg. After oral administration, the acute toxicity and behavioural parameters were described according to the methods of Souza-Brito (1994). The observations were performed at 30, 60, 120, 240 and 360 min after the oral treatments. For 14 days, the animals were weighed and the number of deaths noted. On the 14th day, mice were sacrificed and the heart, liver, kidney, lung, spleen, testicles (male), ovaries and uterus (female) collected. We compared all parameters from animals treated with MHs with those obtained from the respective control group treated with vehicle (saline).

2.7. Gastrointestinal motility in mice

Male Swiss mice ($n=7$) were weighed and deprived of food for 6 h, but they had free access to water. At time zero, the animals received vehicle (saline) as the negative control, 2.5 mg/Kg of morphine as the positive control or MHs at doses of 100, 150 and 200 mg/Kg by oral gavage. Thirty minutes after treatment, all groups received activated charcoal (0.1 mL/10 g, orally) and were sacrificed 30 min later. The results were expressed as a percentage of the total length of the small intestine. The distance travelled by the charcoal relative to the total length of the small intestine was calculated for each mouse to express the percentage of distance travelled and converted by arcsin (Stickney and Northup, 1959, with modifications).

2.8. Diarrhoea induced by castor oil

Five groups of male Swiss mice (n=7) were orally treated with vehicle saline (10 mL/Kg), MHs (100, 150 and 200 mg/Kg) or loperamide (5 mg/Kg) 30 min before castor oil (0.2 mL/animal) administration. Immediately after ingesting castor oil, each animal was kept in an individual cage with a floor lined with blotting paper and observed for 5 h. The following parameters were monitored: time to initial evacuation (min), evacuation classification: 1 (normal stool), 2 (semi-solid stool), and 3 (watery stool) and evacuation index (EI), expressed according to the following formula: $EI = 1 \times (n^{\circ} \text{ stool } 1) + 2 \times (n^{\circ} \text{ stool } 2) + 3 \times (n^{\circ} \text{ stool } 3)$ (Awouters, 1978, modified by Mukherjee *et al.*, 1998).

2.9. Evaluation of the lesions

Based on their respective specifications, the groups under each experimental model included positive (carbenoxolone, lansoprazole or cimetidine) and negative (vehicle-saline) controls. Moreover, the animals were kept in cages with raised floors of wide mesh to prevent coprophagy. After each experiment the animals were euthanized with CO₂ gas, the stomachs are excised, cut along the greater curvature, and gently rinsed und tap water pressed onto a glass plate, and scanned so that the lesions could be counted with aid of the AVSoft program. The results were expressed as total ulcerated area (mm²).

2.10. Evaluation of gastroprotective activity

Ethanol-induced ulcers - This experiment was performed as described by Morimoto *et al.* (1991) and Glavin and Szabo (1992). Male albino Wistar rats were randomly distributed into 6 groups (n = 8) and fasted for 18 h prior to receiving an oral dose of the vehicle (saline; 10 mL/Kg), lansoprazole (30 mg/Kg) or MHs (50, 100, 150 or 200 mg/Kg body weight). After 60 min, all groups were treated orally with 1 mL of absolute ethanol to induce gastric ulcers. According to Glavin and Szabo (1992), the ulcers can be examined 1-2 h after ethanol administration. Time course studies revealed that most gastric damage. After another 1 h, the animals were sacrificed, and the extent of the lesions was measured by AvSoft® Bioview Spectra, Brasil. The lesion measurements were expressed as mm².

NSAID-induced gastric ulcers in rat - In this model (Guidobono *et al.*, 1997 with modifications), gastric lesions were induced with indomethacin (50 mg/Kg, p.o) administered to male Wistar albino rats (n=8) after an 18 h fast. MHs (50, 100, 150 or 200 mg/Kg body wt.), cimetidine (100 mg/Kg) or vehicle was orally administered 30 min before the induction of the gastric lesions. The animals were sacrificed 6 h after treatment with the ulcerogenic agent. The stomachs were removed, and gastric lesions were measured as described above.

Determination of Gastric Secretion - The assay was performed according to the method of Shay *et al.*, 1945 with a few modifications. Male Wistar albino rats (n=10) were randomly divided into three groups and fasted for 18 hours with free access to tap water. The determination of gastric secretion was performed by two routes as follows: **Oral route:** Thirty minutes after oral administration of MHs (200 mg/Kg, which is the dose that provided the best gastroprotective results), cimetidine (100 mg/Kg) as a positive control or vehicle (saline, 10 mL/Kg), pylorus ligation was performed as described by Shay (1945). **Intraduodenal route:** All groups of male rats (n=10) were fasted for 18 h with free access to water. Immediately after pylorus ligation, MHs (200 mg/Kg), cimetidine (100 mg/Kg) or saline (10 mL/Kg) was administered by an intraduodenal route. One hour after the ligation, all animals received histamine (100 mg/Kg) subcutaneously. All animals were sacrificed 4 h later, the stomachs removed, the gastric lesions measured (mm²), and the gastric content collected to determine the total amount of gastric juice acid (mL) and pH values (unit). Distilled water was added until a 10 mL volume was reached, and the resultant solution was centrifuged at 3.000 x g for 10 min. Total acid in the gastric secretion volume was determined in the supernatant by titration to pH 7.0 with 0.01 N NaOH (mEq/mL/4 h).

Assessment of mucus adhered to the gastric wall – The procedure was performed according to the methods described by Come *et al.* (1974) and modified by Rafatullah *et al.* (1990). After fasting for 18 h, a longitudinal incision was made below the xiphoid apophysis for the pylorus ligation in anaesthetised rats (n=8). Vehicle (saline; 10 mL/Kg), carbenoxolone (200 mg/Kg) or MHs (200 mg/Kg) was orally administered for 1 hour before the ligation. Four hours later, the animals were sacrificed and the glandular portion of the stomach separated, weighed and immersed in a solution of Alcian Blue to quantify the mucus. For each sample, the absorbance at 598 nm was

measured in a spectrophotometer, and the results are expressed as μg of Alcian blue/g of tissue.

Ethanol-induced gastric lesions in L-NAME- and NEM-pretreated rats - The procedure was performed according to the methods described by Matsuda *et al.*, 1999. Gastric mucosal lesions were induced in male Wistar rats ($n=7$). Male Wistar rats fasted for 18 h were randomly divided into nine groups, three of which each received saline (i.p.), 70 mg/Kg of NO synthase inhibitor (L-NAME) or 10 mg/Kg of sulphhydryl depleter (NEM). Thirty minutes after the pretreatment, the oral treatments were applied (saline, carbenoxolone 100 mg/Kg or MHs 200 mg/Kg). Sixty minutes later, 1 mL of absolute ethanol was given to each rat; all animals were sacrificed after 1 h. The stomachs were removed to determine gastric lesion areas (mm^2).

Acute gastric mucosal lesions induced by ischemia-reperfusion in rats - Ischemia-reperfusion (I/R) erosions were produced in three groups of rats ($n=10$) using the method originally proposed by Ueda *et al.* (1989). The rats were deprived of food for 18 h before the experiments but allowed access to tap water *ad libitum*. Briefly, under anaesthesia (0.08 mL/100 g of ketamine hydrochloride and 0.04 mL/100 g xylazine hydrochloride), the celiac artery was clamped with a small clamp for 30 min. Then, the clamp was removed, and reperfusion occurred for 60 min. Vehicle (saline, 10 mL/Kg), lansoprazole (30 mg/Kg) or MHs (200 mg/Kg) was administered orally 60 min prior to the experiments. The untreated group comprised animals that were submitted to the abdominal incision but not to I/R. After 60 min of reperfusion, the animals were sacrificed and their stomachs excised for biochemical determinations. The gastric mucosal injury was measured by AvSoft[®] Bioview Spectra (Brasil) and expressed as mm^2 .

2.11. Evaluation of the preventive effect of MHs on duodenal ulcers in rats

Cysteamine duodenal ulcer in rats- Duodenal ulcers were induced in male albino Wistar rats by two oral administrations of cysteamine hydrochloride (400 mg/Kg) in saline solution at an interval of 4 h. MHs (200 mg/Kg), lansoprazole (30 mg/Kg) or vehicle (saline; 10 mL/Kg) was administered 30 min before the first dose of cysteamine. One untreated group was used to evaluate the normal parameters of the duodenum mucosa. All animals were sacrificed 48 h after the first dose of cysteamine. Each duodenum was cut open along the antimesenteric side and rinsed with saline.

The duodenal score was determined using the following 4-point scale: 0 = no lesion, 1 = superficial mucosal erosion, 2 = deep ulcer or transmural ulcer, and 3 = perforated or penetrated ulcer (Szabo, 1978). The macroscopic duodenal area was recorded using AvSoft® Bioview Spectra (Brasil) and expressed as mm².

*2.12. Evaluation of curative effect of MHs and fruit pulp of *Hymenaea stigonocarpa* (Hs) in the gastric and duodenal ulcers induced by acetic acid in rats.*

The experiments were performed according to the method described by Okabe *et al.* (1971) and modified by Konturek *et al.* (1988). Gastric mucosal and duodenal lesions were induced in male albino Wistar rats (n=8) that were fasted for 18 h but had free access to water. An incision was made in the abdomen of animals under anaesthesia, and a plastic mould (4.2 mm in diameter) was placed tightly on the stomach in the first experiment and serosal surface of the duodenal wall; the mould was approximately 5 mm distal to the pylorus in the second experiment. Acetic acid (80%, 70 µl) was poured into the mould and allowed to remain for 20 s on the stomach and 10 s on the duodenal wall. The stomach and duodenum were bathed with saline (20 °C) to remove the acetic acid. The abdomen was then closed, and all of the animals were fed normally. The animals were treated for 7 or 14 consecutive days beginning one day after surgery. MHs (200 mg /Kg), lansoprazole (30 mg /Kg) or saline were administered orally and the fruit flour in the diet (10%) was placed in a cage as food (40 g daily for monitoring the consumption, in individual boxes). On the day after the last administration, the rats were sacrificed and their stomachs and duodenum removed. Body weight and food consumption were assessed throughout the experiment. The gastric and duodenal lesions were evaluated by examining the inner gastric and duodenal surfaces with a dissecting magnifying glass. The macroscopic images of the gastric and duodenal ulcers were recorded using AvSoft® Bioview Spectra (Brasil) and expressed as mm².

*2.13. Evaluation of *Hymenaea stigonocarpa* subacute toxic activity*

We evaluated the subacute toxic activity of these substances in groups of rats treated with MHs and diet with fruit pulp (Hs) (10%). Animals were subjected to daily treatment with MHs and Hs (10%) for 14 days after induction of injury with acetic acid.

The parameters studied were body weight and macroscopic analysis of the vital organs: heart, lungs, liver, spleen and kidneys. In addition, the blood of the animals was collected for analysis of biochemical and enzyme parameters, including serum gamma-GT (gamma glutamyltransferase), urea, creatinine, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase) and glucose. Analyses were quantified using the SBA-200 automatic biochemical analyser and CELM[®] kinetics and colourimetric kits (Brasil) available for use by the Clinical Analysis laboratory of the Veterinary Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of Unesp, Botucatu, under the guidance of Prof^a. Dr. Regina Kiomi Takahira.

2.14. Biochemical determinations from gastric and duodenal mucosa

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured according to the technique described by Krawisz *et al.* (1984). Samples were suspended in 1 ml of 50 mM phosphate buffer incorporating 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (pH 6.0) and minced with scissors for 15 s on an ice-cold plate. The resultant suspension was subsequently diluted to a final 1:20 (w/v) ratio and homogenised for 1 min with an automatic Heidolph homogeniser, then sonicated for 10 s and subjected to three freeze–thaw cycles. The homogenates were then centrifuged at 7000×g and 4 °C for 10 min, and the supernatants were assayed for MPO activity. The results are expressed as MPO units per gram (U/g) of wet tissue.

Total glutathione content (GSH) was quantified with the recycling assay described by Anderson (1985). Samples were thawed, minced, diluted 1:20 (w/v) in ice-cold 5% (w/v) trichloroacetic acid and homogenised. The homogenates were centrifuged at 7000 × g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were used to quantify GSH. The results are expressed as nanomoles per gram (nmol/g) of wet tissue.

2.15. Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± S.E.M., and the differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA). Significant differences were determined using the Dunnett post-test (for three or more groups) or, for non-

parametric results, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test; $P < 0.05$ considered to be statistically significant.

3. Results and Discussion

Acute toxicological studies have showed that an oral administration of 5000 mg/Kg of *H. stigonocarpa* methanolic stem bark extract (MHs) did not produce any sign of acute toxicity in the animals (male and female). Over the 14 days following the oral administration of MHs, none of the animals died and no significant changes in daily body weight or organ weight were observed through the end of this period (data not shown). These results ensured the continuance of pharmacological studies on this species using the oral route and motivated us to proceed with the biological assays.

