

Catharine Ferrazoli

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DO EXTRATO
METANÓLICO E FRAÇÕES DOS CAPÍTULOS
DE *Eriocaulon ligulatum* VELL.
(ERIOCAULACEAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP
Campus Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas (Área
de Concentração: Farmacologia)

Orientadora: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Botucatu – SP
2008

BANCA EXAMINADORA – DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima (orientadora)

Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

MEMBROS SUPLENTE

Profa. Dra. Claudia Helena Pellizzon

Profa. Dra. Elisangela Farias Silva

Profa. Dra. Lucia Regina Machado da Rocha

Profa. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

DATA: 29/02/2008

Auxilio financeiro



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Dedicatória

Dedico este trabalho a alguém que hoje ainda é pequenina por fora, mas grande, muito grande por dentro. Minha fonte de energia, de inspiração para tudo o que faço. Alguém que admiro e amo simplesmente por ela ser quem ela é. Minha filha Gabriela Ferrazoli.

Agradecimentos

Nenhuma obra é fruto do trabalho individual. Por isso sou reconhecida aos co-autores que dela participaram, pois sem seu concurso este trabalho não se tornaria realidade.

Desejo expressar meus agradecimentos;

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, por ter me recebido em seu laboratório, inicialmente como estagiária e posteriormente como sua aluna de mestrado. Quem me deu a oportunidade de realizar este trabalho.

À Profa. Dr. Lourdes Campaner dos Santos e ao Marcelo Silva do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, pelo preparo dos extratos e frações e, pela caracterização fitoquímica dos mesmos.

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito, do departamento de Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Biociências da UNICAMP, por disponibilizar o laboratório. E a todos os alunos (Aninha, Anderson, Elis, Vitor, Erikinha, Felipe, Ricardo, Cinza) de seu laboratório, pelo acolhimento, amizade, ensinamentos. Em especial gostaria de agradecer a Ana Cristina (Aninha), que foi uma grande colaboradora para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, Ana Paula (Floripa), Catarine (Cat 02/venenosa), Flavinha (Kalose), Zeilinha, Hélio (Ponpon), Tiago (Mingo), Vitor (Cebola), Patrícia (Paty), Fabio (minino/nervoso), Larissa (Cocotinha), Ana Paula (Ridícula), Paulo (Rita), Ariane (Esponja), Raquel (Pocotó), Roney, Celi (Girafales), por toda ajuda, companheirismo que deram durante o tempo em que permanecemos juntos nesta jornada.

À Profa. Dra. Silvia Mitiko Nishida e ao Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes pela ótima orientação durante o estágio docência.

Ao Prof. Dr. Rolando Hernandez, da Universidade Autônoma do México (UNAM), Laboratório de Biologia Celular, pelo estágio oferecido e pela atenção dispensada durante o mesmo.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Di Stasi, por disponibilizar seu laboratório e aos seus alunos, Leonardo, Érika e Carol pela ajuda oferecida.

À Profa. Dra. Lucia Regina Machado da Rocha por disponibilizar seu laboratório para a realização de experimentos, pelos ensinamentos e também por aceitar o convite para participar da minha banca no exame geral de qualificação.

À Prof. Dra. Mirtes da Costa, pela participação em minha banca no exame geral de qualificação.

À CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, Luciana, Tardivo, Dona Ângela e Janete.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Cris, Paulão, Luis.

Ao Sr. Júnior, funcionário do Biotério. Por cuidar dos nossos “bixinhos” com tanto carinho e dedicação.

Aos funcionários da pós-graduação, Sergio, Luciene e Maria Helena, pela paciência e colaboração nas questões burocráticas.

À Mariana Ferrereira de Almeida (Mari), companheira com quem dividi casa durante o mestrado, mas ela foi e é mais do que uma simples companheira de casa. É uma amiga, uma irmã que a vida me deu. Minha família em Botucatu.

Ao amigo Luis Emiliano Cisneros Alvares, por toda ajuda que me prestou durante a realização deste trabalho.

Aos amigos da republica onde morei durante o inicio do mestrado, Luciana, Mere e Rafael.

À minha filha Gabriela (bibiquinha), por compreender o tempo em que estive que permanecer distante dela, e por ser simplesmente quem ela é. Aos meus pais Hilário e Doralba por serem a base de tudo que sou hoje. Às minhas irmãs Cilmara e Carolina, Tia Odette, enfim a toda minha família, afinal sem eles eu nada seria.

Ao Dr. João Humberto Vanin, que foi mais que um psicólogo, muito mais, sem o qual esse trabalho não teria sido concluído.

Ao Giuliano César Souza Rocha (Giu), pelo companheirismo, carinho e dedicação.

Resumo

A espécie *Eriocaulon ligulatum* Vell. é uma sempre-viva conhecida como botão dourado que pertence à família Eriocaulaceae. O gênero *Eriocaulon* compreende 435 espécies distribuídas pela América, África, Ásia e Europa. No Brasil são conhecidas 59 espécies distribuídas desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. As propriedades etnofarmacológicas das Eriocaulaceas são pouco descritas, mas alguns membros desta família apresentam significativos efeitos sobre o trato gastrointestinal. Investigações fitoquímicas do extrato metanólico de *E. ligulatum* demonstraram que as naftopiranonas e os flavonóides, são os constituintes majoritários dos capítulos e escapos desta espécie. Com base no interessante perfil fitoquímico desta espécie, este projeto teve o intuito de avaliar a possível ação antiulcerogênica do extrato metanólico de seus escapos e capítulos (EELe e EELc) em modelos experimentais *in vivo*. Ambos os extratos apresentaram efeito gastroprotetor nos modelos experimentais de indução de lesões gástricas por etanol acidificado e etanol absoluto. Porém, EELc foi mais efetivo que EELe, não teve efeito anti-secretório, e sua ação gastroprotetora não envolve ativação dos fatores endógenos óxido nítrico ou grupamentos sulfidrílicos. A partir do fracionamento de EELc foram obtidas três diferentes frações, denominadas: flavonóides glicosilados (FG), flavonóides agliconas (FA) e flavonóides glicosilados + isocumarinas + flavonóides agliconas (ISO). As três frações e o extrato foram avaliados frente ao estresse oxidativo causado pelo etanol absoluto, a fim de se caracterizar uma possível atividade antioxidante. Para tanto foram analisados: danos oxidativos de membrana (lipoperoxidação e determinação de grupamentos sulfidrílicos) e atividade enzimática (determinação da atividade da glutathione peroxidase, glutathione reductase e mieloperoxidase). O EELc e as frações FA, FG e ISO apresentaram seu efeito gastroprotetor relacionado a inibição da atividade da enzima mieloperoxidase. O fracionamento do extrato demonstrou uma redução na ação gastroprotetora em comparação com o extrato bruto de forma que o sinergismo entre os compostos, provavelmente seja o responsável pela ação gastroprotetora desta espécie.

Abstract

Eriocaulum ligulatum Vell. species is a pipewort, best known as “botão dourado” belonging to the Euricaulaceae family. *Eriocaulum* genus comprises 435 species, which are distributed through America, Africa, Asia and Europe. In Brazil, there are 59 species geographically distributed from Amazon to Rio Grande do Sul. Pharmacological properties of Eriocaulaceae are poorly described. However, some members of this family show significant effects on the gastrointestinal tract. Phytochemical researches of the methanolic extract of *E. ligulatum* showed that naphthopyranones and flavonoids are the major constituents of capitulae and scapes of this species. Based upon the interesting phytochemical profile of this species, the aim of this project was to evaluate the potential antiulcerogenic activity of the methanolic extracts from scapes and capitulae (EELe and EELc respectively) *in vivo* experimental model. Both extracts showed gastroprotective effect on experimental models of induction of gastric lesion using acidic and absolute ethanol. However, EELc was more effective than EELe, did not show antisecretor effect, and its gastroprotective action did not involve activation of the endogenous factors nitric oxide or sulphhydrylic compounds. Starting with EELc fractioning, three different fractions named flavonoid glucoside (FG); flavonoid aglycon (FA); and flavonoid glucoside + isocoumarin + flavonoid aglycon (ISO) were obtained. All three fractions and the whole extract were tested against oxidative stress induced by absolute ethanol, in order to characterize any antioxidant action. Therefore, both membrane oxidative injuries (i.e. lipoperoxidation and determination of sulphhydrylic compounds), and enzymatic activity (i.e. determination of the activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and myeloperoxidase) were analyzed. EELc as well as FA, FG and ISO fractions showed a gastroprotective effect related to the inhibition of the myeloperoxidase activity. Fractions demonstrated lower gastroprotective activity than the whole extract, suggesting that synergism between the different compounds is probably responsible for the gastroprotective activity of this species.

Lista de abreviaturas

Carbeno = carbenoxolona

CCD = cromatografia em camada delgada comparativa

Cl⁻ = ânion cloreto

DAINEs = drogas antiinflamatórias do tipo não-esteroidais

DPPH = 2,2 di-fenil-2-picryl-hidrazil

EELc = extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*

EELe = extrato metanólico dos escapos de *Eriocaulon ligulatum*

EROs = espécies reativas de oxigênio

FA = fração de flavonóides agliconas do extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*

FG = frações de flavonóides glicosilados do extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*

GPx = Glutathione Peroxidase

GR = Glutathione Redutase

GSH = glutathione

GSSG = glutathione oxidada

H⁺ = íon hidrogênio

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

i.p. = intraperitonealmente

ISO = fração de flavonóides glicosilados + isocumarinas + flavonóides agliconas do extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*

KCl = cloreto de potássio

L-NAME = N-nitro-L-arginina metil éster

LPO = peroxidação lipídica

MPO = Mieloperoxidase

NaOH = hidróxido de sódio

NEM = N-etilmaleimida

NO = Óxido Nítrico

O₂⁻ = ânion superóxido

TBARS = substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO.....	01
I.1.	PLANTAS MEDICINAIS.....	01
I.2.	ÚLCERA PÉPTICA.....	02
I.3.	PLANTA UTILIZADA.....	03
II.	OBJETIVOS.....	06
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	07
III.1.	ANIMAIS.....	07
III.2.	PLANTA.....	07
III.3.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS.....	10
III.3.1.	Toxicidade aguda e triagem hipocrática.....	10
III.3.2.	ATIVIDADE GASTROPROTETORA.....	11
A.	Lesões gástricas.....	11
B.	Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol.....	11
C.	Indução de úlcera por Etanol absoluto.....	12
D.	Indução de úlcera por DAINE.....	12
III.3.3.	MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO METANÓLICO DOS CAPÍTULOS DE <i>E. ligulatum</i> (EELc).....	12
A.	Úlceras induzidas pela Ligadura de Píloro e Avaliação dos parâmetros do suco gástrico.....	12
B.	Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção.....	13
C.	Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção.....	13
D.	Determinação da motilidade intestinal.....	14
III.4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DAS FRAÇÕES DO	

EXTRATO METANÓLICO DOS CAPÍTULOS DE <i>E. ligulatum</i>	14
A. Doses empregadas nos experimentos com frações.....	14
B. Indução de úlcera por Etanol absoluto.....	15
III.5. TESTES ANTIOXIDANTES “ <i>IN VIVO</i> ”.....	15
A. Determinação da Peroxidação lipídica.....	15
B. Determinação de grupamentos sulfidrila.....	16
C. Determinação da atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).....	16
D. Determinação da atividade da Glutaciona Redutase (GR).....	16
E. Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	17
III.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
IV. RESULTADOS.....	18
IV.1. Extrato metanólico de <i>E. ligulatum</i> escapos (EELe) e capítulos (EELc).....	18
A. Triagem Hipocrático e Toxicidade aguda.....	18
B. Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol.....	20
C. Indução de úlcera por Etanol absoluto.....	21
D. Indução de úlcera por DAINE (piroxicam).....	22
E. Úlcera induzida pela ligadura de piloro e Avaliação dos parâmetros do suco gástrico.....	23
F. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção.....	24
G. Determinação do papel do óxido nítrico (NO) na gastroproteção.....	25
H. Determinação da motilidade intestinal.....	26
IV.2. Fração de flavonóides agliconas (FA) Fração de flavonóides glicosilados (FG) Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + isocumarina (ISO).....	27
I. Indução de úlcera por Etanol absoluto.....	27

J. Indução de úlcera por Etanol absoluto.....	28
K. Indução de úlcera por Etanol absoluto.....	29
IV.3. Atividade antioxidante “in vivo”.....	31
L. Determinação da Peroxidação lipídica.....	31
M. Determinação do Grupamento Sulfidrila.....	32
N. Determinação da atividade da GPx e GR.....	33
O. Determinação da atividade da MPO.....	35
V. DISCUSSÃO.....	36
VI. CONCLUSÃO.....	44
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
VIII. ANEXO.....	53

I. INTRODUÇÃO

I.1. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágicos/religiosos (Firenzouli *et al.*, 2005) ou como medicamento (Li & Ohizumi, 2004). O emprego empírico de produtos naturais era e continua sendo, uma das formas usuais de se buscar cura e alívio para moléstias, ferimentos e males de conceituação popular, que sempre acompanham o homem.

Com a revolução industrial, deu-se o desenvolvimento da química orgânica e de produtos sintéticos para tratamentos farmacológicos (Rates, 2001). A fácil aceitação e a preferência pelas drogas sintéticas se devem, em parte, a acessibilidade, eficácia e segurança desses produtos. Hoje o emprego de plantas medicinais, como medicamento, ainda é de grande importância em todo o mundo (Kinghorn, 2002), apesar de muitas vezes ser ineficiente. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (Gurib-Fakim, 2006). Dentre os fatores que definem o emprego popular das plantas nos cuidados com a saúde, está o alto preço dos medicamentos industrializados (Rates, 2001).

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século 19 (Balunas & Kinghorn, 2005). Plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick *et al.*, 2002). De acordo com Newman e colaboradores (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural. Além disso, das drogas descobertas em estudos com produtos naturais, 25% pertencem ao grupo das plantas superiores (Gurib-Fakin, 2006).

A possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GurBuz *et al.*, 2002). Porém, o estudo de novos

compostos a partir de espécies vegetais é oneroso. Para que uma nova droga seja lançada ao mercado, gasta-se em torno de 100 a 360 milhões de dólares e no mínimo 10 anos de trabalho. Estima-se que a probabilidade de sucesso para obtenção de novos compostos seja de 1 molécula ativa para cada 10.000 moléculas estudadas. Esses dados são referentes ao panorama de países desenvolvidos que selecionam plantas de maneira randômica aumentando os custos e o tempo gasto para se conseguir novas drogas. Mas o estudo de plantas medicinais não se restringe apenas a procura de novas moléculas, pois essas plantas podem ser empregadas em diferentes formulações, como em infusões, tinturas, extratos, frações ou no desenvolvimento de fitoterápicos (Rates, 2001).

Para se realizar pesquisa com plantas medicinais, deve-se ter critérios adequados na seleção das espécies vegetais para se obter sucesso na investigação farmacológica. Segundo Holetz e colaboradores (2002), a escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) seria óbvia, devido ao acúmulo milenar das informações, o que aumenta a possibilidade de se descobrir novos compostos. Porém, a seleção com base nos constituintes químicos (potencialmente ativos) encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante principalmente pela possibilidade de se encontrar quantidades elevadas de compostos ativos.

I.2. ÚLCERA PÉPTICA

As úlceras pépticas são lesões na mucosa gástrica e duodenal provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, NO, prostaglandinas, dentre outros) e lesivos (pepsina, ácido clorídrico, H_2O_2 , OH^- , O_2^- , dentre outros). Estas lesões podem ser desencadeadas e agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de drogas antiinflamatórias do tipo não-esteroidais (DAINEs) e pela presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal (Wallace & Granger, 1996; Maity *et al.*, 2003).

Hoje a grande maioria das pesquisas científica envolvendo úlceras pépticas, direciona-se principalmente para o estudo de *H. pylori* ou aponta esta infecção

bacteriana e as DAINEs como os maiores responsáveis pela incidência desta moléstia (Watanabe & Chiba, 2002). *H. pylori* está presente em quase 50% da população mundial e as DAINEs são as drogas de maior uso; porém, nem todos os indivíduos infectados pela bactéria ou que se utilizam de drogas antiinflamatórias manifestam gastrites ou desenvolvem úlcera péptica (Bauer & Marker-Hermann, 2003; Perua, 2004). Fatores como estresse, alcoolismo, fumo também são importantes no desenvolvimento desta moléstia (Maity *et al.*, 2003; Spirt, 2004). Assim, se pode dizer que a etiologia da doença não apresenta definição frente à tamanha diversidade de relações possíveis para o seu surgimento.

A úlcera péptica foi considerada a maior causa de morbidade e mortalidade por mais de um século (Chan & Leung, 2002). Ela ainda é considerada um grande fator sério de morbidade, havendo alto índice de morte em casos extremos, como em úlceras hemorrágicas promovidas pelo estresse (Spirt, 2004).

A importância clínica das úlceras pépticas levou ao desenvolvimento de drogas capazes de aliviar os sintomas e até mesmo possibilitar a cura. Drogas pertencentes à família de antagonistas de receptores H₂ (cimetidina) ou inibidores de bomba protônica (lansoprazol) são efetivas e muito utilizadas no tratamento dos sintomas; porém, o uso prolongado dessas drogas pode levar a efeitos adversos como risco de câncer (La Vechia & Tavani, 2002; Raghunath *et al.*, 2005). Isso demonstra a necessidade de mais estudos para a compreensão desta doença, assim como a busca por métodos e drogas capazes de promover a sua remissão.

Schmeda-Hirschmann & Yesilada (2005) recentemente apresentaram a grande variedade de substâncias químicas isoladas, mistura de ervas e extratos de plantas cujas atividades terapêuticas foram comprovadas em modelos experimentais de indução de úlcera, o que indica, portanto, o importante potencial das plantas e de seus princípios ativos na descoberta de novas terapêuticas para as úlceras pépticas.

I.3. PLANTA UTILIZADA

A espécie *Eriocaulon ligulatum* Vell. (Figura 1) pertence à família Eriocaulaceae é conhecido como botão dourado. Esta espécie possui rosetas desenvolvidas com 20-60 cm de diâmetro e capítulos com diâmetros maiores que 1 cm e claros (Giulietti & Hensold, 1990).

O gênero *Eriocaulon* compreende 435 espécies distribuídas pela América, África, Ásia e Europa (Moldenke, 1971).

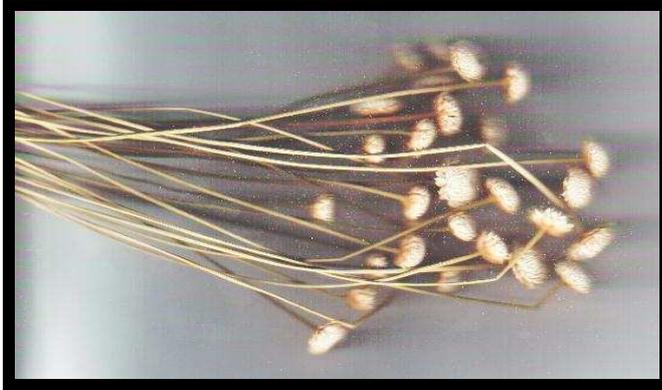
Eriocaulon é o único gênero da família de ocorrência no continente Asiático, com poucas espécies na União Soviética e Mongólia e com maior número no Sul e Sudeste, especialmente Índia, onde ocorrem 66 espécies segundo Moldenke (1971). As plantas, nesta região, ocorrem geralmente em locais montanhosos, com altitudes em torno de 1.000 m, apesar de algumas espécies, como *E. pumilio* Hook.F. ocorrer no Himalaia a até 3.000 m de altitude. As espécies habitam em geral, locais muito úmidos ou são plantas aquáticas.

No Brasil são conhecidas 59 espécies que são distribuídas desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul. No entanto, a maior concentração está no Estado de São Paulo, Goiás e principalmente em Minas Gerais onde 31 espécies foram encontradas (Giulietti, 1978).

As propriedades etnofarmacológicas das Eriocauláceas são pouco descritas. Embora alguns membros desta família apresentem significativos efeitos sobre o trato gastrointestinal; como por exemplo, a atividade antiulcerogênica de *Syngonanthus arthrotrichus* (Batista *et al.*, 2004), atividade antiulcerogênica e laxativa de *Leiothrix flavescens* (Moraes *et al.*, 2008) e atividade antiinflamatória intestinal de *Paepalanthus bromelioides* (Di Stasi *et al.*, 2004), até o presente, não existem estudos farmacológicos envolvendo a espécie *E. ligulatum* quanto as suas propriedades farmacológicas. Fitoquimicamente, o gênero *Eriocaulon* possui flavonóides, naftopiranonas e γ -tocoferil acetato (Bate-Smith & Harborne, 1969; Santos *et al.*, 2005; Ho & Chen, 2002).

Investigações do extrato metanólico de *E. ligulatum* demonstraram também que as naftopiranonas e os flavonóides, são os constituintes majoritários dos capítulos e escapos de *E. ligulatum* (Santos *et al.*, 2005).

Figura 1 - Foto *Eriocaulon ligulatum* (identificada pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano - IB - USP)



II. OBJETIVOS

Em vista do que foi relatado, os objetivos específicos deste projeto foram:

1- avaliar a atividade gastroprotetora do extrato metanólico dos escapos (EELe) e capítulos (EELc) de *Eriocaulon ligulatum*;

2- avaliar a atividade gastroprotetora dos frações de flavonóides glicosilados (FG), flavonóides glicosilados + isocumarinas + flavonóides agliconas (ISO) e flavonóides agliconas (FA) obtidas do extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum*;

3- caracterizar os efeitos antissecretor e/ou citoprotetor do extrato e frações dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (EELc) e

4- avaliar a segurança do extrato, através de ensaios de toxicidade aguda.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-40g) e ratos machos Wistar (180 a 250g), para os experimentos de lesões gástricas e determinação dos mecanismos de ação antiulcerogênica, provenientes do Biotério Central da UNESP- Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP – Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. No caso do ensaio de toxicidade aguda, excepcionalmente também foram utilizados camundongos fêmeas (25-40g), submetidas às mesmas condições de criação e manutenção acima citadas. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais (nº 017, 018, 019, 020, 021 e 022/04-CEEA; nº 018 e 019/05-CEEA) aprovados, previamente, pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 5 a 10.