Based on ethnopharmacological data of the antidiarrheal effects of *H. stigonocarpa* bark (Grandi *et al.*, 1989) and the fact that intestinal motility affects the luminal absorption and regulates the bioavailability of an orally administered drug (Lee *et al.*, 2000), we evaluated the effect of MHs on diarrhoea and on intestinal motility. All mice from the control group (treated with vehicle) produced copious diarrhoea after castor oil administration (Table 1). However, pre-treatment with MHs (100, 150 and 200 mg/Kg) induced a significant delay in the onset of the copious diarrhoea (61, 50 and 53%, respectively, relative to the vehicle) (Table 1). The decrease in the severity of the diarrhoea as measured by the evacuation index was also observed in a group of animals treated with 100 mg/Kg MHs or loperamide. Treatment with MHs (100, 150 and 200 mg/Kg) before the cathartic agent (castor oil) significantly decreased liquid evacuation similar to the results produced by loperamide ($P < 0.05$).

Although the fruit pulp shows laxative effect (Brandão, 1993), was not tested in this experiment, due to the difficulty of testing the fruit pulp as diet in this experimental model. The antidiarrheal effect of MHs was not accompanied by a reduction in intestinal transit. The effect of MHs on normal intestinal propulsion of mice was tested with different doses of the extract (Table 2). In the MHs-treated group of mice, all doses of extract did not change the normal intestinal propulsive movement relative to the morphine group; morphine produced a greater anti-motility effect ($P < 0.05$).

Table 1. Effects of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* of the bark (MHs) on antidiarrheal induced by castor oil in mice.

Treatment (p.o.)	Dose (mg/Kg)	N	Time to initial Evacuation (min)	Evacuation classification			Evacuation index (EI)	Inhibition # (%)
				Normal	Semi-solid	Liquid		
Vehicle	-	7	59.66 ± 7.30	0.50 ± 0.34	0.00 ± 0.00	7.00 ± 1.26	21.50 ± 3.99	-
Loperamide	5	7	228.14 ± 11.85 **	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.80 ± 0.80 **	2.60 ± 2.60 **	88
MHs	100	7	77.14 ± 14.73	1.00 ± 0.31	2.14 ± 0.59	1.00 ± 0.30 *	8.28 ± 0.97 *	61
	150	7	114.83 ± 18.51 *	0.50 ± 0.22	3.66 ± 0.71 **	1.00 ± 0.36 *	10.83 ± 2.21	50
	200	7	113.28 ± 5.93 *	1.00 ± 0.22	4.14 ± 0.85 **	0.28 ± 0.18 ***	10.14 ± 1.79	53

Data are presented as mean ± S.E.M. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test, and significant differences were represented by *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001 vs control group treated with vehicle. For classification of evacuations and calculation of EI, Kruskal-Wallis followed by Dunn * P<0.05, **P<0.01 in relation the vehicle. # Inhibition in relation to evacuation index.

Table 2. Effect of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) on intestinal propulsion induced by activated charcoal in mice.

Treatment (p.o.)	Dose (mg/Kg)	N	Distance moved by charcoal (arcosine)
Vehicle	-	7	75.34 ± 3.75
Morphine	2.5	7	42.10 ± 3.70**
MHs	100	7	71.53 ± 3.14
	150	7	71.63 ± 6.02
	200	7	70.22 ± 4.00

Data are presented as mean ± S.E.M. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test and significant differences were represented by **P<0.01 vs control group treated with vehicle.

As a part of the pharmacological study of the gastroprotective effects of MHs, the extract was evaluated in experimental models of gastric ulcers induced by multiple damaging agents (Table 3). Daily, the gastric mucosa is challenged by a variety of both endogenous and exogenous irritants (aggressive factors) including ethanol, gastric acid, pepsin, reactive oxygen species, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and *Helicobacter pylori* (Holzer, 1998). In this context, treatment with anti-ulcer compounds that possess anti-secretory, gastroprotective, spasmolytic, immunomodulatory, antibacterial and/or anti-inflammatory effects seems interesting as it may lead to the use of certain compounds with multitarget actions, e.g., medicinal plants (Wagner, 2006). Among the different doses of MHs evaluated in this study, the gastroprotective effect was found to be most effective at the 200 mg/Kg dose in both experimental models. The gastric damage in the group treated with MHs was significantly decreased, by 68% in the (absolute ethanol model and 86% in the NSAID model when compared to their respective control groups treated with vehicle ($P < 0.05$). These gastroprotective effects of MHs in both experimental models were also accompanied by biochemical changes. The MHs groups demonstrated a restoration of glutathione levels, an important marker of oxidative damage (Buffinton *et al.*, 1995) in the gastric mucosa before gastric damage was induced by ulcerogenic agents. This protective effect in MHs groups was accompanied by a significant reduction in MPO activity in the group treated with 200 mg/Kg MHs. The decrease in myeloperoxidase activity in the gastric mucosa of the group pre-treated with MHs might be interpreted as an anti-inflammatory property of a given compound (Veljaca *et al.*, 1995). Therefore, considering both the gastric lesion and the biochemical parameters, MHs at 200 mg/Kg demonstrated a preventive effect against induced damage in the gastric mucosa in the two models used.

Table 3. Effects of different doses from methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* of the bark (MHs) on models of gastric induced lesions in rats.

Methods	Treatments (p.o.)	Dose (mg/Kg)	N	Gastric Lesion (mm ²)	Inhibition (%)	GSH nmol/g	MPO U/g
Absolute Ethanol	sham	-	5	-	-	2136.34 ± 142.95**	322.60 ± 26.58*
	Vehicle	-	12	112.48 ± 19.42	-	1583.84 ± 61.98	845.97 ± 147.53
	carbenoxolone	100	6	25.31 ± 13.22 **	77	2032.80 ± 101.73**	387.78 ± 95.94*
	MHs	50	6	148.36 ± 47.46	-	1457.93 ± 107.19	1087.48 ± 343.86
		100	6	170.38 ± 47.65	-	1379.18 ± 84.33	572.12 ± 81.99
		150	8	23.70 ± 5.21**	79	1568.64 ± 101.00	371.96 ± 44.80*
	200	10	35.52 ± 13.90**	68	1855.71 ± 88.83*	481.25 ± 49.61*	
NSAID	sham	-	6	-	-	2089.40 ± 277.49**	323.83 ± 13.64**
	Vehicle	-	8	40.12 ± 11.42	-	1098.50 ± 116.89	798.35 ± 101.76
	Cimetidine	100	6	1.17 ± 0.98 **	97	1883.15 ± 68.03**	844.37 ± 82.98
	MHs	50	8	24.87 ± 10.73	-	1233.59 ± 35.84	838.12 ± 170.03
		100	7	20.57 ± 5.54	-	1243.57 ± 83.49	1125.62 ± 115.03
		150	8	36.5 ± 16.69	-	1502.36 ± 100.39	702.63 ± 110.05
		200	8	5.50 ± 2.54 **	86	1630.12 ± 108.07*	516.60 ± 33.43*

Results are expressed in mean ± S.E.M. ANOVA followed by Dunnett's test: gastric lesion, GSH and MPO: *P<0.05, **P<0.01, represents difference in relation to control group treated with the vehicle.

The next step of this study was the evaluation the effect of MHs on gastric juice parameters of the extract by either an oral or intraduodenal route through the pylorus ligation mode. We evaluated the systemic effect of MHs in the pylorus ligation model using histamine (secretagogue) and the combination of this secretagogue with extract. The oral and intraduodenal administration of MHs was not able to change the pH of the gastric juice (oral route = MHs - 0.6 ± 0.4 vs vehicle - 1.0 ± 0.6 and intraduodenal route = MHs - 1.2 ± 0.1 vs histamine - 1.1 ± 0.1). Therefore, the MHs did not act as an antacid or as buffer solution in contact with gastric mucosa, as indicated by the lack of antisecretory effects in the gastric juice. The gastric mucus is one of the most important protective features for the gastric mucosa, and the effect of MHs in the amount of gastric mucus was also evaluated in pylorus-ligated rats. We observed that the amount of adhered gastric mucus was not augmented by treatment with MHs (200 mg/Kg) when compared to the animals treated with vehicle (MHs- 1350.81 ± 111.59 and vehicle- 1524.71 ± 156.69 $\mu\text{g/g}$ of tissue) (data not shown). These results rule out an increase in the amount of mucus as a potential mechanism of action for the gastroprotective effect of MHs.

We investigated the involvement of endogenous sulfhydryls in the gastroprotective effect of MHs using NEM (N-ethylmaleimide), a sulphhydryl compound depletor (SHs). Non-protein sulphhydryl (NP-SH) compounds are important components of the gastric mucus. NP-SH compounds exert gastroprotective effects by maintaining the integrity of the mucosal barrier and by binding free radicals formed due to the action of noxious agents such as ethanol (Szabo and Vattay, 1990). The involvement of endogenous sulfhydryls compounds was analysed by pretreating with NEM, and we observed that MHs did not change the protective effect (data not shown), eliminating another possible gastroprotective mechanism. According to Gomes *et al.* (2009), the absence of NP-SH involvement and the unchanged gastric secretion parameters (as observed in pylorus-ligated rats) strongly indicate the absence of mucus involvement in MHs gastroprotection.

In addition to NP-SH, endogenous nitric oxide (NO) is important for maintaining gastric epithelial integrity and mucus barriers (Tulassay and Herszényi, 2010). Previous studies indicated the involvement of NO in the gastric protection observed experimentally by promoting blood vessel dilatation and reducing lipoperoxidation,

acting similarly to an anti-inflammatory drug (Ancha *et al.*, 2003). The gastroprotective effect of MHs was challenged with L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl-ester), a nitric oxide synthase inhibitor. Pretreatment of animals L-NAME markedly increased gastric lesions of animals treated with MHs (Figure 1), a group that previously had 76% inhibition of gastric lesions. These results demonstrated the involvement of NO in the gastroprotective effect of this extract. The known ability of NO to decrease lipoperoxidation, act as an antioxidant and increase vasodilation enables NO to reverse some important types of tissue injury such as ischemia.

Figure 1

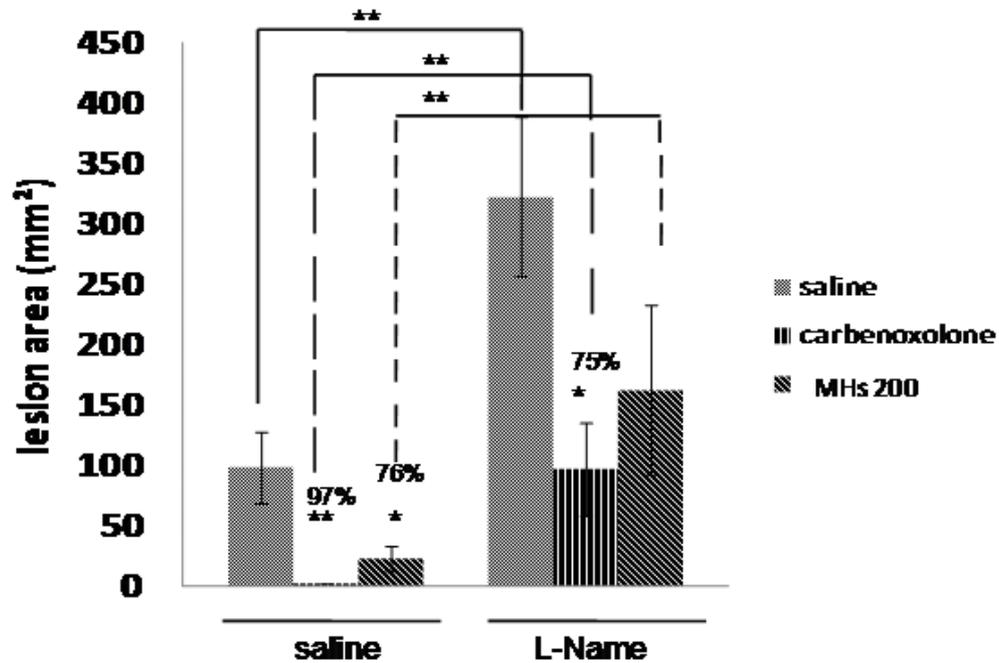


Figure 1: Effects of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) on gastric lesions induced by ethanol in rats pretreated with L-NAME (an inhibitor of NO synthase). The bars represent mean \pm S.E.M for lesion area. The numbers indicate the percentage protection in relation to the control group treated with vehicle. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test, and significant differences were represented by * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs control group treated with vehicle.

Ischemia/reperfusion (I/R) induced gastric lesions are linked to free radical (FR) formation (El-Abhar *et al.*, 2003). Ischemia followed by reperfusion leads to tissue injury (Piper *et al.*, 2003). The restoration of blood flow (reperfusion) after a period of ischemia initiates a cascade of changes, including the release of local reactive oxygen species (ROS) and an increase in the adhesion of neutrophils to endothelial cells, which causes damage to the integrity of the mucosal lining via free radical release (Rastogi *et al.*, 1998; Abdallah *et al.*, 2009).

When the stomach was subjected to ischemia and reperfusion (I/R), the severity of gastric lesions was significantly increased. The group treated with MHs displayed a significant reduction in gastric lesions of approximately 5-fold ($3.87 \pm 1.95 \text{ mm}^2$) when compared to the group control saline ($19.6 \pm 6.5 \text{ mm}^2$) (Figure 2). Our results show that MHs markedly protects against gastric ulceration induced by I/R (80%) compared to the control group treated with saline. These effects were accompanied by an ability to maintain the GSH content at high levels when compared to the group treated with vehicle. Kobata *et al.* (2007) described a marked increase in mucosal MPO activity in the stomach after I/R, confirming the infiltration/activation of neutrophils in the gastric mucosa during I/R. However, MHs did not change the levels of MPO (Figure 2).