III.2. PLANTA

COLETA E EXTRAÇÃO

O material vegetal, escapos e capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B. Smith. foram coletados no mês de maio de 1999, em Diamantina, Estado de Minas Gerais pelo prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP. A identificação foi feita pelo mesmo, catalogadas com o número de exsicata CFCR 7996 (*E. ligulatum*). A exsicata se encontra depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Após a chegada do material vegetal no laboratório de fitoquímica, este foi seco em estufa a 40°C por 4 dias sendo esporadicamente mexidos. Após a secagem, foram triturados em moinho de facas e, logo em seguida prepararam-se os extratos por maceração e/ou percolação com cada solvente (Figura 2a). A partir

do extrato metanólico foram obtidas 3 frações: Fração de Flavonóides glicosilados, Fração de Flavonóides glicosilados + isocumarinas + agliconas e Fração de Flavonóides aglicona (Figura 2b).

A avaliação qualitativa de alcalóides, esteróides, triterpenos, saponinas, cumarinas, taninos e flavonóides dos capítulos e dos escapos secos e moídos estão representados no quadro (Figura 3).

Figura 2a – Fluxograma da obtenção do extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (EELc)

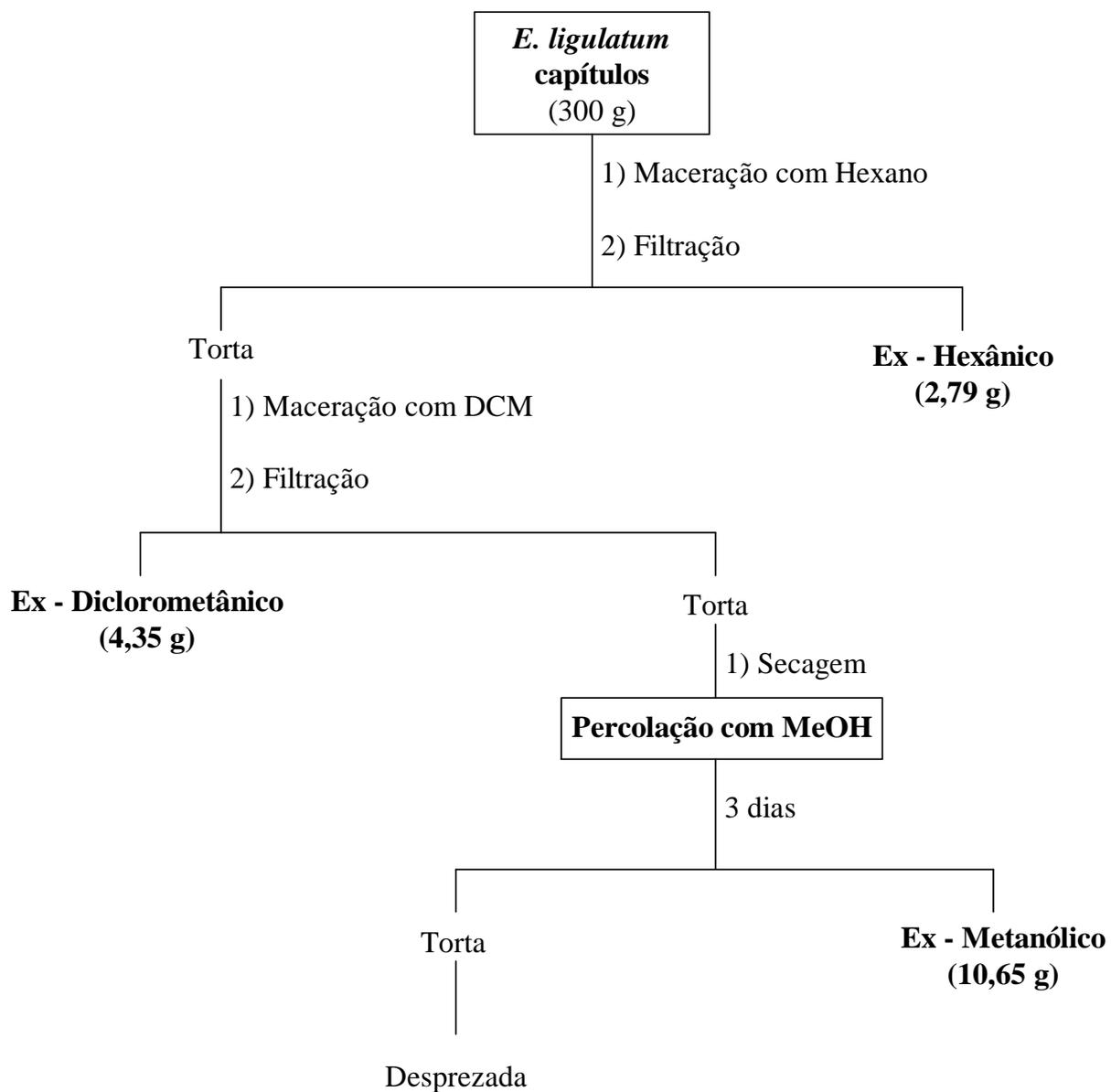


Figura 2b – Esquema do fracionamento do extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum* para a obtenção de frações enriquecidas.

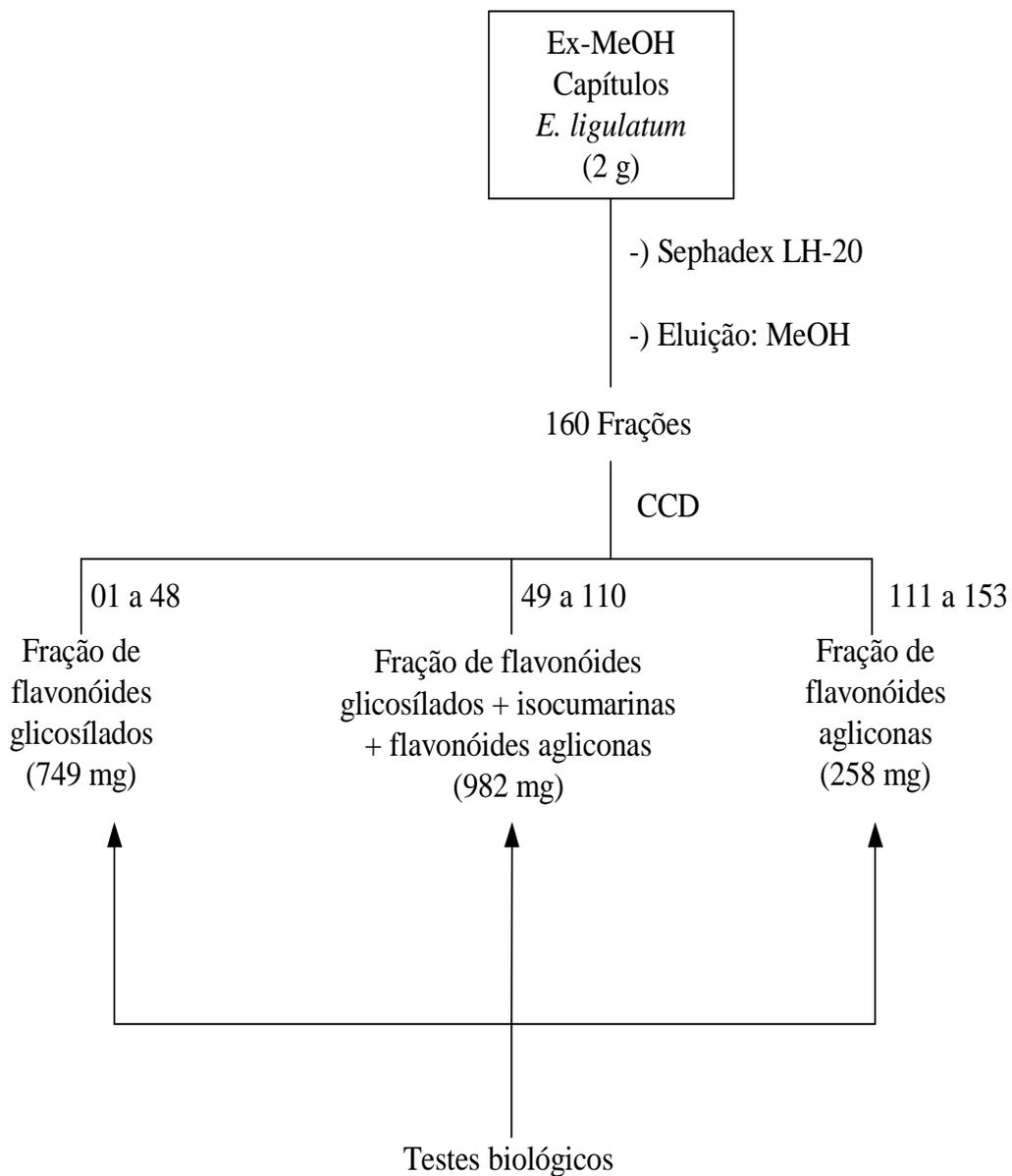


Figura 3 - Ensaio fitoquímico preliminar dos extratos metanólicos de capítulos e escapos de *E. ligulatum*.

Parte da Planta	Alcalóides	Esteróides e Triterpenos	Cumarinas	Flavonóides	Saponinas	Taninos
Capítulos	-	-	++	+++	-	-
Escapos	-	-	+	++	-	-

Os sinais (+) e (-), indicam, respectivamente, presença ou ausência das classes de substâncias pesquisadas.

III.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS

III.3.1. Toxicidade aguda e triagem hipocrática

Estudos foram realizados a fim de se constatar possíveis efeitos tóxicos agudos do extrato que possam estar relacionados a alterações de comportamento, a ocorrência de morte e de modificações macroscópicas de órgãos vitais como fígado, rins, coração, baço e pulmões.

Foram realizados experimentos paralelos que utilizaram camundongos Swiss machos e fêmeas divididos aleatoriamente em grupos para os respectivos tratamentos: salina (controle) e extrato metanólico de *Eriocaulon ligulatum* capítulos na dose de 5000 mg/kg. Os tratamentos foram realizados por via oral (p.o.) e os parâmetros comportamentais, descritos por Malone & Robichaud (1962) e Souza Brito (1994), observados aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a realização dos tratamentos (anexo 1). 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 a análise dos órgãos vitais. Estes foram pesados, no intuito de avaliar possíveis alterações morfológicas detectadas macroscopicamente.

III.3.2. ATIVIDADE GASTROPROTETORA

A. Lesões gástricas

Para avaliar a atividade antiulcerogênica dos extratos e direcionar os estudos de fracionamento, foram realizados experimentos de indução de úlcera gástrica com base em fatores etiológicos da doença no homem como acúmulo de suco gástrico, drogas antiinflamatórias não esteroidais e álcool etílico. Cada modelo experimental apresenta os seus respectivos grupos controles 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*. Em todos os experimentos de indução de úlcera, após a morte, retirada do estômago e abertura pela curvatura maior, os mesmos foram prensados entre placas de vidro transparente e escaneados para posterior medição das áreas ulceradas com a utilização do programa AvSoft Bio View – Espectra.

B. Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol

Este método foi baseado no modelo de Mizui & Doteuchi (1983), com modificações. Após 24 horas de jejum, os grupos experimentais, compostos por camundonos Swiss machos, foram tratados com os respectivos extratos 50 minutos antes da indução de lesão gástrica por etanol acidificado. Os grupos de animais receberam carbenoxolona 100mg/Kg ou lansoprazol 30mg/Kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos dos escapos e capítulos de *Eriocaulon ligulatum* nas doses 250, 500 e 1000mg/Kg. Todos os tratamentos foram realizados por via oral, em dose volume final de 10 mL/Kg e a ulcerogênese foi induzida pela administração de 0,2 mL da solução lesiva de 0,3M HCl/etanol 60%. Transcorrido 1 hora da administração do agente lesivo, os animais foram mortos, seus estômagos retirados, o pH do suco gástrico determinado por fita de pH (Merck[®], Alemanha) após abertos ao longo da curvatura maior, os mesmos foram prensados entre placas de vidro transparente e escaneados para posterior

medição das áreas ulceradas com a utilização do programa AvSoft Bio View – Espectra.

C. Indução de úlcera por Etanol absoluto

Baseado no modelo descrito por Morimoto *et al.* (1991), ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em grupos para seus respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg e extratos nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg). Cada tratamento foi administrado por via oral em dose volume de 10 mL/Kg. Decorridos 60 minutos, 1mL do agente lesivo (etanol 99,5%) foi administrado também por via oral em todos os animais. Os animais foram mortos por deslocamento cervical 1 hora após a administração do agente lesivo, e seguido dos mesmos processos do modelo descrito previamente (HCl/etanol).

D. Indução de úlcera por DAINE

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Rainsford (1987), com modificações. Foram utilizados camundongos Swiss machos, submetidos a jejum por um período de 36 horas. As lesões gástricas foram induzidas pela administração de piroxicam na dose de 30 mg/Kg, por via subcutânea. Os tratamentos (p.o.) com o extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg, cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) e salina (controle negativo) foram realizados 30 minutos antes da administração do agente indutor. Os animais foram mortos por deslocamento cervical 4 horas após o estímulo lesivo para a retirada dos estômagos seguido dos mesmos processos dos modelos anteriores.

III.3.3. MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA DO EXTRATO METANÓLICO DOS CAPÍTULOS DE *E. ligulatum* (EELc)

A. Úlceras induzidas pela Ligadura de Píloro e Avaliação dos parâmetros do suco gástrico

Foi adotado o modelo descrito por Shay (1945), onde os parâmetros do suco gástrico foram avaliados sob o efeito do extrato administrado por oral ou intraduodenal no intuito de avaliar o efeito local ou sistêmico dos extratos. Após 24 horas de jejum os ratos, sob anestesia, sofreram uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide para a ligadura do píloro. A administração do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* na menor dose efetiva (500 mg/Kg) determinada nos experimentos prévios, cimetidina 100 mg/Kg (controle positivo) ou salina (controle negativo), foi realizada imediatamente após a ligadura, por via intraduodenal ou 30 minutos antes nos tratamentos por via oral. Seguido à ligadura os animais foram suturados e após 4 horas mortos por deslocamento cervical para a retirada dos estômagos. 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 modelo EM, através da fenolftaleína como indicador. A concentração total de ácido foi expressa em mEq/ml/4h e o pH determinado por fitas de pH (Merck®, Alemanha).

B. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção (Matsuda *et al.*, 1999)

Após 24 horas de jejum os ratos Wistar machos foram separados em 6 grupos, dos quais 3 receberam um pré-tratamento de NEM (N-etilmaleimida) intraperitonealmente (i.p.) e os outros 3 receberam salina pela mesma via. A droga NEM apresenta a propriedade de quelar as pontes de dissulfeto, responsáveis pela manutenção da conformação da barreira mucosa. Cada animal, dos grupos correspondentes, recebeu um volume de 10 mL/Kg numa dose de 10 mg/Kg de NEM. Decorridos 30 minutos, cada grupo experimental recebeu (p.o.) seu

tratamento correspondente (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg e extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* 500 mg/kg). Depois de 60 minutos, os animais receberam um volume fixo de 1 mL de etanol absoluto 99,5 % (p.o.), sendo mortos após 1 hora deste último tratamento. Os estômagos foram retirados e abertos pela curvatura maior, os mesmos foram prensados entre placas de vidro transparente e escaneados para posterior medição das áreas ulceradas com a utilização do programa AvSoft Bio View – Espectra.

C. Determinação do papel do Óxido Nítrico (NO) na gastroproteção (Arrieta *et al.*, 2003)

Após 24 horas de jejum os ratos Wistar machos foram separados em 6 grupos, dos quais 3 receberam um pré-tratamento de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster) intraperitonealmente (i.p.) e os outros 3 receberam salina pela mesma via. A droga L-NAME inibe a enzima NO-sintase. Cada animal, dos grupos correspondentes, recebeu um volume de 10 mL/Kg numa dose de 70 mg/Kg de L-NAME. Decorridos 30 minutos, cada grupo experimental recebeu (p.o.) seu tratamento correspondente (salina, carbenoxolona 100 mg/Kg e extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* 500 mg/kg). Depois de 60 minutos, os animais receberam um volume fixo de 1 mL de etanol absoluto 99,5 % (p.o.), sendo mortos após 1 hora deste último tratamento. Os estômagos foram retirados e abertos pela curvatura maior, os mesmos foram prensados entre placas de vidro transparente e escaneados para posterior medição das áreas ulceradas com a utilização do programa AvSoft Bio View – Espectra.

D. Determinação da motilidade intestinal

Seguindo o método descrito por Stickney & Northup (1959) com modificações, camundongos Swiss machos, em jejum de 6 horas e divididos em 5 grupos, receberam seus respectivos tratamentos orais: salina, atropina 5 mg/Kg e extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (250, 500 ou 1000 mg/Kg). Após 30 minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% p.o. no volume de 10 mL/Kg. Os animais foram mortos 30 minutos após o último

tratamento. Em seguida retirou-se todo o intestino delgado juntamente com o estômago, para a posterior medição do comprimento total do intestino delgado e a distância percorrida pelo carvão no mesmo. Os dados obtidos foram transformados em uma relação de distancia percorrida e comprimento total do intestino para análise estatística.

III.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO METANÓLICO DOS CAPÍTULOS DE *E. ligulatum*

A. Doses empregadas nos experimentos com frações

As doses das frações foram determinadas a partir de uma relação percentual da sua concentração no extrato bruto. A partir de 2 g do extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* obteve-se 258 mg da fração Flavonóides aglicona (FA), 749 mg da fração Flavonóides glicosilados (FG) e 982mg da fração Flavonóides glicosilados + Flavonóides aglicona + Isocumarinas (ISO). A partir deste dado foi feito um cálculo de quantos miligramas de cada fração seria equivalente a 500 mg do extrato (menor dose efetiva). Uma curva de 3 doses foi estabelecida para cada fração.

B. Indução de úlcera por Etanol absoluto (Morimoto *et al.*, 1991)

Este modelo foi realizado como descrito anteriormente. Todas as frações foram submetidas a este modelo experimental.

III.5. TESTES ANTIOXIDANTES “*IN VIVO*”

Após os animais terem sido submetidos ao modelo de Etanol absoluto, os estômagos foram removidos, lavados com salina e raspados para coleta de amostras. As amostras após coletadas foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos com 1ml de solução tampão fosfato tamponado (PBS), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-80°C). Para as dosagens bioquímicas, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 12.000 rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi aproveitado.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando como padrão albumina bovina.

Danos oxidativos de Membrana

A. Determinação da Peroxidação lipídica (Ohkawa *et al.*, 1979)

O homogenato de tecido estomacal foi misturado a KCl (0,15M) na proporção de 1:10, v/v: 1ml de raspado: 10ml de KCl. Aliquotou-se 0,5ml do sobrenadante deste homogenato e adicionou-se: 0,2ml de SDS (8,1%), 1,5ml de ácido acético (20%, pH=3.5, ajustado com NaOH), 1,5ml de ácido tiobarbitúrico (0,8%, p/v) e água destilada até que se completasse 4ml. Colocou as amostras em banho-maria, à temperatura de 95°C, por 1 hora. Após o resfriamento das amostras, adicionou-se 1ml de água destilada + 5ml da mistura de n-butanol + piridina (15:1, v/v), fechou-se os tubos e agitou-se por 1 minuto, e finalmente centrifugou-se a amostra a 2600g, por 10 minutos. A absorbância da capa orgânica foi determinada a 532 nm. Os valores foram expressos em pmol TBARS/mg proteína.

B. Determinação de grupamentos sulfidrila (Faure & Lafond, 1995)

As amostras foram centrifugadas (12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos) e o sobrenadante diluído (1:10) em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH=7.4). A seguir, fez-se a leitura da absorbância de 100µl da amostra, acrescidos de 100 µl de solução de Tris (1,0mM) e EDTA (0,02mM), a 412 nm (A1). Após esta leitura adicionou-se 20µl de ácido 5,5 ditiobis (2-nitrobenzóico) diluído em metanol (DTNB – 0,01mM) e realizou-se nova leitura (A2), a 412 nm, decorridos 15 minutos de reação, para determinação de grupamentos sulfidrila não protéico (GSH). A concentração de grupamento sulfidrila (tiol) é dada por $(A1 - A2) \times 1,57$.

Atividade Enzimática

C. Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) (Yoshikawa *et al.*, 1993)

O homogenato de tecido estomacal foi diluído em tampão fosfato (1:10). Em 100 µl desta solução adicionou-se 50 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (0,25 mM), 20 µl de Glutathione Reduzida (GSH) (10 mM), 20 µl NADPH (4mM), 10 µl (1 U) de enzima glutathione redutase em PBS, pH 7.8. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 365 nm. Os resultados foram expressos em pmol/minuto/mg proteína.

D. Determinação da atividade da Glutathione Redutase (GR) (Carlberg & Mannervik, 1985)

A atividade desta enzima foi determinada seguindo-se espectrofotometricamente a oxidação de NADPH à 340 nm. A reação enzimática é constituída de 100 µl do homogenato previamente diluído em tampão fosfato (1:10), 50 µl de tampão fosfato (1M), pH=7, 10 µl de EDTA (0,2 mM), 20 µl de GSSG (1 mM) e 20 µl de NADPH (0,1mM). O consumo de NADPH foi determinado pela diminuição da absorbância à 340 nm. Os resultados foram expressos em pmol/minuto/mg proteína.

E. Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) (Krawisz *et al.*, 1984)

A atividade da MPO foi medida adicionando-se a 10 µl da amostra, 290 µl de tampão fosfato de sódio a 50 mM (pH 7.4) contendo 0,167 g/l de dihidrocloro o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 460 nm, a qual foi realizada entre 1 e 10 minutos. Os resultados foram expressos em U/g proteína.

III.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste de Dunnett ou Tukey-Kramer quando o número de grupos era maior que 2. No caso da análise entre dois grupos, recorreu-se ao teste "t" de Student não pareado (unpaired t test). A significância mínima considerada foi de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Extrato metanólico de *E. ligulatum* escapos (EELe) e capítulos (EELc)

A. Triagem Hipocrático e Toxicidade aguda

O estudo de toxicidade aguda pré-clínica deve indicar qual o grau de confiança a ser depositado em um medicamento a ser administrado à espécie humana. Os resultados apresentados no ensaio do extrato bruto dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc), são extremamente importantes, pois não mostrou indícios de toxicidade aguda. A administração da dose de 5000 mg/Kg do EELc, avaliados tanto em camundongos machos e fêmeas, não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados (dados não apresentados) quando comparados aos animais do grupo controle que receberam somente salina. O monitoramento diário do peso dos animais não indicou variação significativa em relação ao grupo controle (salina). Não ocorreu morte seguida à administração, nem durante o período de observação e pesagem (14 dias pós-tratamento) (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única (5000 mg/Kg) do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc).