Figure 2

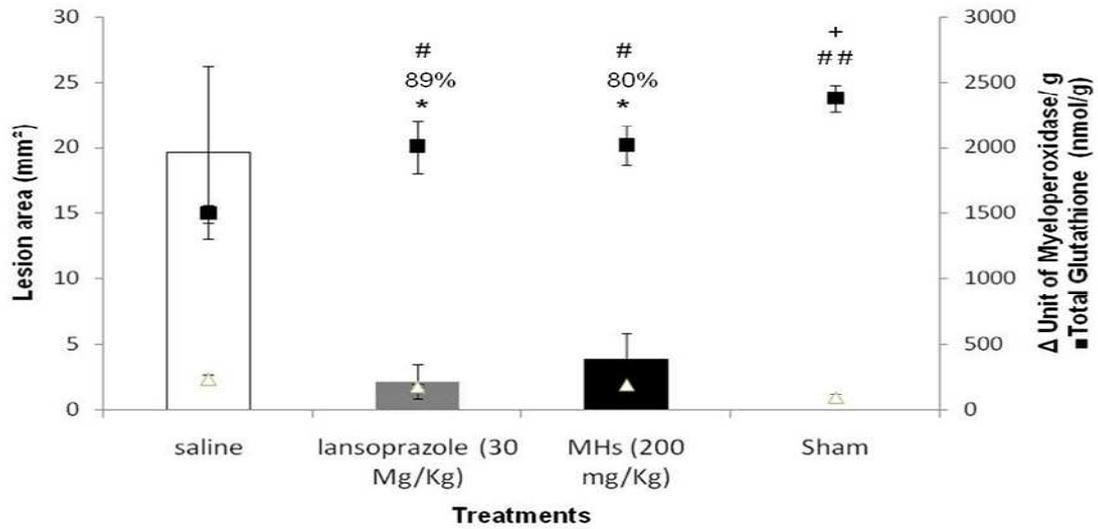


Figure 2: Gastroprotective activity of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) barks on levels of total glutathione and myeloperoxidase on model of gastric injury induced by ischemia/ reperfusion in rats (n=8-10). The bars represented as mean \pm S.E.M for lesion area. The numbers indicate the percentage protection in relation to the control group treated with vehicle. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test and significant differences were represented by $P^* < 0.05$ for lesion area, $^{\#}P < 0.05$ and $P < 0.01^{\#\#}$ for total glutathione, $+P < 0.05$ for myeloperoxidase vs control group treated with vehicle.

Many studies have reported various mechanisms involved in cysteamine-induced duodenal ulcers, including reduced somatostatin bioavailability and elevated gastrin secretion (Seiler *et al.*, 1983). This model has been considered the standard model for experimental duodenal ulcers and has been used for the biological efficacy assessment of new anti-ulcer drugs. According to Khomenko *et al.* (2009), animals treated with cysteamine display a significant increase in duodenal lesions due to the generation of free radicals. Figure 3 shows that duodenal injuries caused by cysteamine were significantly reduced after treatment with MHs (98%) comparing to in the group treated with vehicle. The glutathione (GSH) levels and myeloperoxidase activity (MPO) in the duodenum of experimental animals are also shown in Figure 3. The role of GSH in gastric mucosa in counteracting free radical production has been extensively reported (Townsend *et al.*, 2003). Our results reveal the duodenal damage in the saline control group to be biochemically characterised by a 7-fold increase in duodenal MPO activity and by significant duodenal GSH depletion when compared to sham, both consequences of the oxidative stress that takes place in the damaging process. Although animals treated with MHs demonstrated the same MPO activity as that exhibited by the saline control group, the extract prevented the depletion of GSH (2171.68 ± 129.75 nmol/g of tissue) that occurred in the saline control group (1381.36 ± 63.85 nmol/g of tissue) (Figure 3). Glutathione is essential in controlling the redox state in the cell via several mechanisms including the scavenging of reactive oxygen species and the maintenance of glutathione peroxidase enzymatic levels in a reduced state (Sies, 1999). Thus, the duodenal and gastric protective effects of MHs may be mediated by its antioxidant properties. This property of MHs was also observed in the antioxidant activity assay, in which MHs had an IC_{50} value of 5.25 ± 0.23 μ g/mL. The corresponding IC_{50} value of quercetin was 0.33 ± 0.01 μ g/mL.

Figure 3

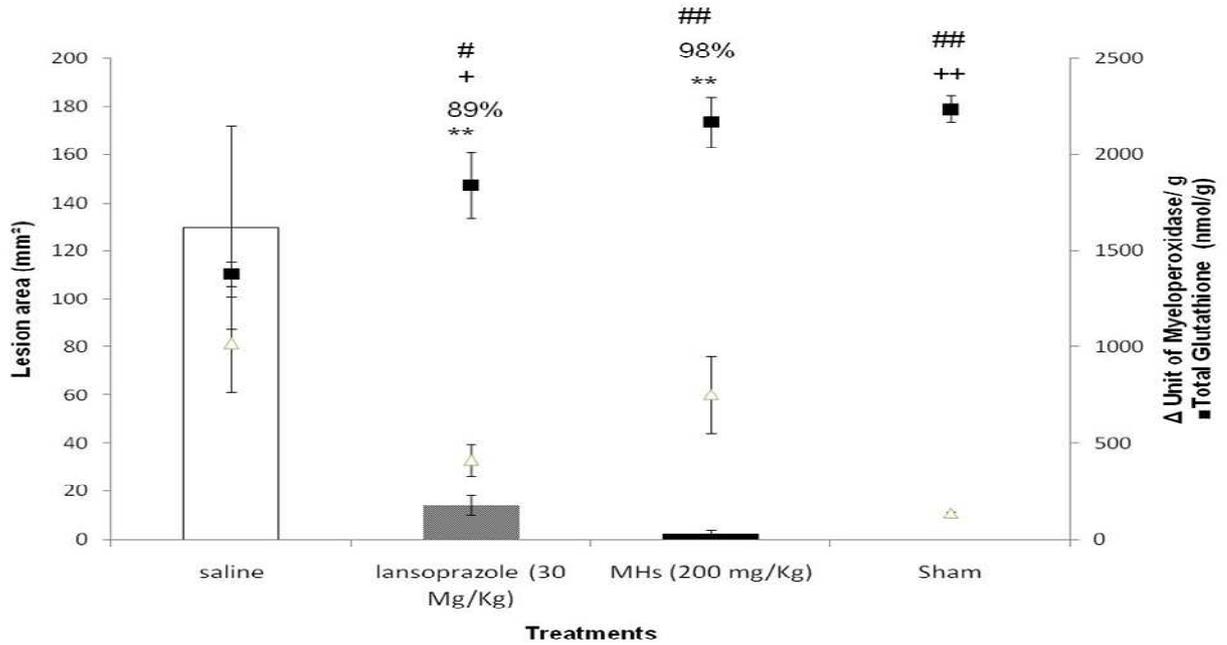


Figure 3: Effect of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) on lesion area, level of total glutathione and myeloperoxidase on model of duodenal injury induced by cysteamine in rats (n=8). The bars represented as mean \pm S.E.M for lesion area. The numbers indicate the percentage protection in relation to the control group treated with vehicle. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test, and significant differences were represented by ** $P < 0.01$ for lesion area, # $P < 0.05$ and $P < 0.01$ ### for total glutathione and + $P < 0.05$ and ++ $P < 0.01$ for myeloperoxidase vs control group treated with vehicle.

The cicatrisation assay was performed using the acetic acid method, which, according to Okabe and Amagase (2005), most closely approximates human gastric ulcers. New drugs that prevent ulcer relapse and enhance ulcer healing could potentially be developed using this established method. Based on the use of bark in folk medicine against gastric ulcers and also the practice of consuming the fruit pulp of this species as food, we evaluated the healing activity of MHs and diet with fruit pulp in the healing ulcer model induced by acetic acid. Thus, this study determined the effect of MHs (200 mg/Kg) and diet with fruit pulp Hs (10%) during 7 or 14 consecutive days on the healing of gastric (Figure 4) and duodenal ulcers (Figure 5) induced by acetic acid in rats. After 7 days of treatment to the gastric mucosa, MHs and lansoprazole improved ulcer healing by shrinking the size of the lesion area compared to the vehicle (53% and 83%, respectively). In the groups treated with lansoprazole and diet with fruit pulp Hs, there was a significant maintenance of glutathione levels (Figure 4). After the 14-day MHs treatment, lansoprazole and diet with fruit pulp were able to heal gastric ulcers by decreasing the lesion area (83%, 60% and 61%, respectively) in relation to the control group treated with vehicle. However, only treatment with lansoprazole prevented depletion of glutathione (Figure 4). Figure 5 shows that lansoprazole and diet with fruit pulp were effective in healing duodenal ulcers by decreasing the lesion area compared to the vehicle (61% and 71%, respectively). However, the results in Figure 5 show that only treatment with lansoprazole for 14 consecutive days was able to reduce the duodenal ulcers (72%). The results in Figure 5 also demonstrate that treatment with MHs and diet with fruit pulp was able to prevent depletion of glutathione in healing duodenal ulcers within 7 or 14 consecutive days of treatment compared to the control group treated with vehicle. Taken together, these results reinforce the marked effect of MHs and also of diet with fruit pulp in inhibiting gastric and duodenal lesions and in promoting the healing of chronic gastric and duodenal ulcers in rats.

Figure 4

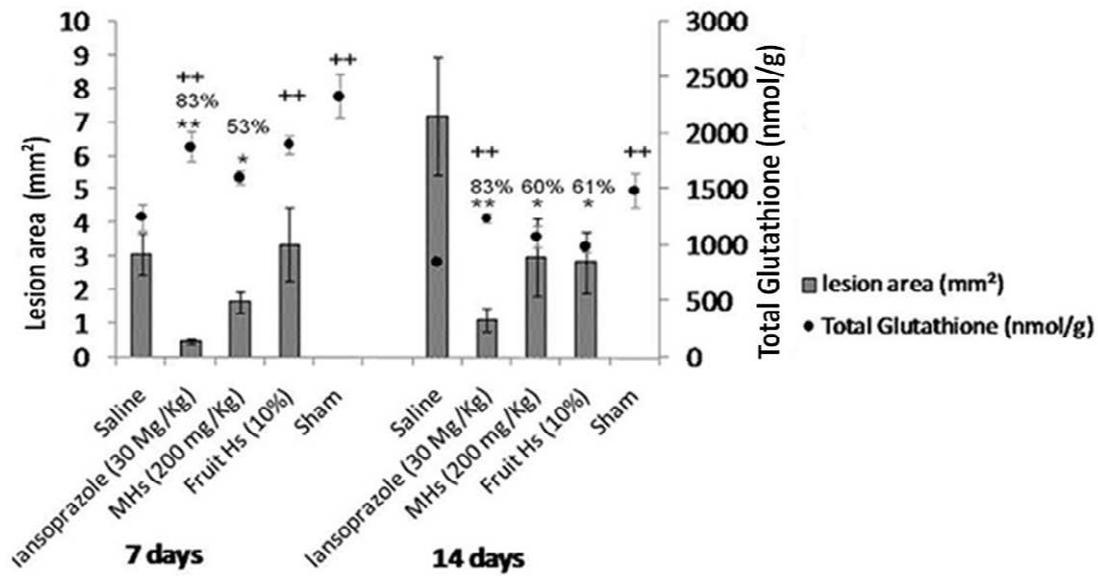


Figure 4: Gastric healing effect of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) and fruit pulp by treatment during 7 or 14 days after injury induced by acetic acid in rats (n=8). The bars represented as mean \pm S.E.M for lesion area. The numbers indicate the percentage protection in comparison to the control group treated with vehicle. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test, and significant differences were represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for lesion area; ++ $P < 0.01$ for total glutathione vs control group treated with vehicle.

Figure 5

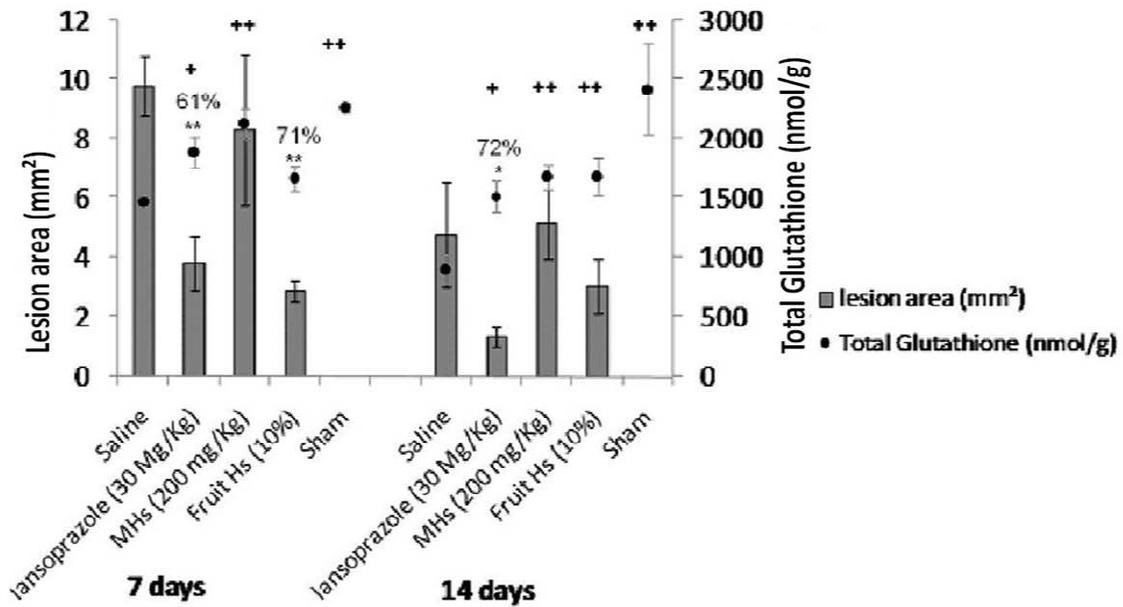


Figure 5: Duodenal healing effect of methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) and fruit pulp by treatment during 7 or 14 days after injury induced by acetic acid in rats (n= 8). The bars represented as mean \pm S.E.M for lesion area. The numbers indicate the percentage protection in comparison to the control group treated with vehicle. ANOVA was employed, followed by Dunnett's test, and significant differences were represented by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for lesion area; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ for total glutathione vs control group treated with vehicle.