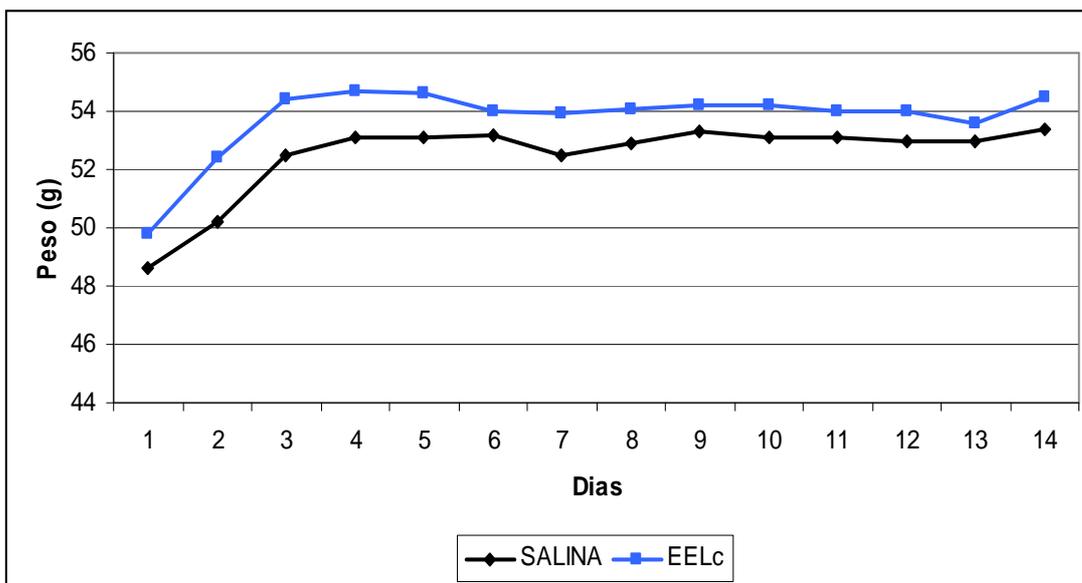
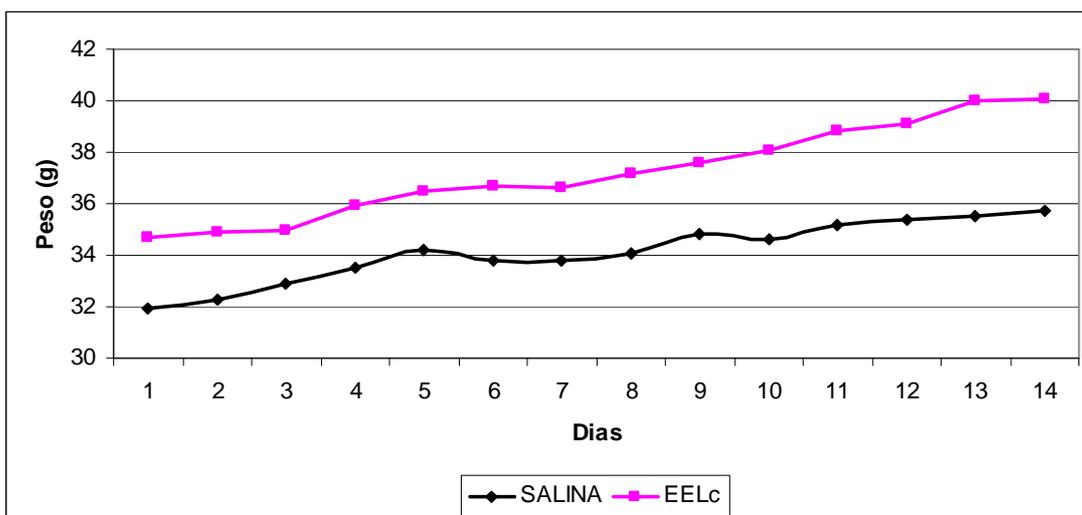


Figura 5 - Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratadas com dose única (5000 mg/Kg) do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc).



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. Após a realização do teste “t” de Student não pareado, verificou-se a não existência de diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da administração aguda (5000 mg/Kg) do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos e fêmeas.

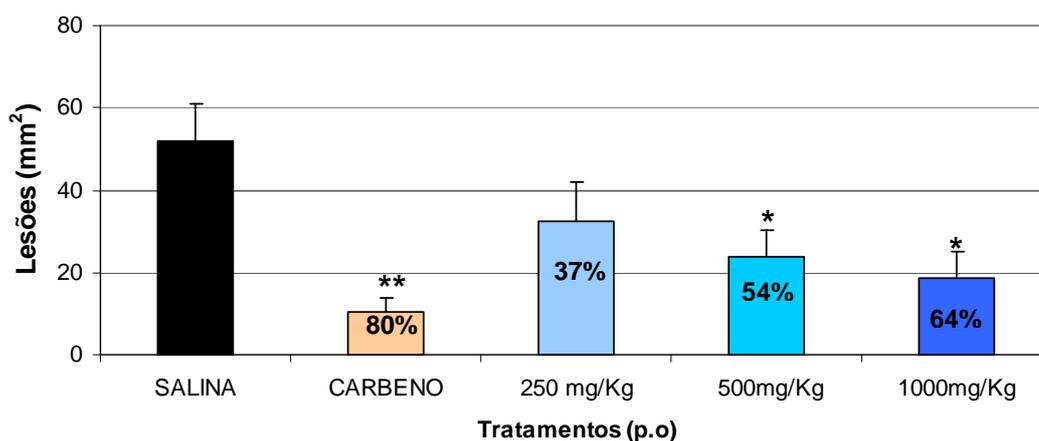
Sexo	Tratamento (p.o.)	Fígado	Coração	Pulmões	Rins	Baço
♂	Salina	12,62 ± 0,35	3,87 ± 0,05	4,39 ± 0,06	6,35 ± 0,11	3,27 ± 0,12
	EELc	12,44 ± 0,30	3,85 ± 0,04	4,15 ± 0,05	6,44 ± 0,15	3,39 ± 0,12
♀	Salina	12,78 ± 0,13	3,98 ± 0,07	4,70 ± 0,09	5,65 ± 0,05	3,53 ± 0,09
	EELc	12,00 ± 0,35	4,13 ± 0,10	4,57 ± 0,10	5,41 ± 0,10	3,72 ± 0,13

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformado em arcoseno (N=10). Valores expressos em média (arcoseno) ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: teste “t” não pareado.

B. Modelo de indução de úlcera por HCl/etanol

O EELc apresentou significativo efeito antiulcerogênico nas doses de 500 e 1000 mg/Kg, obtendo-se gastroproteção de 54% e 64%, em relação aos animais tratados com salina. A menor dose do extrato (250 mg/Kg) apresentou redução das lesões gástricas frente ao controle negativo (37%), porém não expressou efeito de importância estatística (Figura 6).

Figura 6 - Efeito da carbenoxolona (Carbeno) e do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol em camundongos.

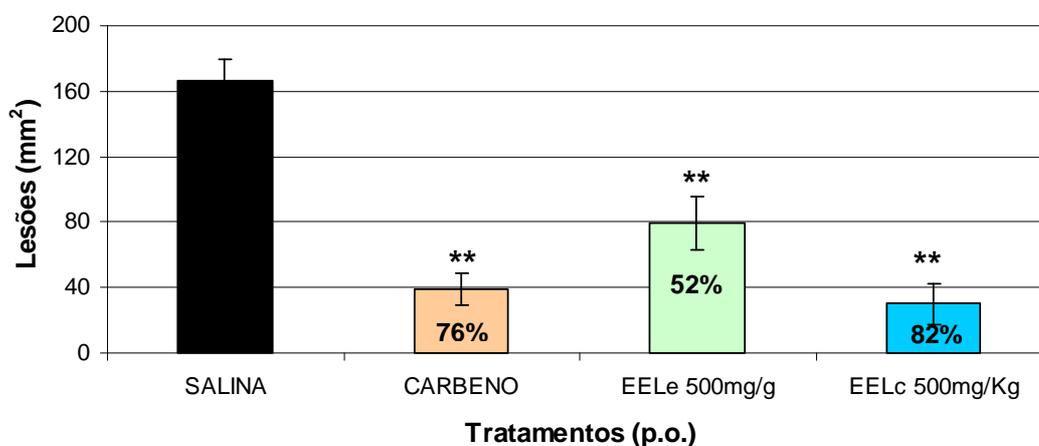


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett . * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina

C. Indução de úlcera por Etanol absoluto

O resultado obtido mostra que na dose de 500 mg/Kg o EELc apresentou melhor efeito gastroprotetor em relação ao grupo tratado com o veículo promovendo 82% de proteção. Em contrapartida, o grupo tratado com EELe exerceu somente 52% de proteção frente às lesões induzidas por etanol. Na triagem fitoquímica dos dois extratos, aquele extrato oriundo dos capítulos mostrou-se quantitativamente mais rico em flavonóides, quando comparado ao extrato de escapos. Diante destes resultados, biológico e fitoquímico, optou-se por dar prosseguimento somente com o estudo do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) (Figura 7).

Figura 7 – Efeito da carbenoxolona (Carbena), EELc e EELe no modelo indução de úlcera por Etanol absoluto em ratos.

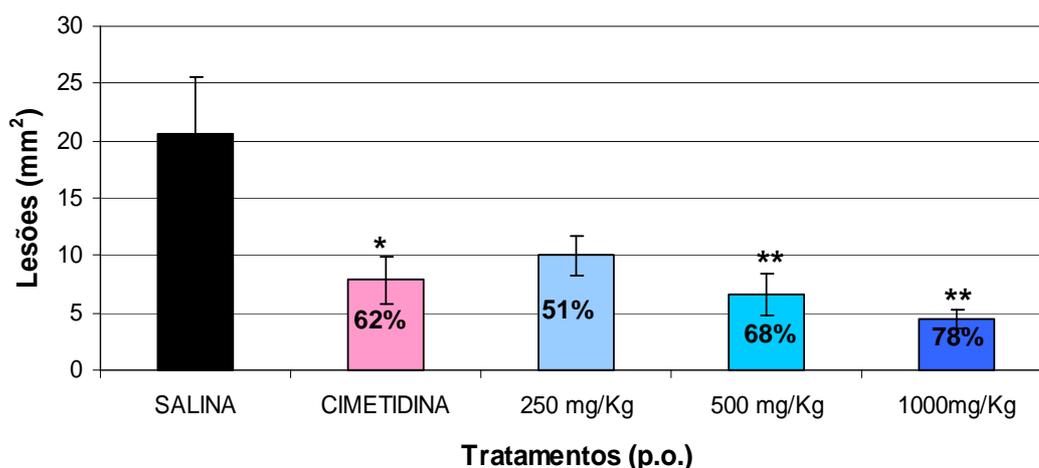


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

D. Indução de úlcera por DAINE (piroxicam)

Neste modelo, o EELc apresentou significativo efeito gastroprotetor nas doses de 500 e 1000 mg/Kg, obtendo-se 68% e 78% de proteção em relação ao grupo tratado com o veículo. Já o grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) conferiu uma proteção de 62%. A dose de 250 mg/Kg apresentou tendência em diminuir a média das lesões, embora não tenha apresentado uma diminuição significativa, obtendo-se 51% de proteção em relação ao grupo controle negativo (Figura 8).

Figura 8 - Efeito do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de indução de úlcera por Piroxicam em camundongos.



Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett . * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

E. Úlcera induzida pela ligadura de piloro e Avaliação dos parâmetros do suco gástrico

A análise da Tabela 2 – referente aos valores de concentração de íons H⁺, pH e volume do conteúdo gástrico - permite afirmar que o EELc (500 mg/Kg) não alterou estes parâmetros de maneira significativa, seja pela administração do extrato pela via oral ou intraduodenal.

Tabela 2 – Efeito da administração oral ou intraduodenal do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) sobre o pH, volume gástrico e concentração de H⁺ no modelo de ligadura de piloro em camundongos.

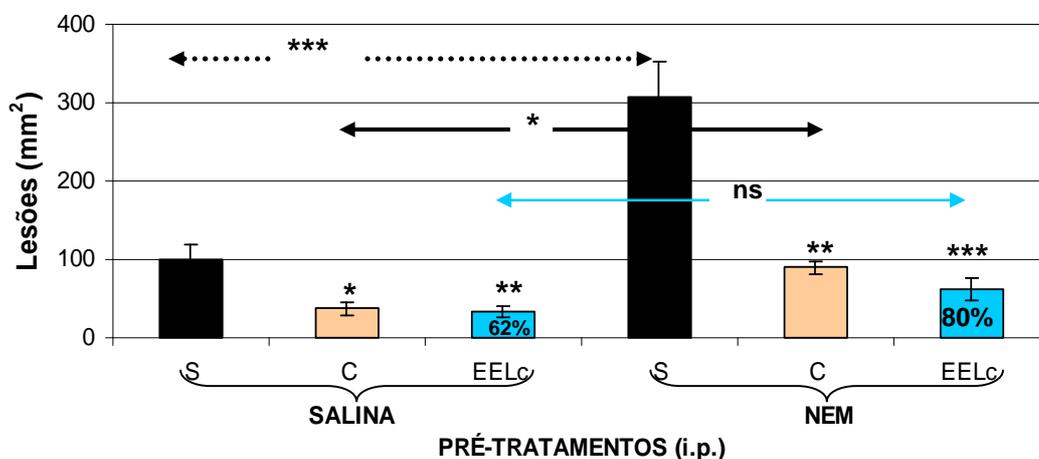
<i>Via</i>	<i>Tratamentos</i>	<i>[H⁺]</i> <i>(mEq/ mL/ 4h)</i>	<i>pH</i> <i>(unidades)</i>	<i>Volume conteúdo</i> <i>gástrico (mL)</i>
Oral	Salina	8,19 ± 0,71	3,22 ± 0,40	0,82 ± 0,10
	Cimetidina	5,30 ± 0,74 *	4,00 ± 0,59	1,10 ± 0,17
	EELc	9,76 ± 0,95	2,77 ± 0,22	0,71 ± 0,15
Duodenal	Salina	4,93 ± 0,32	3,37 ± 0,26	0,85 ± 0,09
	Cimetidina	3,21 ± 0,31 *	5,00 ± 0,61 *	0,87 ± 0,11
	EELc	5,67 ± 0,57	3,00 ± 0,32	0,79 ± 0,07

Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * p < 0,05.

F. Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

A pré-administração da droga NEM intraperitonealmente (i.p.) provocou aumento das lesões gástricas em comparação aos grupos pré-administrados com salina pela mesma via. É possível verificar essa diferenciação em termos estatísticos pelas flechas transversais traçadas na figura 9 de maneira a comparar os pré-tratamentos com NEM e salina (i.p.). Em ambos os casos, o tratamento com EELc apresentou significativa proteção ao promover 62% de redução das lesões no tratamento com salina (i.p.) e de 80% nos animais pré-tratados com NEM. A depleção dos grupamentos sulfidrílicos pelo pré-tratamento com NEM não foi capaz de reduzir o efeito gastroprotetor do EELc.

Figura 9 - Efeito do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) frente ao depletor de grupamentos sulfidrílicos endógenos (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol em ratos.



Tratamentos (p.o.)

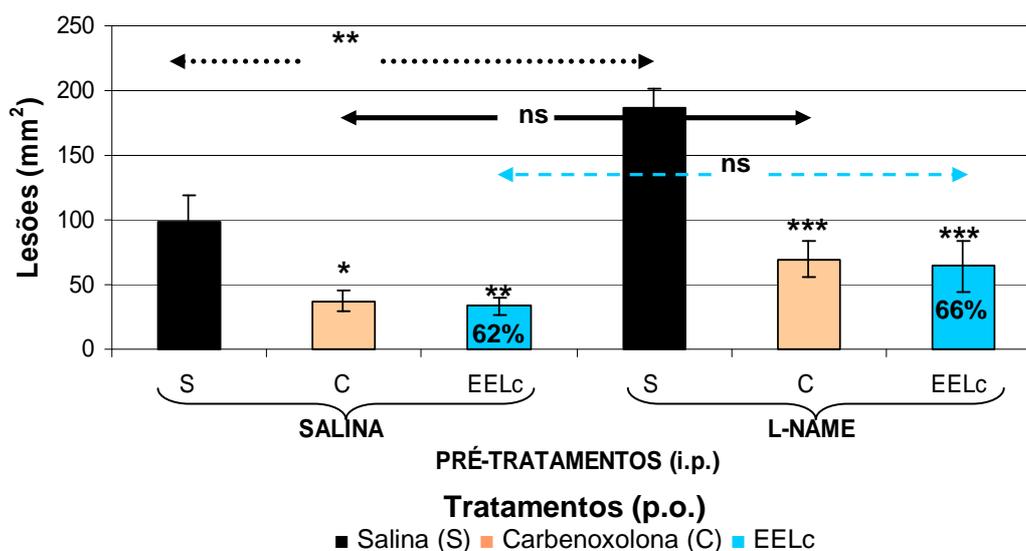
■ Salina (S) ■ Carbenoxolona (C) ■ EELc

Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Não significativo (ns) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao respectivo grupo tratado com salina (p.o.).

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

A droga L-NAME pré-administrada intraperitonealmente promoveu um aumento das lesões gástricas em todos os grupos (salina, carbenoxolona ou EELc) em relação aos grupos pré-tratados somente com salina. No entanto, não ocorreu diferença estatística entre os grupos que receberam carbenoxolona (controle positivo) ou EELc em relação ao grupo controle que foi submetido ao tratamento com o veículo (Figura 10).

Figura 10 - Efeito do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) frente ao inibidor de NO endógeno (L-NAME) em modelo de úlcera induzida por Etanol em ratos.

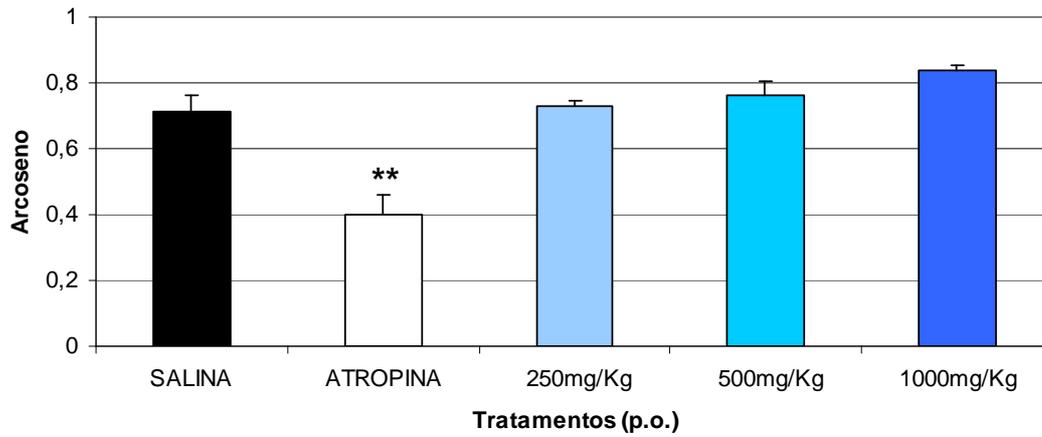


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Não significativa (ns) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao respectivo grupo tratado com salina (p.o.).

H. Determinação da motilidade intestinal

Neste modelo não foi possível observar alterações estatisticamente significantes sobre o trânsito intestinal nos grupos de animais tratados com EELc nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg (Figura 11).

Figura 11 – Efeito do EELc sobre a motilidade intestinal de camundongos



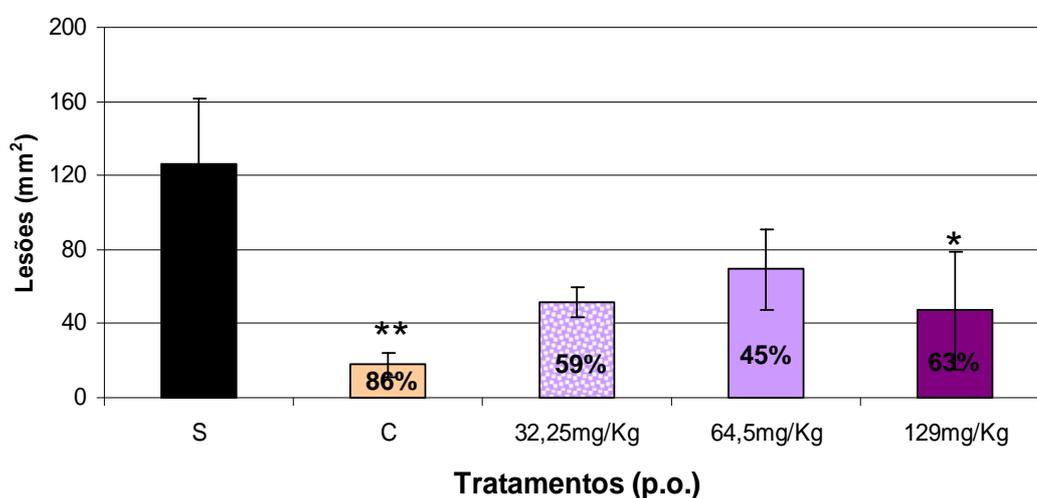
Dados da razão da distância percorrida pelo carvão ativado (marcador) dividido pelo comprimento total do intestino delgado e transformado em arcosseno. Valores expressos em média (arcosseno) ± erro padrão da média. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett ** $p < 0,01$.

IV.2. Fração de flavonóides agliconas (FA) Fração de flavonóides glicosilados (FG) Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + isocumarina (ISO)

I. Indução de úlcera por Etanol absoluto

O resultado obtido mostra que apenas a dose de 129 mg/Kg de FA, correspondente a sua concentração no extrato bruto na dose de 1000 mg/Kg, apresentou efeito gastroprotetor, com promoção de 63% de proteção em relação ao grupo controle negativo (salina). As doses de 32,25 mg/Kg e 64,5 mg/Kg apresentaram tendência em diminuir a média das lesões, promovendo 59% e 45% de proteção, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Efeito da salina (S), carbenoloxona (C) ou fração de flavonóides agliconas (FA) obtida do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatun* no modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto em ratos.