Toxicity analysis performed in the cicatrisation model (14 days) did not show any toxic effects from the MHs and diet with fruit pulp, and no behaviour changes were observed during treatment. The body weight of the animals progressed similarly in all groups, and there was no significant difference in the organ weights between groups. Biochemical analysis of AST (unspecific marker of hepatic damage), ALT (specific marker of hepatic parenchymal damage), gamma-GT (initial indicator of hepatic toxicity), creatinine, glucose and urea (markers of renal damage) in the serum of the animals treated for 14 consecutive days with MHs or diet with fruit pulp did not reveal any alterations (Table 4), indicating that during the treatment period neither substance demonstrated any signs of toxicity.

Table 4. Effect of methanolic extract of the bark of *Hymenaea stigonocarpa* (MHs) and fruit pulp of *Hymenaea stigonocarpa* (Hs) (10%) on biochemical parameters of toxicity in rats submitted to the gastric lesions induced by acetic acid.

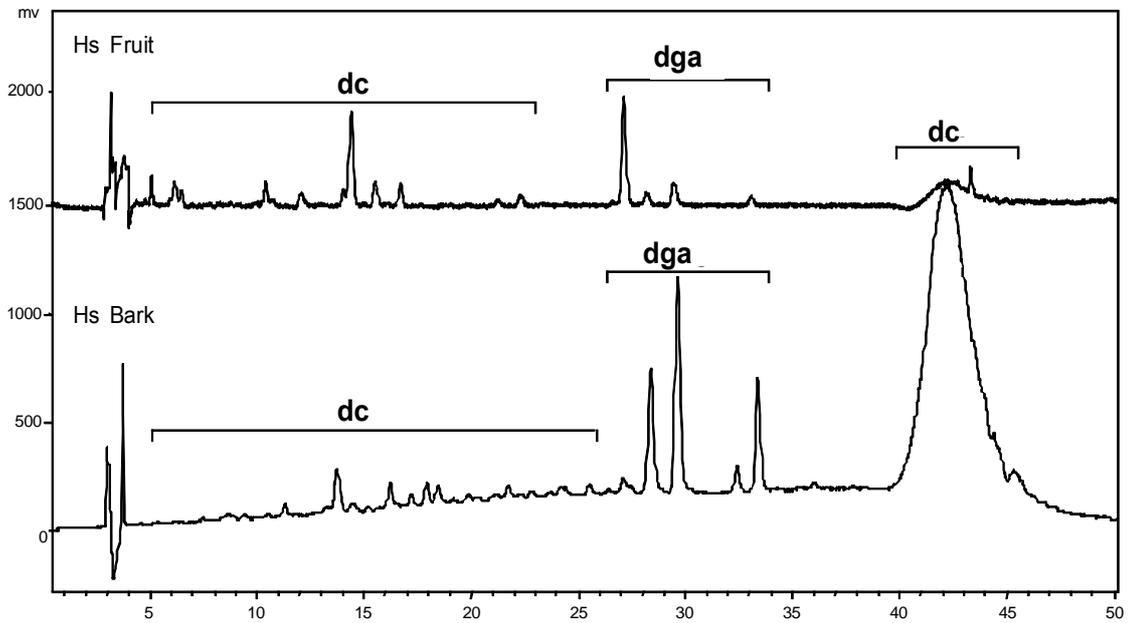
Treatments (p.o)	AST U/L	ALT U/L	γ- GT U/L	Creatinine mg/dL	Urea mg/dL	glucose mg/dL
Sham	199.00 ± 30.20	46.50 ± 6.40	0.70 ± 0.11	05.4 ± 0.04	30.00 ± 1.73	149.00 ± 4.78
Vehicle	157.14 ± 13.37	44.28 ± 2.52	0.95 ± 0.17	0.55 ± 0.01	38.14 ± 1.12	136.85 ± 7.05
lansoprazole	181.20 ± 17.50	48.00 ± 5.04	2.02 ± 0.55+	0.56 ± 0.02	39.40 ± 5.35	136.40 ± 5.80
MHs (barks)	159.12 ± 14.34	41.87 ± 2.69	1.30 ± 0.16	0.58 ± 0.03	47.12 ± 5.00	144.75 ± 11.17
Hs (fruit pulp)	166.00 ± 12.44	40.00 ± 3.24	1.17 ± 0.19	0.55 ± 0.04	32.50 ± 2.06	148.87 ± 7.24

Biochemical parameters from the different experimental groups (n=8) after 14 days of daily treatment. Results are mean ± S.E.M. AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), gamma-GT (gamma glutamyltransferase), creatinine, urea and glucose. +P<0.05 represents difference in relation to sham group (Kruskall -Wallis, Dunn).

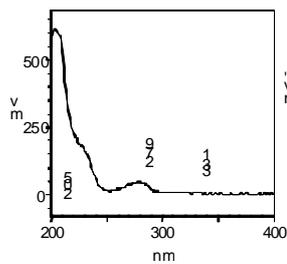
The HPLC-PAD fingerprints of *H.stigonocarpa* bark and fruit pulp are qualitatively similar, given their phenolic composition (Figure 6A), confirming the manifest polyphenolic nature of both extracts. Peaks eluted in the retention time (R_t) ranging from 0-26 min showed a weak band approximately 280 nm, a shoulder near 220 nm and a maximum absorption between 205-210 nm (Figure 6B) typical of catechin derivatives (Figure 6C) (Rohr *et al.*, 2000). In the R_t region of 26-34 min a second group of compounds was eluted that exhibited maximum absorption bands near 216 and 270 nm (Figure 6D) suggestive of gallic acid derivatives (dag) (Figure 6E) (Rohr *et al.*, 2000). Moreover, the poorly resolved peak eluted at R_t = 39-48 min with a UV pattern characteristic of catechins is closely related to polymeric catechins. The chromatographic profile obtained by HPLC-PAD analysis of *H. stigonocarpa* bark and fruit pulp led to the recognition of flavonoids and condensed tannins.

Figure 6

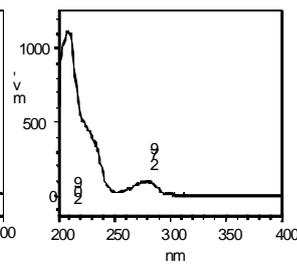
A



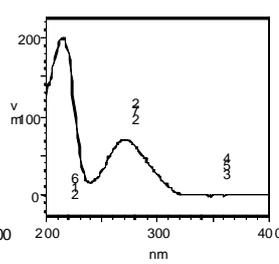
B



C



D



E

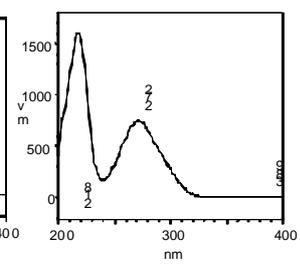


Figure 6: The HPLC-PAD fingerprints of *Hymenaea stigonocarpa* (*Hs*) barks and pulp fruits (A). UV spectrum pattern derivatives catechin (dc) (B), compounds identified as dc (C), UV spectrum pattern derivatives gallic acid (dga) (D) and compounds identified as dga. Phenomenex Synergi Hydro column (C_{18} , 250×4.6 mm d. i., $4 \mu\text{m}$). Eluent A: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\%$ TFA; eluent B: ACN + $0,1\%$ TFA. Ranging from 10-23% of B in 35 min, 23-90% of B in 50 min at a flow rate of $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 254 \text{ nm}$.

The qualitative phytochemical screening tests demonstrated that fruits and barks of *H. stigonocarpa* are composed primarily of phenolic compounds such as flavonoids and condensed tannins. The antioxidant activities of the flavonoids and tannins, phytochemical compounds present in MHs, are most likely responsible for these results. Previous studies have highlighted the role of flavonoids in a spectrum of biological activities including anti-ulcer and free radical scavenging (Wach *et al.*, 2007; Havsteen, 2002). The phytochemical composition of MHs (flavonoids) is most likely involved in this result because a study by Rao and Vijayakumar (2007) has already described (+)-catechin, the flavonoid present in MHs, to be an important gastroprotective compound against gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. According to Moreira *et al.* (2004), the antioxidant capacity of the flavonoids has therapeutic potential for treating gastric and duodenal diseases. Tannins are potent scavengers of peroxy radicals and can also interact with mucus proteins, improving their cytoprotective effect by forming a protein lining over the gastrointestinal mucosa (Okuda, 2005).

However, a central role for NO in the gastroprotective effect of MHs extract may also explain MHs' ability to protect against I/R. Systemic nitrite reduction is greatly enhanced during hypoxic/ischemic conditions (Lundberg and Weitzberg, 2010). Several studies in animal models of ischemia and reperfusion indicate that nitrite and nitrate can modulate hypoxic signalling. Administration of nitrite and nitrate protects against ischemia–reperfusion injury in gastric ulcers (Lundberg and Weitzberg, 2010). Hence, the antioxidant activity and the involvement of NO may be among the most important defensive factors involved in the anti-ulcerogenic effects of MHs.

Extracts prepared from bark of the *Hymenaea courbaril* (jatobá), a medicinal plant from the same genus, contain many bioactive compounds such as procyanidins (Sazaki *et al.*, 2009). Procyanidins (condensed tannins), a subclass of flavonoids, are widely distributed in a variety of plant species (Santos-Buelga and Scalbert, 2000). Procyanidins have been reported to exhibit a variety of biological activities, including strong antioxidative or free radical scavenging effects (Takahata *et al.*, 2001). Indeed, the fruit protective effect is most likely mediated by diverse nutrients, including antioxidant vitamins, minerals, phytochemicals, and fibre, among others (Marin *et al.*, 2009). Zayachkivska *et al.* (2005) demonstrated polyphenolic substances to have anti-

inflammatory activity in the gastrointestinal tract (GIT), promoting tissue repair through the expression of several growth factors, antioxidant activity and the scavenging of reactive oxygen species (ROS).

The gastroprotective and cicatrising effects of MHs and diet with fruit pulp on peptic ulcers observed in this study can be attributed to the presence of tannins and flavonoids in *H. stigonocarpa* given the antioxidant effects of this species. Thus to explore new compounds with antioxidant properties from medicinal plants is important, since most of the synthetic drugs available on the market to treat peptic ulcers produces many undesirable side effects, when used long term.

4. Conclusions

Based on these data, we conclude that the methanolic extract of *Hymenaea stigonocarpa* bark (MHs) has antidiarrheal, gastroprotective and cicatrising activities, and the diet with pulp fruits also demonstrate healing effects. The protective action of the extract against various ulcerogenic agents is related to the involvement of NO. The gastroprotective effect of the extract was accompanied by prevention of GSH depletion and inhibition of myeloperoxidase activity in gastric and duodenal mucosa. These observed effects can be attributed to the antioxidant-effect due to the presence of condensed tannins and flavonoids in the bark and fruit of *H. stigonocarpa*. The cicatrising action of MHs (7 and 14 days) and diet with fruit pulp (14 days) in gastric ulcers and diet with fruit pulp (7 days) in duodenal ulcers demonstrated the powerful healing effect of both the extract and the diet with fruit pulp. Our findings suggest that the fruit pulp of *H. stigonocarpa* may represent an important dietary source for the treatment of peptic ulcers.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) and FAPESP (Proc. 2009/5223-9 and Proc. 2010/17207-9).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

Abdallah, D.M., El- Abhar, H.S., Abdel- Aziz, D.H., 2009. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates gastric mucosal damage induced by ischemia-reperfusion: A key role for superoxide anion. *European Journal of Pharmacology* 603, 93-97.

Abdel-Kader, M., Berger, J.M., Slebodnick, C., Hoch, J., Malone, S., Wisse, J.H., Werkhoven, M.C.M., Mamber; S.D., Kingston, G.I., 2002. Isolation and absolute configuration of *ent*-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *Journal of Natural Products* 65, 11-15.

Ancha, H., Ojeas, H., Tedesco, D., Ward, A., Harty, R.F., 2003. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. *Regulatory Peptides* 110, 107–110.

Aguiar, J.C.D., Santiago, G.M.P., Lavor, P.L., Veras, H.N.H., Ferreira, Y.S., Lima, M.A.A., Arriaga, A.M.C., Lemos, T.L.G., Lima, J.Q., De Jesus, H.C.R., 2010. Constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Natural Product Communications* 5, 1977-1980.

Anderson, M., 1985. Determination of glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymology* 113, 548-555.

Awouters, F., 1978. Delay of castor oil diarrheain rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin synthesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 30, 41–45.

Bandyopadhyay, D., Biswas, K., Bhattacharyya, M., Reiter, R.J., Banerjee, R.K., 2002. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. *Indian Journal of Experimental Biology* 40, 693-705.

Brandão, M.,1993.Plantas medicamentosas de uso popular dos cerrados mineiros. *Daphne, Belo Horizonte* 3, 11-20.

Come, S.J., Morrisey, S.M. and Woods, R.J., 1974. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *Journal of Physiology* 242, 116 — 117.

Cunningham, A., Martin, S.S., Langenheim, J.H., 1973. Resin acids from two amazonian species of *Hymenaea oblongifolia*. *Phytochemistry* 12, 633-635.

Cunningham, A., Martin, S.S., Langenheim, J.H., 1974. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of amazonian *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry* 13, 294-295.

El-Abhar, H.S., Abdallah, D.M., Saleh, S., 2003. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 251-258.

Glavin, G.B., Szabo S., 1992. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEBJ* 6, 825-831.

Guidobono, F., Pagani, F., Ticozzi, C., Sibilia, V., Pecile, A., Netti, C., 1997. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *British Journal of Pharmacology* 120, 581 – 586.

Gomes, R.C., Bonamin, F., Darin, D.D., Seito, L.N., Di Stasi, L.C., Dokkedal, A.L., Vilegas, W., Brito, A.R.M.S., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 466–471.

Grandi, J.M., Trindade, J.A., Pinto, M.J.F., Ferreira, L.L., Catella, A.C., 1989. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica brasílica*, v.3 (2), 185-224.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67–202.

Holzer, P. 1998. Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology* 114, 823–839.

Klein Jr, L.C., Gandolfi, R.B., Santin, J.R., Lemos, M., Filho, V. C., Faloni de Andrade, S., 2010. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 381, 121–126.

Khomenko, T., Szabo, S., Deng, X., Ishikawa, H., Anderson, G.J., McLaren, G.D., 2009. Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 296, 1277–1286.

Khoo, S. F., Oehlschlager, A. C., Ourisson, G., 1973. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae) seed pod resin. *Tetrahedron* 29, 3379–3388.

Kobata, A., Kotani, T., Komatsu, Y., Amagase, K., Kato, S., Takeuchi, K., 2007. Dual action of nitric oxide in the pathogenesis of ischemia/reperfusion- induced mucosal injury in mouse stomach, *Digestion* 75, 188-197.

Konturek, S.J., Dembinski, A., Warzecha, Z., Brzozowski, T., Gregory, H., 1988. Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats, *Gastroenterology* 94, 1300-1307.

Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.

Laine, L., Takeuchi, K., Tarnawski, A., 2008. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 135, 41-60.

Langenheim, J. H., Hall, G. D., 1983. Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 11, 29-36.

Lee, H.T., Lee, Y.J., Chung, S.J., Shim, C.K., 2000. Effect of prokinetic agents, cisapride and metoclopramide, on the bioavailability in humans and intestinal permeability in rats of ranitidine, and intestinal charcoal transit in rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 108, 311–323.

Lima, N. N., Rechia C. G. V., Ganter, J. L. M. S., Reicher, F., Sierakowski M. R., 1995. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *International Journal of Biological Macromolecules* 17, 413-415

Lundberg, J.O., Weitzberg, E., 2010. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396, 39–45.

Marin, A. M. F., Siqueira, E. M. A., Arruda, S.F., 2009. Minerals, phytic acid and tannin contents of 18 fruits from the Brazilian savanna. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60, 180-190.

Marsaioli, A.J., Leitão Filho, H.F., Campello. J.P.,1975. Diterpenes in the bark of *Hymenaea coubaril*. *Phytochemistry* 14, 1882-1883.

Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M., 1999. Gastroprotection of Escins IA, IB, IIA, and IIB on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats, *European Journal of Pharmacology* 373, 63 – 70.

Matuda, T. G., Netto, F. M., 2005. Caracterização química parcial da semente de Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25, 353-357.

Moreira, A.J., Fraga, C., Alonso, M., Collado, P.S., Zetller, C., Marroni, C., Marroni, N., González-Gallego, J., 2004. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical Pharmacology* 68, 1939–1946.

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

Mukherjee, P.K., Saha, K., Murugesan, T., Mandal, S.C., Pal, M., Saha, B.P., 1998. Screening of antidiarrhoeal profiles of some plant extracts of specific region of West Bengal, India. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 85–89.

Nogueira, R.T., Shepherd, G.J., Laverde Jr, A., Marsaioli, A.J., Imamura, P.M., 2001. Clrodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry* 58, 1153-1157.

Okabe, S., Roth, J.L., Pfeiffer, C.J., 1971. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing, *The American Journal of Digestive Diseases* 16, 277-284.

Okabe, S., Amagase, K., 2005. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 1321-1341.

Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66, 2012–2031.

Olfert, E.D., Cross, B.M., McWilliam, A.A., 1993. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Ottawa, Ontario. Canadian Council on Animal Care, 1-213.

Piper, H.M., Meuter, K., Schafer, C., 2003. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Annals of Thoracic Surgery* 75, S644–S648.

Rafatullah, S., Tariq, M., Al-Yahya, M.A., Mossa, J.S., Ageel, A.M., 1990. Evaluation of tumeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal Ethnopharmacology* 29, 25-34.

Rao, Ch. V., Vijayakumar, M., 2007. Protective effect of (+)-catechin against gastric mucosal injury induced by ischaemia–reperfusion in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59, 1103–1107.

Rastogi, L., Patnaik, G.K., Dikshit, M., 1998. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacological Research* 38, 125–132.

Rohr, G.E., Meier, B., Sticher, O., 2000. Evaluation of different detection modes for the Analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode Array and Electrochemical Detection. *Phytochemical Analysis* 11, 106–112.

Santos-Buelga, C., Scalbert, A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds–nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1094-1117.

Sasaki, K., Matsukura, Y., Shijima, K., Miyake, M., Fujiwara, D., Konishi, Y., 2009. High-performance liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, trimers up to nonamers, derived from the bark of jatobá (*Hymenaea courbaril*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73, 1274-1279.

Seiler, M., Szabo, S., Ourteff, S., McComb, D. J., Kovacs, K., Reichlin, S., 1983. The effect of the duodenal ulcerogen cysteamine on somatostatin and gastrin cells in the rat. *Experimental and Molecular Pathology* 39, 207-218.

Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siplet, H., 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5, 43–61.

Sies H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 916–921.

Silva, M.R., Silva, M.S., Martins, K.A., Borges, S., 2001. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21, 176-182.

Souza Brito, A.R., 1994. Manual de ensaios toxicológicos “in vivo”. Ciências médicas. Campinas: Unicamp, 15-22.

Stickney, J.C., Northup, D.W., 1959. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 101, 582–583.

Stocks, J., Gutterid, J. M., Sharp, R. J., Dormandy, T. L., 1974. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids, *Clinical Science & Molecular Medicine*, 47, 215-222.

Szabo, S., 1978. Duodenal ulcer disease. Animal model: cysteamine-induced acute and chronic duodenal ulcer in the rat. *The Journal of Pathology* 93, 273-276.

Szabo, S., Vattay, P., 1990. Experimental gastric and duodenal ulcers. Advances in pathogenesis. *Gastroenterology Clinical North America* 19, 67–85.

Takahata, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M., Suda, I., 2001. Highly polymerized Procyanidins in brown soybean seed coat with a High Radical-Scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5843-5847.

Townsend, D. M., Tew, K.D., Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 145–155.

Tulassay, Z., Herszényi, L., 2010. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24, 99–108.

Ueda, S., Yoshikawa, T., Takahashi, S., Ichikawa, H., Yasuda, M., Oyamada, H., Tanigawa, T., Sugino, S., Kondo, M., 1989. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 162, 55–58.

Veljaca, M., Lesch, C.A., Pillana, R., Sanchez, B., Chan, K., Guglietta, A., 1995 .BPC-15 reduces Trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats, *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 272, 417-422.

Wach, A., Pyrzynska, K., Biesaga, M., 2007. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry* 100, 699–704.

Wagner, H., 2006. Multitarget therapy – The future of treatment for more than just functional dyspepsia, *Phytomedicine* 13. SV 122–129.

Witaicenis, A., Seito, L. N., Di Stasi, L. C., 2010. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chemico-Biological interactions*, 186, 211-218.

Zapata-Colindres, J.C., Zepeda-Gómez, S., Montaña-Loza, A., Vázquez-Ballesteros, E., Villalobos, J.J., Valdovinos-Andraca, F., 2006. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 20, 277-80.

Zayachkivska, O.S., Konturek, S.J., Drozdowicz, D., Konturek, P.C., Brzozowski, T., Ghegotsky, M.R., 2005. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56, 219–231.

VII. Considerações finais

Atividade antiinflamatória intestinal aguda

<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Modelo	Rota e período do tratamento	Parâmetros macroscópicos	Parâmetros Bioquímicos
EMHs: 100, 200 e 400 mg/Kg	TNBS agudo 10 mg/animal	Oral 5 dias antes da indução da colite e 2 dias depois	Não apresentou atividade: Consumo alimentar; Peso corporal; Escore macroscópico; Extensão de lesão; Relação peso/comp do cólon; Diarréia e aderência;	Não apresentou atividade: MPO, FA e MDA Apresentou atividade: Manteve os níveis de GSH (EMHs 200mg/Kg)
DFHs: 5 e 10%	TNBS agudo 10 mg/animal	Dieta oral por 21 dias antes da indução e 2 dias depois	Não apresentou atividade: Consumo alimentar; Peso corporal; Relação peso/comp do cólon; Diarréia e aderência; Escore macroscópico (DFHs 5%) Extensão de lesão (DFHs 5%) Apresentou atividade: ↓escore Macroscópico (DFHs 10%) ↓extensão de Lesão (DFHs 10%)	DFHs 5 e 10% Não apresentou atividade: FA DFHs 5% Não apresentou atividade: GSH, MPO, MDA DFHs 5% Apresentou atividade: ↓ MPO DFHs 10% Apresentou atividade: Manteve os níveis de GSH ↓MPO ↓MDA

Toxicidade do EMHs, motilidade intestinal, ação antidiarréica e atividade antiulcerogênica gástrica e duodenal.

<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Modelo, rota e período do tratamento	Parâmetros estudados	Mecanismo de ação
EMHs 5000 mg/Kg	Toxicidade aguda e screening hipocrático via oral (v.o.)	não apresentou efeitos tóxicos	
EMHs 100, 150 e 200 mg/Kg	Motilidade intestinal v.o. 30 minutos antes do carvão ativado.	não ocorreu modificações no trânsito intestinal dos animais	
EMHs 100, 150 e 200 mg/Kg	Atividade antidiarréica v.o. 30 minutos antes do agente indutor.	As 3 doses testadas apresentaram ação antidiarréica.	
EMHs 50, 100, 150 e 200 mg/Kg	Úlcera gástrica induzida por etanol absoluto v.o. 60 minutos antes do agente indutor	EMHs 150 e 200 mg/Kg: ↓ área de lesão ↓ MPO EMHs 200 mg/Kg: Manteve os níveis de GSH	ação gastroprotetora
EMHs 50, 100, 150 e 200 mg/Kg	Úlcera gástrica induzida por DAINE v.o. 30 minutos antes do agente indutor	EMHs 200 mg/Kg: ↓ área de lesão ↓ MPO Manteve os níveis de GSH	ação gastroprotetora
EMHs 200 mg/Kg	Ligadura de piloro v.o. e via intraduodenal (v.i.) após a amarradura, por v.i. ou 30 minutos antes nos tratamentos por v.o.		Não apresentou ação antissecretória
EMHs 200 mg/Kg	Muco aderido v.o. 1 hora antes da amarradura do piloro	Não aumentou a produção de muco	

<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Modelo, rota e período do tratamento	Parâmetros estudados	Mecanismo de ação
EMHs 200 mg/Kg	Óxido nítrico (NO) v.o. Após 30 min da injeção intraperitoneal de L-NAME		Envolvimento do NO Ação gastroprotetora
EMHs 200 mg/Kg	Grupamentos sulfidrílicos v.o. Após 30 min da injeção intraperitoneal de NEM		Não apresentou envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos
EMHs 200 mg/Kg	Isquemia e reperfusão v.o.	↓ área de lesão Manteve os níveis de GSH Não apresentou atividade na MPO	
EMHs 200 mg/Kg	Cisteamina duodenal v.o. 30 minutos antes da primeira dose de cisteamina	↓ área de lesão Manteve os níveis de GSH Não apresentou atividade na MPO	
EMHs 200 mg/Kg DFHs 10%	Ácido acético 80% gástrico e duodenal Via oral por gavagem (EMHs) e a DFHs foi oferecido como alimento 7 e 14 dias consecutivos após indução da úlcera	Cicatrização gástrica 7 dias EMHs: ↓ área de lesão DFHs: manteve os níveis de GSH Cicatrização gástrica 14 dias EMHs e DFHs: ↓ área de lesão Cicatrização duodenal 7 dias DFHs: ↓ área de lesão EMHs: manteve os níveis de GSH Cicatrização duodenal 14 dias EMHs e DFHs: manteve os níveis de GSH	Ação cicatrizante

VIII. Conclusões

A dieta com a polpa do fruto de *Hymenaea stigonocarpa* (DFHs) a 10% apresentou atividade antiinflamatória no modelo de colite induzido por TNBS. Estes efeitos protetores foram associados com a diminuição do estresse oxidativo intestinal, demonstrada pela manutenção dos níveis de GSH e redução da atividade da MPO. Apesar da ausência de efeito preventivo no modelo de colite aguda em ratos tratados com o extrato metanólico da casca de *Hymenaea stigonocarpa* (EMHs) houve a manutenção dos níveis de glutathiona.