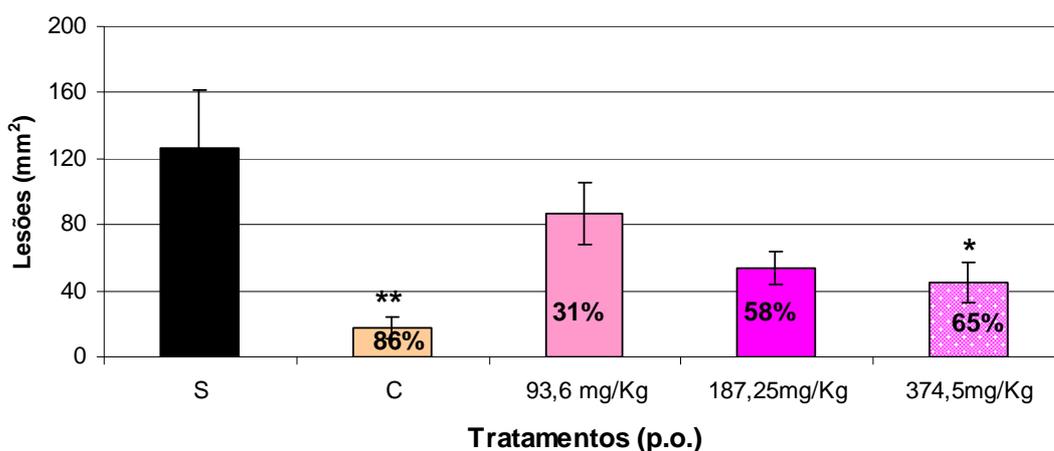


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

J. Indução de úlcera por Etanol absoluto

O resultado obtido mostra que apenas a dose de 374,5 mg/kg de FG, correspondente a 1000 mg/Kg do extrato bruto, apresentou efeito gastroprotetor, com promoção de 65% de proteção em relação ao grupo controle negativo (salina). As doses de 93,6 e 187,25 mg/Kg apresentaram tendência em reduzir a média das lesões, promovendo 31% e 58% de proteção, respectivamente, porém sem relevância estatística (Figura 13).

Figura 13 – Efeito da salina (S), carbenoxolona (C) ou fração de flavonóides glicosilados (FG) obtida do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto em ratos no modelo indução de úlcera por Etanol absoluto em ratos.

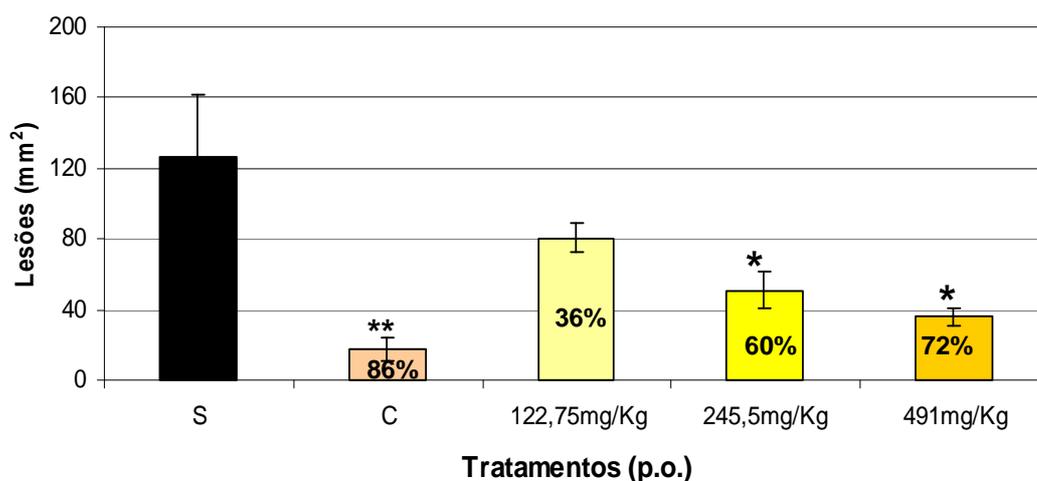


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

K. Indução de úlcera por Etanol absoluto

O resultado obtido mostra que as doses de 245,5 mg/Kg e 491 mg/Kg de ISO, correspondente a 500 e 1000 mg/Kg do extrato bruto (EELc) respectivamente apresentaram efeito gastroprotetor, com promoção de 60% e 72% respectivamente de proteção em relação ao grupo controle negativo (salina). A dose de 122,75 mg/Kg apresentou tendência em diminuir a média das lesões, promovendo 36% de proteção, porém sem relevância significativa (Figura 14).

Figura 14 – Efeito da salina (S), carbenoxolona (C) ou fração de flavonóides glicosilados+isocumarinas+flavonóides agliconas (ISO) obtida do extrato metanólico dos capítulos de *E. ligulatum* no modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto em ratos.



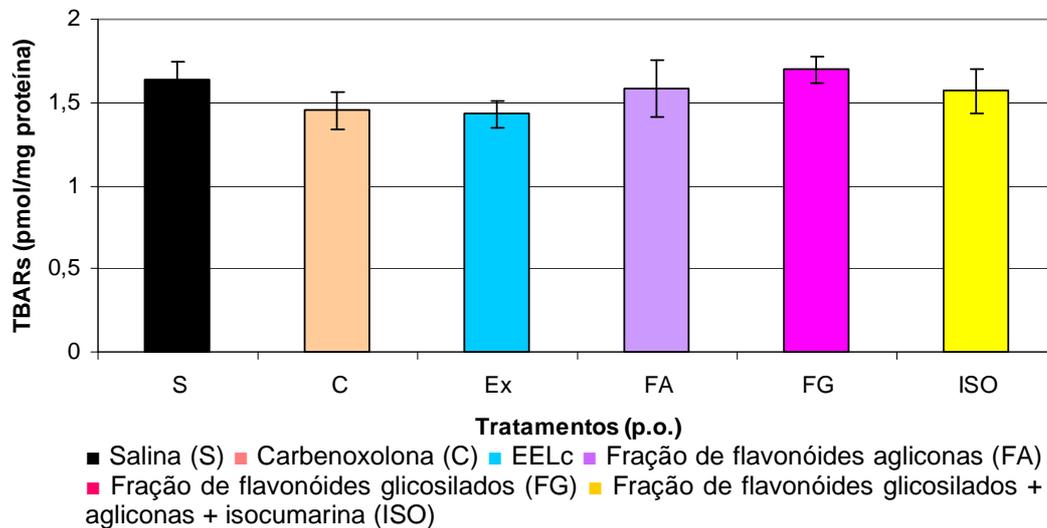
Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina.

IV.3. Atividade antioxidante “in vivo”

L. Determinação da Peroxidação lipídica

No modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto, nenhum dos pré-tratamentos foi capaz de inibir a peroxidação lipídica em relação ao grupo tratado com salina, como mostra a Figura 15.

Figura 15 - Efeito do EELc e frações sobre a peroxidação lipídica (LPO) em mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera Etanol absoluto.

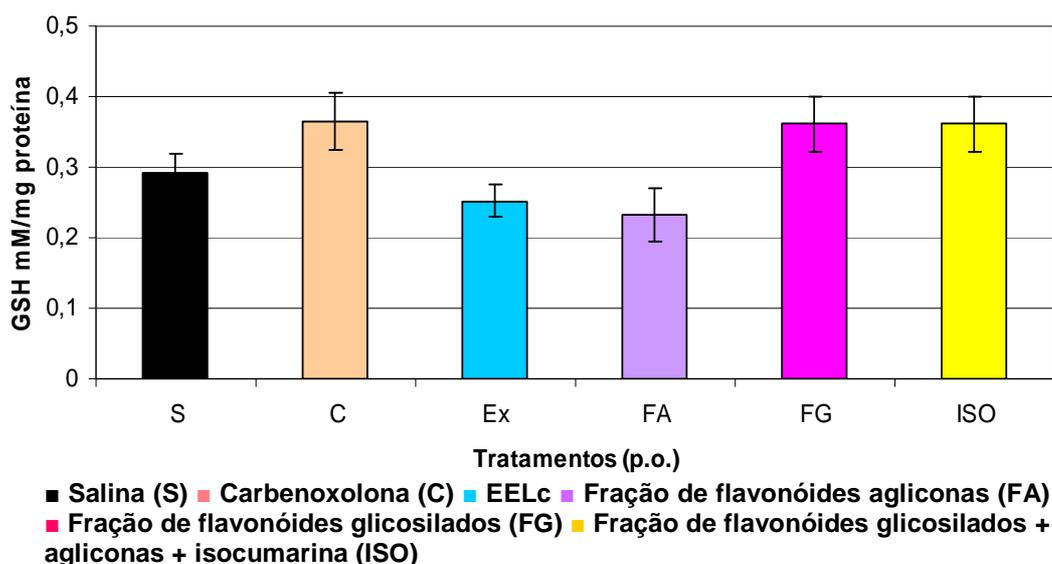


Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett ($p > 0,05$)

M. Determinação do Grupamento Sulfidrila

O pré-tratamento com as frações de flavonóides glicosilados e flavonóides glicosilados + agliconas + isocumarinas, bem como a droga carbenoxolona preveniram a depleção dos compostos sulfidrílicos (GSH) provocado pelo etanol. Porém, esta prevenção não apresenta significância estatística. O pré-tratamento com o extrato (EELc) e com a fração de flavonóides agliconas (FA) já demonstra uma depleção de tais compostos, superior ao grupo pré-tratado com salina. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (Figura 16).

Figura 16 - Compostos sulfidrílicos na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto

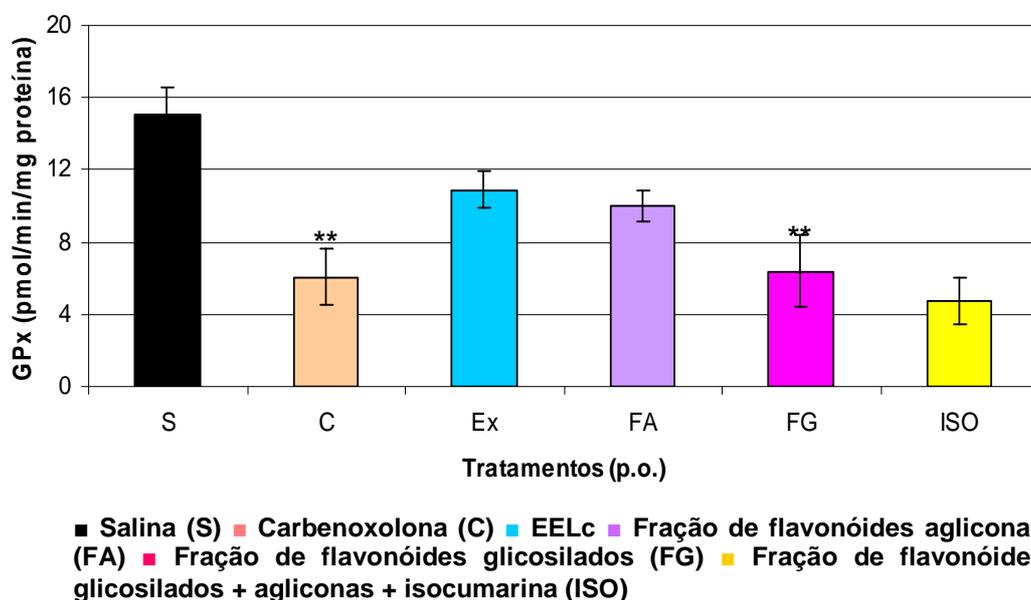


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett ($p > 0,05$).