O EMHs na dose de 200 mg/Kg apresentou ações antidiarréica, gastroprotetora e cicatrizante. A ação gastroprotetora do EMHs foi acompanhada pela manutenção nos níveis de glutathiona e redução na atividade da mieloperoxidase. A ação protetora do EMHs na mucosa gástrica e duodenal, aos agentes ulcerogênicos pode estar relacionado com o envolvimento do óxido nítrico. A ação cicatrizante na mucosa gástrica e duodenal do EMHs e da DFHs foi observado aos 7 e 14 dias de tratamento, através da proteção das lesões e da manutenção nos níveis de GSH.

Sendo assim, os efeitos preventivos observados na colite experimental e os efeitos protetores na atividade antiulcerogênica do EMHs e da DFHs podem estar associados a ação antioxidante da planta, pois esta espécie apresenta taninos e flavonóides na casca do caule e no fruto. Em adição o efeito protetor da DFHs pode também estar relacionada a presença de fibras da dieta.

IX. Perspectivas

- ❖ Estudar outros mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica e antiinflamatória intestinal do EMHs e da DFHs.
- ❖ Estudar outros mediadores inflamatórios envolvidos em ambas as doenças do EMHs e da DFHs.
- ❖ Avaliar a atividade de *Hymenaea stigonocarpa* na expressão dos genes no processo inflamatório intestinal induzido por TNBS e nos modelos ulcerogênicos em ratos.
- ❖ Avaliar a atividade do EMHs na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos.
- ❖ Analisar os ácidos graxos de cadeia curta da DFHs no processo inflamatório intestinal induzido por TNBS em ratos.

X. Referências*

- Abdel-Kader M, Berger JM, Slebodnick C, Hoch J, Malone S, Wisse JH, Werkhoven, MCM, Mamber SD, Kingston GI. Isolation and absolute configuration of *ent*-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *J Nat Prod*. 2002; 65: 11-15.
- Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*. 2009; 361: 2066-78.
- Abraham C, Medzhitov R. Interactions Between the Host Innate Immune System and Microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol*. 2011; 140:1729-37.
- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acid to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinog*. 1999; 20:629-34.
- Agnihotri N, Kaur H, Kaur N, Sarotra P. Role of oxidative stress in lansoprazole-mediated gastric and hepatic protection in Wistar rats. *Indian J Gastroenterol*. 2007; 26: 118-121.
- Aguiar JCD, Santiago GMP, Lavor PL, Veras HNH, Ferreira YS, Lima MAA, Arriaga AMC, Lemos TLG, Lima JQ, De Jesus HCR. Constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. *Nat Prod Commun*. 2010; 5: 1977-80.
- Alimi H, Hfaiedh N, Bouoni Z, Sakly M, Rhouma KB. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica f. inermis* flowers extract in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011; 3 2: 406-16.
- Almeida SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 188 p.
- Almeida SP. Cerrado: aproveitamento alimentar. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998.
- Almeida RN, Navarro DS, Barbosa-Filho J.M. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*. 2001; 8: 310-22

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Alonso V, Linares V, Bellés M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL, Sánchez DJ. Sulfasalazine induced oxidative stress: A possible mechanism of male infertility. *Reprod Toxicol*. 2009; 27: 35–40.

Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, Israel D, Mack D, Ghadirian P, Deslandres C, Chotard V, Budai B, Law L, Levy E, Seidman EG. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 2007; 102: 2016–25.

Andersen O, Andersen VU. *As frutas silvestres brasileiras*. São Paulo: GLOBO, 1988.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*. 1985; 113: 548-55.

Andoh A, Bamba T, Sasaki M. Physiological and Anti-Inflammatory Roles of Dietary Fiber and Butyrate in Intestinal Functions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999; 23: S70-73.

Andus T, Targan SR. "Glucocorticoids" In: Targan SR, Shanahan F. *Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside*. Williams & Wilkins, Baltimore; 1994. P. 487-502.

Araki Y, kanauchi O, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T. Germinated barley foodstuff suppresses dextran sulfate experimental colitis in rats: The role of mast cells. *Int J Mol Med*. 2007; 19: 257-62.

Asp NG, Schweizer TF, Southgate DAT, Theander O. Dietary fibre analysis. In: Schweizer TF, Edwards CA. *Dietary fibre: a component of food nutritional function in health and disease*. London: Springer Verlag; 1992. p. 57-99.

Atreya R, Neurath MF. New therapeutic strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*. 2008; 1: 175–82.

Audi EA, Toledo DP, Peres PG, Kimura E, Pereira WKV, Mello JCP de, Nakamura CV, Alves- do-Prado W, Cuman RKN, Bersani-Amado CA. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother Res*. 1999; 13: 264-66.

Awouters F. Delay of castor oil diarrheain rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin synthesis. *J Pharm Pharmacol*. 1978; 30: 41–5.

Baker ME. Licorice and enzymes other than 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: an evolutionary perspective. *Steroids*. 1994; 59: 136-41.

Barreiros ABS, David JM. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nov*. 2006; 1: 113-23.

Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*. 2006; 13: 584-90.

Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol*. 1995; 268: G622–30.

Bessey OA, Lowry OH, Brook MJ. Rapid colorimetric method for the determination of alkaline phosphatase in five cubic milliliters of serum. *J Biol Chem*. 1946; 164:321-29.

Bhattacharjee M, Bhattacharjee S, Gupta A, Banerjee RK. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. Pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32: 731–43.

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 118, 1199-1200.

Blumberg R, Cho J, Lewis J, Wu G. Inflammatory Bowel Disease: An Update on the Fundamental Biology and Clinical Management. *Gastroenterol*. 2011; 140:1701–3.

Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolín M, Lara F, Espín E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR. Increased mucosal tumour necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*. 2002; 51: 659-64.

Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics: Targets & Ther*. 2009; 3: 77–97.

Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 521-33.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995; 28: 25-30.

Breen DP, Marinaki AM, Arenas M, Hayes PC. Pharmacogenetic association with adverse drug reactions to azathioprine immunosuppressive therapy following liver transplantation. *Liver Transpl*. 2005; 11: 826–33.

Breuer RI, Buto SK, Christ ML, Bean J, Vernia P, Paoluzi P, Di Paolo MC, Caprilli R. Rectal irrigation with short chain fatty acids for distal ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 1991; 36: 185–7.

Brownawell AM, Caers W, Gibson GR, Kendall CWC, Lewis KD, Ringel Y, Slavin JL. Prebiotics and the Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research, and Goals. *J Nutr*. 2012:1-13.

Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJR. Nitric oxide generators and cAMP stimulate muçus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol*. 1993; 265: G 418-22.

Cadirci E, Suleyman H, Aksoy H, Halici Z, Ozgen U, Koc A, Ozturk N. Effects of *Onosma armeniacum* root extract on ethanol-induced oxidative stress in stomach tissue of rats. *Chem. Biol. Interact*. 2007; 170: 40–48.

Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG, Muscerino DR, Habr-Gama A, Kiss DR. Inflammatory bowel diseases, principles of nutritional therapy. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med*. 2002; 57:187-98.

Campregher C, Gasche C. Aminosalicylates. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25: 535–46.

Camuesco D, Peran L, Camalada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodriguez-Cabezas H, Concha A, Zarzuelo A, Gálvez J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11: 265–71.

Carvalho PE. Jatobá-do-Cerrado - *Hymenaea stigonocarpa*. Colombo: Embrapa Floresta, 2007. 8p. (Embrapa Floresta. Circular Técnica, n. 133).

Cavalcanti MLF. Fibras alimentares. *Rev Nutr PUCCAMP*. 1989; 2: 88-97.

Chambrun GPP, Sandborn WJ. Advances in IBD management-towards a tailored approach. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2012; 9: 70–2.

Chang YK, Silva MR, Gutkoski LC, Sebio L, Da Silva MAAP. Development of extruded snacks using jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart) flour and cassava starch blends. *J Sci Food Agric*. 1998; 78: 59–66.

Chávez-Piña AE, Alvarez GRT, Ramírez AR, Navarrete A. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/cGMP/KATP pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. *Fund Clin Pharmacol*. 2011; 25:717–22.

Chichlowski M, Hale LP. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease—an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 295: G1139–49.

Cho CH. Current roles of nitric oxide on gastrointestinal disorders. *Journal of Physiology-Paris*. 2001; 95: 253-56.

Cho JH, Brant SR. Recent Insights Into the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol*. 2011; 140:1704–12.

Come SJ, Morrissey SM, Woods RJ. A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol*. , 1974; 242: 116 — 17.

- Constanzo LS. Fisiologia. 3ed. São Paulo: Elsevier; 2007.
- Cook NC, Samman C. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.* 1995; 7: 66-76.
- Coppini LZ, Waitzberg DL, Campos FG, Harb-Gama A. Fibras Alimentares e Ácidos Graxos de Cadeia Curta. In: Waitzberg DL. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 79 – 94.
- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterol.* 2011; 140: 1785–94.
- Cosnes J. What Is the Link Between the Use of Tobacco and IBD? *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14: S14-15.
- Crespo ME, Gálvez J, Cruz T, Ocete MA, Zarzuelo A. Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS. *Planta Med.* 1999; 65: 651–53.
- Cruz T, Gálvez J, Crespo E, Ocete MA, Zarzuelo A. Effects of silymarin on the acute stage of the Trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med.* 2001; 67: 94-96.
- Cryer B, Lee E, Feldman M. Factors influencing mucosal prostaglandin concentration: Role of smoking and aging. *Ann Int Med.* 1992; 116: 636-40.
- Cunningham A, Martin SS, Langenheim JH. Resin acids from two amazonian species of *Hymenaea oblongifolia*. *Phytochemistry.* 1973; 12: 633-35.
- Cunningham A, Martin SS, Langenheim JH. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of amazonian *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry.* 1974; 13: 294-95.
- Cuzzocrea S, Mc Donald MC, Masón E, Dugo I, Lepore V, Font MT, Ciccolo A, Terranova ML, Caputi AP, Thiemermann C. Tempol. A membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 406: 27-37.
- Dagli U, Balk M, Yucel D, Ulker A, Over H, Saydam G, Sahin B. The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel disease.* 1997; 3: 260-64.
- Damaskos D, Kolios G. Probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: microflora on the scope. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65: 453-67.
- Danese S, Sans M, Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 2004; 3: 394- 400.
- De Boer NK, Mulder CJ, Van Bodegraven AA. Myelotoxicity and hepatotoxicity during azathioprine therapy. *Neth J Med.* 2005; 63: 444–46.

Del Soldato P, Foschi D, Beboni G, Scarpignato C. Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. *Agents Act.* 1986; 17: 484–88.

Dembieska-Kiec A, Pallapies D, Simmet T, Peskar BM, Peskar BA. Effect of carbenoxolone on the biological activity of nitric oxide: relation to gastroprotection. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 104: 811–16.

Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflux relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature.* 1992; 351:477-79.

Di Stasi LC, Camuesco D, Nieto A, Vilegas W, Zarzuelo A, Gálvez J. Intestinal anti-inflammatory activity of Paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Med.* 2004; 70: 315–20.

Doll R, Hill ID, Underwood D.J. Triterpenoid liquorice compound in gastric and duodenal ulcer. *Lancet.* 1962; 2: 1166–67.

Doll R, Hill ID, Hutton CF. Treatment of gastric ulcer with carbenoxolone sodium and oestrogens. *Gut.* 1965; 6: 19–24.

Dryden GWJr, Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ. Clinical Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005; 7: 308–316.

Dunckley P, Travis S. Is IBD Associated with a Stressful Lifestyle? *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14: S33-4.

Dunjic BS, Stevesnsson I, Axelson J, Adlercreutz P, Arrajab A, Larsson K, Begmark S. Green Banana protection of gastric against experimentally induced injuries in rats, A Multicomponent Mechanism? *Scand Gastroenterol.* 1993; 28: 894-98.

Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat.Prod.Rep.* 2006; 23: 394-411.

Edelblum KL, Turner JR. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9: 715–20.

Elliott DE, Urban Jr JF, Argo CK, Weinstock JV. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *Faseb J.* 2000; 4: 430–35.

Faria JP, Sano SM, Agostini-Costa TS. Jatobá do Cerrado. In: Vieira RF, Costa TSA, Silva DB, Ferreira FR, Sano SM. *Frutas nativas da Região Centro-Oeste do Brasil.* Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1ª edição. Brasília-DF; 2006.p. 174-86.

Farina C, Pinza M, Pifferi G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Farmacol.*1998; 53: 22-32.

Farrell RJ, La Mont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002; 31: 41–62.

Florin TH, Roberts RK, Watson MR, Radford-Smith GL. Treatment of steroid refractory inflammatory bowel disease (IBD) with mycophenolate mofetil (MMF). *Aust. N. Z. J. Med.* 1998; 28: 344–45.

Fendrick AM, Forsch RT, Harrison RV, Scheiman JM. Peptic Ulcer Disease. *UMHS Peptic Ulcer Guideline.* 2005: 1-7.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food-Chem. Toxic.* 1995; 33: 1061-80.

Fromm D. Mechanisms involved in gastric mucosal resistance to injury. *Ann rev med.* 1987; 38: 119-28.

Fukushima K, Sasaki I, Hasegawa H, Takahashi K, Naito H, Funayama Y, Matsuno S. Sodium butyrate-induced liver-type alkaline phosphatase activity in a small intestinal epithelial cell line, IEC6. *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 1116–23.

Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242–49.

Gálvez J, Cruz T, Crespo E, Ocete MA, Lorente MD, Sanchez de Medina F, Zarzuelo A. Rutoside as mucosal protective in acetic acid-induced rat colitis. *Planta Medic.* 1997; 63: 409-14.

Gálvez J, Sánchez de Medina F, Jimenez J, Zarzuelo A. Studies in natural products chemistry. In: Atta-ur-Rahman. *Bioactive natural products (Part f). Effects of flavonoids on gastrointestinal disorders.* Amsterdam: Elsevier; 2001. p. 607-49.

Gálvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Review. Mol Nutr Food Res.* 2005; 49: 601-08.

Gitnick G. Inflammatory bowel disease: a new assessment. *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31: 83-6.

Gisbert JP, Calvet X. Review article: the effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 1255–68.

Glavin GB, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEBJ*. 1992; 6: 825-831.

Goldberg RF, Austen WGJr, Zhang X, Munene G, Mostafa G, Biswas S, McCormack M, Eberlin KR, Nguyen JT, Tatlidede HS, Warren HS, Narisawa S, Millá JL, Hodin RA. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *PNAS*. 2008; 105: 3551–56.

González R, Sánchez De Medina F, Gálvez J, Rodríguez-Cabezas ME, Duarte J, Zarzuelo A. Dietary vitamin E supplementation protects the rat large intestine from experimental inflammation. *Int J Vit Nut Res*. 2001; 71: 243-50.

Graham DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. *Gastroenterol*. 1998; 115:1272–77.

Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008; 5: 321–31.

Grandi JM, Trindade JA, Pinto MJF, Ferreira LL, Catella AC. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. *Acta bot bras*. 1989; 3: 185-224.

Guidobono F, Pagani F, Ticozzi C, Sibilia V, Pecile A, Netti C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol*. , 1997; 120: 581 – 586.

Guslandi M. Rifaximin in the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2011; 14: 4643-46.

Guyton AC, Hall JE. *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan S.A; 1998.

Hamaishi K, Kojima R, Ito M. Anti-ulcer Effect of Tea Catechin in Rats. *Biol. Pharm. Bull*. 2006; 29: 2206—13.

Hamer HM, Jonkers DMAE, Bast A, Vanhoutvin SALW, Fischer MAJG, Kodde A, Troost FJ, Venema K, Brummer RJM. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nut*. 2009; 28: 88–93.

Hanauer SB, Stathopoulos G. Risk-benefit assessment of drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Saf* 1991; 6: 192–219.

Harbone JB. Role of secondary metabolites and chemical defenses mechanisms in plants. *Ciba Found Symp*. 1990; 154: 126-34.

Hernandez-Munoz R, Montiel-Ruiz C, Vazquez-Martinez O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Lab. Invest.* 2000; 80: 1161–69.

Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastresofágico. In: Hardman J G, Limbird LE. Goodman & Gilman`s. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003. p. 757-68.

Hond ED, Hiele M, Evenepoel P, Peeters M, Ghoo Y, Rutgeerts P: *In vivo* butyrate metabolism and colonic permeability in extensive colitis. *Gastroenterol.* 1998; 115: 584-90.

Huang JQ, Hunt RH. Pharmacological and pharmacodynamic essentials of H₂-receptor antagonists and proton pump inhibitors for the practising physician. *Best Prac Res Clin Gastroenterol.* 2001; 15: 355-70.

Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: National Academies Press. 2002.

Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puho E, Nielsen G L, Sørensen HT. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 18: 601–06.

Jafri S, Pasricha PJ. Agentes utilizados para diarreia, prisão de ventre e doença inflamatória intestinal; Agentes utilizados para doença biliar e hepática. In: Goodman Gilman A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2003. p. 781-95.

Jorde R, Burhol PG. Asymptomatic peptic ulcer disease. *Scand J Gastroenterol.* 1987; 22: 129-34.

Juhás S, Cikos S, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Hájek T, Domaracká K, Domaracký M, Bujnáková D, Reháč P, Koppel J. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia Biol (Praha).* 2008; 54 :1-7.

Júnior AAJ, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vanucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Med Ribeirão Preto.* 1998; 31: 434-49.

Júnior LR, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nov.* 2001; 24: 112-19.

Kanauchi O, Nakamura T, Agata K, Mitsuyama K, Iwanaga T. Effects of Germinated barley foodstuff on dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J Gastroenterol.* 1998; 33: 179-88.

Kanauchi O, Iwanaga T, Andoh A, Araki Y, Nakamura T, Mitsuyama K, Suzuki A, Hibi T, Bamba T: Dietary fiber fraction of germinated barley foodstuff attenuated mucosal damage and diarrhea, and accelerated the repair of the colonic mucosa in an experimental colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001, 16: 160-68.

Kanauchi O, Serizawa I, Araki Y, Suzuki A, Andoh A, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Takaki K, Toyonaga A, Sata M, Bamba T. Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment. *J Gastroenterol* 2003; 38: 134–1.

Kang JM, Seo PJ, Kim N, Lee BH, Kwon J, Lee DH, Jung HC. Analysis of direct medical care costs of peptic ulcer disease in a Korean tertiary medical Center. *Scand J Gastroenterol*. 2012; 47: 36–42.

Karp SM, Koch TR. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis. Mon*. 2006; 52: 199-207.

Kettle AJ, Winterbourn CC. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol*. 1991; 41:1485-92.

Khoo SF, Oehlschlager AC, Ourisson G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae) seed pod resin. *Tetrahedron*. 1973; 29: 3379-88.

Klein Jr LC, Gandolfi RB, Santin JR, Lemos M, Filho VC, Faloni de Andrade S. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*. 2010; 381: 121–26.

Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Oligofructose and long chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr*. 2001; 86:291–300.

Koleva PT, Valcheva RS, Sun X, Ganzle MG, Dieleman LA. Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. *Br J Nutr*. 2012; 1-11.

Konturek SJ, Cieszowski M, Kwiechien W, Konturek J, Tasler J, Bilski J. Effects of omeprazole, or substituted benzimidazole, on gastric acid secretion, serum gastrin, and gastric mucosal blood flow in dogs. *Gastroenterol*. 1984; 86: 71–77.

Konturek SJ, Dembinski A, Warzecha Z, Brzozowski T, Gregory H. Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. *Gastroenterol*. 1988; 94: 1300-07.

Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E, Kouroumalis EA. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2004; 49: 1433–37.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in the rat and hamster model. *Gastroenterol.* 1984; 87: 1344-50.

Kromer W, Postius S, Riedel R, Simon WA, Hanauer G, Brand U, Gonne S, Parsons E. BY 1023/SK& F 96022 INN pantoprazole, a novel gastric proton pump inhibitor, potently inhibits acid secretion but lacks relevant cytochrome P450 interactions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990; 254: 129–35.

Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 1997–2015.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CBHW, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol.* 2003; 201:28–36.

Kushima H, Nishijima CM, Rodrigues CM, Rinaldo D, Sassá MF, Bauab TM, Di Stasi LC, Carlos IZ, Brito ARMS, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: Gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123:430–38.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterol.* 2008; 135: 135-41.

Langenheim JH, Hall GD. Sesquiterpene deterrence of a leaf-tying lepidopteran, *Stenoma ferrocaneella*, on *Hymenaea stigonocarpa* in Central Brazil. *Biochem Syst Ecol.* 1983; 11: 29-36.

Larsson H, Carlsson E, Junggen U, Olbe L, Sjöstrand SE, Skånberg I, Sundell G. Inhibitions of gastric acid secretion by omeprazole in the dog and rat. *Gastroenterol.* 1983; 85: 900–07.

Lee YT, Langenheim JH. A systematic revision of the genus *Hymenaea* (Leguminosae; Caesalpinioideae; Detarieae). University of California Publications in Botany, 1975; 69: 1-109.

Lee SK, Il Kim T, Kim YK, Choi CH, Yang KM, Chae B, Kim WH. Cellular differentiation-induced attenuation of LPS response in HT-29 cells is related to the down-regulation of TLR4 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 337: 457–63.

Levine DS. Clinical features and complications of Crohn's disease. In: Targan SR, Shanahan F. Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside. Williams & Wilkins, Baltimore; 1994. p. 296-316.

Lewis DA, Hanson D. Anti-ulcer drugs of plant origin. In: Ellis GP, West GB. Progress in medicinal chemistry. Oxford, UK: Elsevier Science Publishers; 1991. p. 201–31.

Lima NN, Rechia CGV, Ganter J L M S, Reicher F, Sierakowski MR. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. Int J Biol Macromol. 1995; 17: 413-15.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Braz J Pharm Sci. 2001; 37: 203-303.

Linares V, Alonso V, Albina ML, Bellés M, Sánchez DJ. Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. Toxicol. 2009; 256:152–56.

Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, Del Vecchio Blanco C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. Dig Liver Dis. 2003; 35: 635–41.

Luchini AC, Rodrigues-Orsi P, Cestari S, Seito LN, Witaicenis A, Pellizzon CH, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Biol Pharm Bull. 2008; 31: 1343–50.

Lu CL, Chang SS, Wang SS, Chang FY, Lee SD. Silent peptic ulcer disease: frequency, factors leading to "silence," and implications regarding the pathogenesis of visceral symptoms. Gastrointest Endosc. 2004; 60: 34-38.

Maccaferri S, Vitali B, Klinder A, Kolida S, Ndagijimana M, Laghi L, Calanni F, Brigidi P, Gibson GR, Costabile A. Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn's disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 2556-65.

Madsen K, Cornish A, Soper P, Mckaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone, C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterol. 2001; 121: 580–91.

Mahida YR, Johal S. NF- κ B may determine whether epithelial cell-microbial interactions in the intestine are hostile or friendly. Clin Exp Immunol. 2001; 123:347–9.

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut. 2007; 56: 772–81.

Marques SB, Mattar R, Artifon ELA, Sakai P, Carrilho FJ. High Prevalence of duodenal ulcer in a tertiary care hospital in the city of São paulo, Sp, Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2011; 48: 171-74.

Marsaioli AJ, Leitão Filho HF, Campello JP. Diterpenes in the bark of *Hymenea coubaril*. *Phytochemistry.* 1975; 14: 1882-83.

Martins NB, Peppercorn MA. Inflammatory bowel disease. *Am J Manag Care.* 2004; 10: 544–52.

Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, Miró-Casas E, Gimeno E, López-Sabater MC, de la Torre R, Farré M. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation—a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004; 43: 140–47.

Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science.* 1995; 270:232-33.

Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC; 2009.

Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Gastroprotection of Escins IA, IB, IIA, and IIB on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999; 373: 63 – 70.

Matuda TG, Netto FM. Caracterização química parcial da semente de Jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; 25: 353-57.

Mayberry JF, Rhodes J, Allan R, Newcombe RG, Regan GM, Chamberlain LM, Wragg KG. Diet in Crohn's disease two studies of current and previous habits in newly diagnosed patients. *Dig Dis Sci* 1981;26: 444–8.

Mayer L. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *J Gastroenterol.* 2010; 45: 9-16.

McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of Oxidant-induced Injury to Epithelial Cells during Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Invest.* 1996; 98, 136–41.

Megraud F. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 1998; 115: 1278–82.

Megraud F. *H.pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004; 53: 1374–84.

Middleton E, Kandaswami C. "Plant flavonoid modulation of immune and inflammatory cell functions" In: Klurfeld DM. *Human Nutrition - A Comprehensive Treatise Nutrition and Immunology.* New York: Plenum Press; 1993. p. 239-66.

Misciagna G, Cisternino AM, Freudenheim J. Diet and duodenal ulcer. *Digest Liver Dis* 2000; 32: 468-72.

Morimoto Y, Shimohara K, Oshima S, Sukamoto T. Effects of the new anti-ulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Jpn J Pharmacol.* 1991; 57: 495-505.

Morris GP, Beck PL, Herridge W, Depew W, Szcwczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterol.* 1989; 96:795-803.

Mota KSL, Dias GEN, Pinto MEF, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito ARM, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM. Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules.* 2009; 14: 979-1012.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 330-41.

Mukherjee PK, Saha K, Murugesan T, Mandal SC, Pal M, Saha BP. Screening of antidiarrhoeal profiles of some plant extracts of specific region of West Bengal, India. *J Ethnopharmacol.* 1998; 60: 85–9.

Mush MW, Clarke LL, Mamah D, Gawenis LR, Zhang Z, Ellsworth W, Shalowitz D, Mittal N, Efthimiou P, Alnadjim Z, Hurst SD, Chang EB, Barret TA. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. *J clin invest.* 2002; 110: 1739-47.

Nahrstedt A. The significance of secondary metabolites for interaction between plants and insects. *Planta Med.* 1989; 55: 333-8.

Navarro F, Hanauer SB. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: Safety and Tolerability Issues. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98: 18-23.

Nogueira RT, Shepherd GJ, Laverde Jr A, Marsaioli A.J, Imamura PM. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *Phytochemistry.* 2001; 58: 1153-57.

Oh S. Proton pump inhibitors Uncommon adverse effects. *Austral Family Physician.* 2011; 40: 705-08.

Okabe S, Roth JL, Pfeiffer CJ. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. *Am J Dig Dis.* 1971; 16: 277-84.

Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry.* 2005; 66: 2012-31.

Orlando LA, Lenard L, Orlando RC. Chronic hypergastrinemia: causes and consequences. *Dig Dis Scie.* 2007; 52: 2482–89.

Oz HS, Ebersole JL. Application of Prodrugs to Inflammatory Diseases of the Gut. *Molecules*. 2008; 13: 452-74.

Parsi MA. Does Smoking Decrease the Response to Infliximab in Patients with Crohn's Disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: S18-9.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 5185-92.

Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailón E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr*. 2007; 97:96–103.

Perry M A, Wadhwa S, Parks DA, Pickard W, Granger DN. Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterol*. 1986; 90: 362–67.

Peterson TC, Peterson MR, Raoul JM. The effect of pentoxifylline and its metabolite-1 on inflammation and fibrosis in the TNBS model of colitis. *Eur J Pharmacol*. 2011; 662: 47–54.

Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJR. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilation during acid secretion. *Gastroenterol*. 1992; 102: 168-74.

Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci*. 1987; 32: 1395—401.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002; 347: 417-29.

Porth CM, Kunert MP. *Fisiopatologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2004.

Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal*. Embrapa, 1994, 320p.

Quan C, Talley NJ. Management of peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or NSAIDs. *Am. J. Gastroenterol*. 2002; 97: 2950-61.

Rafatullah S, Tariq M, Al-Yahya MA, Mossa JS, Ageel AM. Evaluation of tumeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *J Ethnopharmacol*. 1990; 29: 25-34.

Ransford RAJ, Langman MJS. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the committee on safety of medicines. *Gut*. 2002; 51: 536-39.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

Ratter JA, Bridgewater S, Atkinson R, Ribeiro JF. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. *Edinburgh Journal of Botany*. 1996; 53, 153-80.

Reddy RP, Tremaine WJ. Is There a Threshold for the Deleterious Effect of Smoking in Crohn's Disease? *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: S16-7.

Reid G, Carey FA. Pathology of idiopathic inflammatory bowel disease. *Surgery*. 2011; 29: 362-65.

Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gilat T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40: 754–60.

Rhodes MJC. Physiological roles of secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. *Plant Mol Biol*. 1994; 24: 1-20.

Richardson, CT. Úlcera péptica. In: Wyngaarden JC, Smith LH, Bennett JC. *Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A: 1993.

Rizzini CT. *Plantas do Brasil: árvores e madeiras úteis do Brasil – manual de dendrologia brasileira*. São Paulo: Edgard Blucher; 1971. 294 p.

Rodríguez-Cabezas ME, Gálvez J, Lorente MD, Concha A, Camuesco Azzouz S, Osuna A, Redondo L, Zarzuelo A. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J Nutr*. 2002; 132: 3263-71.

Rodriguez-Cabezas ME, Gálvez J, Camuesco D, Lorente MD, Concha A, Martinez-Augustin YO, Redondo ZL, Zarzuelo YA. Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Nutr*. 2003; 22: 463-471.

Roessner A, Kuester D, Malferttheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2008; 204:511–24.

Rohr GE, Meier B, Sticher O. Evaluation of different detection modes for the Analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part I. Diode Array and Electrochemical Detection. *Phytoch Anal*. 2000; 11: 106–12.

Rogler G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010; 24: 157–65.

Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea A, Pelli MA, Morozzi G. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinog*.2001; 22:1675-80.

Sánchez de Medina F, Gálvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 278:771–79.

Sánchez de Medina F, Gálvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercetrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* 2002; 70: 3097-108.

Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O, González R, Ballester I, Nieto A, Gálvez J, Zarzuelo A. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:2317-26.

Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.* 2000; 118 (suppl 1): S68-82.

Sanioto SML. Secreções do Sistema gastrointestinal. In: Curi R, Procopio J. *Fisiologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. 625-644.

Santos FA, Silva RM, Campos AR, De Araújo RP, Lima Júnior RC, Rao VS. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42: 579-84.

Santos SC, Mello JCP. Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentez LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* 6ª ed. Editora: UFSC, UFRGS. 2010. 615-56.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentez LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* 6ª ed. Florianópolis: UFSC; 2010.p. 403-34.

Santos RC, Kushima H, Rodrigues CM, Sannomiya M, Rocha LRM, Bauab TM, Tamashiro J, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140: 203–12.

Satsangi J. What Do the Terms “Genetic Predisposition” and “Genetic Heterogeneity” Mean in Relation to Inflammatory Bowel Disease? *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14: S31-2.

Satoh H, Inatomi N, Nagaya H, Inadi I, Nohara A, Nakamura N, Maki Y. Antisecretory activity of novel próton pump inhibitor AG-1749 in dogs and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 248: 806–15.

Shapiro H, Singer P, Halpern Z, Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut* 2007; 56: 426–35.

Shay H. A simple for the uniform production of gastric ulceration in rat. *Gastroenterol.* 1945; 5: 43-61.

Shii D, Inaguma K, Ito M, Suzuki Y. Role of oxygen radicals in healing process of acetic acid-induced ulcers in rats with limited food-intake-time and effects of oxygen radical scavengers on the healing. *Exp. Ulcer.* 1992; 19: 105-09.

Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Dröge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998; 42: 485–92.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 916-21.

Silva JA, Silva DB, Junqueira NTV, Andrade LRM. Frutas nativas dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 166 p.

Silva MR. Caracterização química e nutricional da farinha de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.): desenvolvimento e otimização de produtos através de testes sensoriais afetivos (tese de doutorado). Campinas, UNICAMP; 1997.

Silva MR, Silva MS, Martins KA, Borges S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. *Ciênc Tecnol Alim* 2001; 21: 176-82.

Simon BF, Cadahia E, Conde E. Evolution of phenolic compounds of spanish oak wood during natural seasoning. First results. *J Agricult Food Chemist.* 1999; 47: 1687-94.

Singh VP, Patil CS, Jain NK, Singh A, Kulkarni, SK. Effect of nimesulide on acetic-acid and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003; 71: 163-75.

Slavin JL. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108:1716–31.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150: 76-85.

Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen Uptake. *Microbes and Infection.* 2005; 7: 997–1004.

Sonnenberg A, Everhart JE. The prevalence of self-reported peptic ulcer in the United States. *Am J Public Health.* 1996; 86: 200-05.

Souza Brito AR. Manual de ensaios toxicológicos “in vivo”. Ciências médicas. Campinas: Unicamp; 1994.p. 15-22.

Souza Brito ARM, Costa M, Antônio MA. Effects of prolonged administration of *Musa paradisíaca* L, (banana), na antiulcerogenic substance, in rats. *Phytoth Res.* 1997; 2: 28-31.

Souza MHL, Lemos HP, Oliveira RB, Cunha FQ. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor 1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. *Gut.* 2004; 53:791-96.

Snoeck V, Goddeeris B, Cox, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen Uptake. *Microbes Infect.* 2005; 7: 997-1004.

Stanbury RM, Graham EM. Systemic corticosteroid therapy—side effects and their management. *Br J Ophthalmol.* 1998; 82:704-08.

Stickney JC, Northup DW. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1959; 101: 582-83.

Stocks JG, Gutteridge JMC, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin sci mol med.* 1974; 47: 215-22.

Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB, Abraham C, Turner JR. Targeted Epithelial Tight Junction Dysfunction Causes Immune Activation and Contributes to Development of Experimental Colitis. *Gastroenterol.* 2009; 136: 551-63.

Šventoraityt J, Žvirblien A, Kiudelis G, Žalinkevičius R, Žvirblien A, Praškevičius A, Kupcinskis L, Tamošiūnas V. Immune system alterations in patients with inflammatory bowel disease during remission. *Medicina (Kaunas).* 2008; 44: 27-33.

Szabo S. Duodenal ulcer disease. Animal model: cysteamine-induced acute and chronic duodenal ulcer in the rat. *J Pathol.* 1978; 93: 273-76.

Teixeira ML, Soares AR, Scolforo JRS. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.)Coville] em 10 locais de Minas Gerais. *Ciência Prática de Lavras.* 1990; 14: 229-32.

Tragnone A, Valpiani D, Miglio F, Elmi G, Bazzocchi G, Pipitone E, Lanfranchi GA. Dietary habits as risk factors for inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1995; 7: 47-51.

Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, Bok L, Raaben W, Velders MP, Dijkstra G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut.* 2009; 58: 379-87.

Tulassay Z, Herszényi L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best Prac Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24: 99-108.

Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol.* 2006; 169:1901-9.

Uchida M, Matsueda K, Shoda R, Muraoka A, Yamato S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl-induced gastric mucosal lesions mainly via prostaglandin. *Jpn. J. Pharmacol.* 2001; 85: 133-38.

Ueda S, Yoshikawa T, Takahashi S, Ichikawa H, Yasuda M, Oyamada H, Tanigawa T, Sugino S, Kondo M. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1989; 162: 55–8.

Van Heel DA, McGovern DPB, Jewell DP. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. *Lancet.* 2001; 357:1902–4.

Vasconcelos PCP, Andreo MA, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *J Ethnopharmacol.* 2010; 131: 146–53.

Veljaca M, Lesch CA, Pllana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 102: 1524-34.

Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Should Family Members of IBD Patients be Screened for CARD15/NOD2 Mutations? *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 14: S190-1.

Victoria CR, Sasaki LY, Nunes HRC. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo state, Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2009; 46: 20-5.

Videla S, Vilaseca J, Antolín M, García-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A, Malagelada JA. Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 1486–93.

Wagner H, Bladt S, Zgainsky E. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* Berlin: Springer Verlag. 1984: 320 p.

Wahed M, Corser M, Goodhand JR, Rampton DS. Does Psychological Counseling Alter the Natural History of Inflammatory Bowel Disease? *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 16: 664-69.

Wang YH, Yang XL, Wang L, Cui MX, Cai YQ, Li XL, Wu YJ. Effects of proanthocyanidins from grape seed on treatment of recurrent ulcerative colitis in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88: 888-98.

Wang YH, BE B, Yang XL, Zhai LN, Wang XX, Liu X, Shi JC, Wu YJ. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathways in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. *Int. Immunopharmacol* 2011; 11:1620-27.

Whittle BJR. Nitric oxide in gastrointestinal physiology and pathology. In: Johnson LR. *The physiology of the gastrointestinal tract.* New York: Raven Press; 1994. p.267–94.

Williams I, Goh J. Investigational new drugs in the treatment of inflammatory bowel disease: a review. *J Exp Pharmacol*. 2011; 3: 13–9.

Winterbourn C, Brennan SO. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem*. 1997; 326: 87-92.

Witaicenis A, Seito LN, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem Biol Interact*. 2010; 186:211-18.

Witaicenis A, Fruet AC, Salem L, Di Stasi LC. Dietary Polydextrose Prevents Inflammatory Bowel Disease in Trinitrobenzenesulfonic Acid Model of Rat Colitis. *J Med Food*. 2010; 13 : 1391–96.

Witaicenis A, Luchini AC, Hiruma-Lima CA, Felisbino SL, Garrido-Mesa N, Utrilla P, Gálvez J, Di Stasi LC. Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: Comparison with prednisolone and sulphasalazine. *Chem Biol Interact*. 2012; 195: 76–85.

Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New Engl J Med*. 1999; 340: 1888-99.

Yamamoto T, Nakahigashi M, Saniabadi AR. Review article: diet and inflammatory bowel disease – epidemiology and treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 30: 99–112.

Yoshioka Y, Akiyama H, Nakano M, Shoji Y, Kanda T, Ohtake Y, Takita T, Matsuda R, Maitani T. Orally administered apple procyanidins protect against experimental inflammatory bowel disease in mice. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8: 1802-07.

Yoshizawa M, Yokoyama K, Nakano Y, Nakamura H. Protective effects of barley and its hydrolysates on gastric stress ulcer in rats. *Yakugaku Zasshi*. 2004; 124: 571-75.

Yuan Y, Padol IT, Hunt RH. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006; 3: 80-9.

Yun L, Hanauer S. Selecting appropriate anti-TNF agents in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009; 3: 235-48.

Zapata-Colindres JC, Zepeda-Gómez S, Montaña-Loza A, Vázquez-Ballesteros E, Villalobos JJ, Valdovinos-Andraca F. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Can J Gastroenterol*. 2006; 20: 277-80.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance. *P. J. Clin. Invest*. 1994; 94: 2036–44.

Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut*. 1999; 45: 199–209.