N. Determinação da atividade da GPx e GR

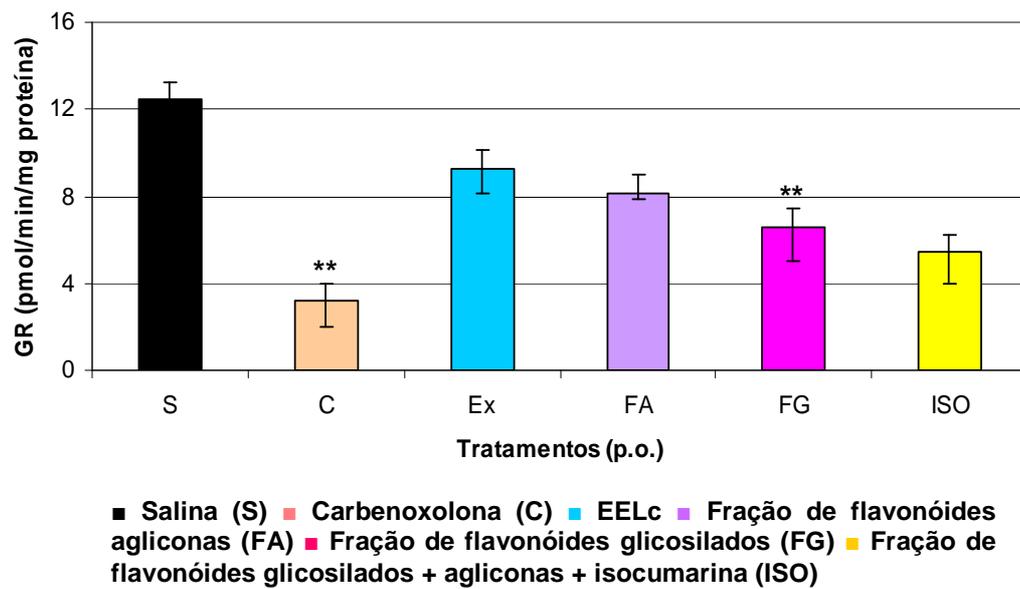
Os dados mostram que os pré-tratamentos com Carbenoxolona, Fração de flavonóides glicosilados (FG) e Fração de flavonóides glicosilados + agliconas + isocumarinas (ISO) promoveram uma redução estatisticamente significativa tanto nos valores de GPx (Figura 17) como de GR (Figura 18).

Figura 17 - Efeito do EELc e frações sobre a atividade da enzima GPx na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto.



Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$

Figura 18 - Efeito do EELc e frações sobre a atividade da enzima GR na mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera por Etanol absoluto.

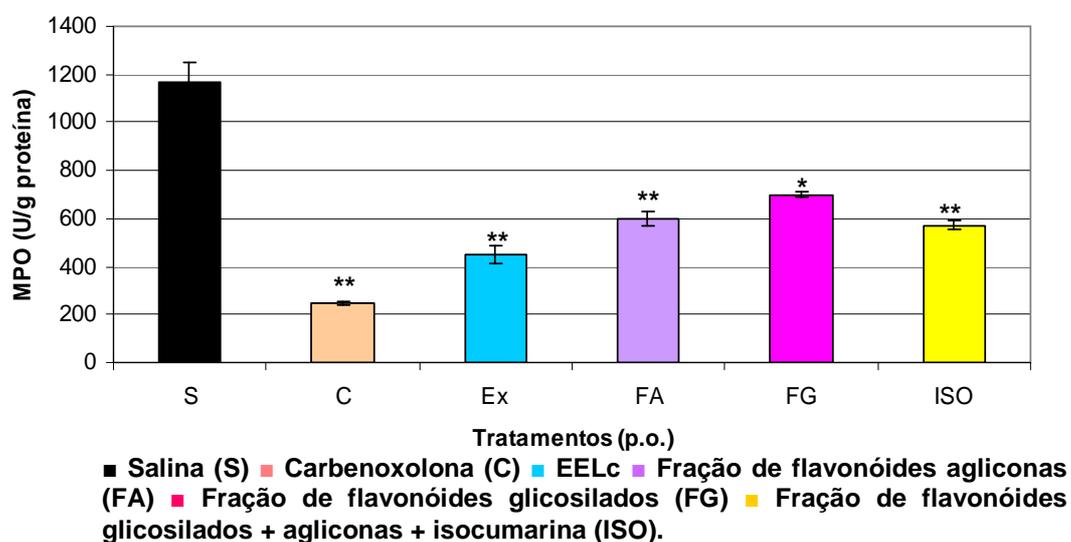


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$

O. Determinação da atividade da MPO

Neste modelo todos os pré-tratamentos (Carbenoxolona, EELc, FA, FG, e ISO) promoveram diminuição estatisticamente significativa na atividade da enzima MPO comparados ao grupo controle tratado com salina (Figura 19).

Figura 19 - Efeito do EELc e frações sobre a atividade da MPO em mucosa gástrica de ratos submetidos ao modelo de indução de úlcera Etanol absoluto.



Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

V. DISCUSSÃO

O extrato dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) não apresentou efeito tóxico agudo aparente, com a administração de 5000 mg/Kg (via oral). De acordo com Souza-Brito (1996) em experimentos de validação dos efeitos antiulcerogênicos com plantas medicinais, pressupõe-se que, para a dose de 1000 mg/Kg do extrato bruto, exista uma correspondência de 10% de concentração de substâncias ativas em sua composição, como a cimetidina (100 mg/Kg), ou 2% para similares ao omeprazol (20 mg/Kg) e de até 0.1% para aquelas semelhantes ao misoprostol (1 mg/Kg). A partir desses dados, pode-se concluir que em 5000 mg/Kg de extrato bruto haveria um aumento de 5 vezes da concentração desses compostos ativos teóricos presentes no extrato em relação a maior dose utilizada em nosso experimento (1000 mg/Kg). Porém, não se pode dizer a partir dos dados deste trabalho, que o extrato não cause efeito tóxico em altas concentrações, já que a relação de concentração e existência das substâncias ativas é hipotética. Mas, se a concentração teórica de compostos ativos mostra-se aumentada, a de compostos tóxicos também aumenta, o que certamente poderia promover algum efeito tóxico visível na dose de 5000 mg/Kg. Entretanto, nenhum efeito tóxico agudo foi observado neste trabalho, tanto em animais fêmeas quanto machos. Considerando que a população geralmente faz uso de veículos polares para a preparação de suas plantas medicinais, existe a necessidade de estudos complementares de toxicidade crônica desta espécie para que se possa garantir a segurança de seu uso e a ausência de toxicidade em humanos.

Os modelos experimentais realizados para a avaliação dos efeitos gastroprotetores foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos, conhecidos na indução de lesões gástricas. A formação de lesões úlceraivas em modelos experimentais, assim como as decorrentes em humanos, envolvem a explicação clássica, de que elas são provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores e lesivos da mucosa gástrica (Maity *et al.*, 2003). Esse desequilíbrio pode ser induzido de diversas maneiras, seja por mecanismos de

atuação nervosos (estimulação vagal), substâncias químicas ou pela realização de procedimentos cirúrgicos.

Os modelos de indução de úlceras por HCl/Etanol e Etanol absoluto promovem as lesões necróticas de maneira multifatorial na mucosa gástrica. O etanol é capaz de alcançar a mucosa através do rompimento da barreira mucobicarbonato e suas ações celulares refletem em ruptura da parede dos vasos sanguíneos, sendo as hemorragias a consequência das lesões gástricas observadas nestes modelos (Mincis *et al.*, 1995). Esses efeitos provavelmente se devem a ações de lipoperoxidação, formação de radicais livres, estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade e despolarização da membrana mitocondrial que precedem a morte celular (Hirokawa, 1998; Bagchi *et al.*, 1998; Repetto & Llesuy, 2002).

Os resultados do experimento de úlcera induzida por HCl/Etanol mostraram significativo efeito gastroprotetor dos extratos EELe e EELc nas doses 500 e 1000 mg/Kg. A menor dose dos extratos testada (250 mg/Kg) apresentou redução das lesões gástricas frente ao grupo controle negativo, porém não expressou efeito de importância estatística. Observou-se uma relação de dependência da dose com o efeito farmacológico envolvido neste teste. Os resultados obtidos com EELe neste modelo (dados prévios do laboratório) foram similares aos de EELc. Na investigação fitoquímica dos extratos, EELc mostrou uma maior diversidade e ao mesmo tempo, uma maior quantidade de flavonóides em relação ao EELe, quando analisados por CCD (cromatografia em camada delgada comparativa).

Os flavonóides são substâncias polifenólicas amplamente encontradas na natureza. Apresentam várias atividades farmacológicas reportadas na literatura. Entre estas atividades se destaca a atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade antiinflamatória, atividade antitumoral (Harborne & Williams, 2000). A atividade antiulcerogênica que os flavonóides exercem, está diretamente relacionada à capacidade que eles têm de seqüestrar os radicais livres da mucosa estomacal. Com a finalidade de avaliar qual extrato possui efeito gastroprotetor superior, foi realizado o experimento de indução de úlcera por

Etanol absoluto utilizando a dose 500 mg/Kg para ambos extratos, partindo da menor dose efetiva nos experimentos anteriores com o modelo de indução de úlcera por HCl/etanol. Neste modelo ambos os extratos apresentaram efeito gastroprotetor na dose testada (500 mg/Kg), sendo que a gastroproteção de *E. ligulatum* foi maior para o extrato metanólico dos capítulos (EELc). Considerando os melhores resultados obtidos com EELc no modelo de Etanol absoluto, os demais modelos experimentais foram desenvolvidos somente com este extrato.

As úlceras gástricas causadas por drogas antiinflamatórias não-esteroidal envolvem mecanismos de inibição das ciclooxigenases I e II, de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas. As prostaglandinas E2 e I2 atuam na síntese de muco e bicarbonato, na regulação da secreção ácida e do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (Curtis *et al.*, 1995; Halter *et al.*, 2001). Segundo Suzuki *et al.* (2000), outros fatores como a hipermotilidade gástrica e infiltração ou ativação de neutrófilos estariam envolvidos com os processos iniciais de formação das lesões. A redução dos níveis de prostaglandinas compromete a barreira mucosa que é composta de muco e bicarbonato e facilita a formação de lesões causadas pelas secreções gástricas (ácido clorídrico mais enzimas). No experimento de úlceras induzidas por droga antiinflamatória, novamente foi evidenciado a capacidade gastroprotetora de EELc (500 e 1000 mg/Kg). A dose de 250 mg/Kg apresentou tendência em diminuir a média das lesões, embora não tenha apresentado uma diminuição significativa em relação ao grupo controle negativo. Observou-se também a relação da dependência da dose com o efeito farmacológico envolvido neste teste.

A constatação da atividade antiulcerogênica do extrato no controle das lesões gástricas nos modelos anteriormente descritos, levou a realização de experimentos que possibilitassem explicar possíveis mecanismos pelo qual EELc atua. Foram executados experimentos que visavam verificar o envolvimento da planta sobre: a secreção ácida gástrica (ligadura de piloro), participação do óxido nítrico (NO), envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos não protéicos (SH), a motilidade intestinal.

A atividade anti-secretora de EELc foi analisada no modelo de ligadura de piloro. Ao proceder a ligadura de piloro, as ulcerações são formadas em decorrência da hipersecreção gástrica. Acredita-se que esta hipersecreção ácida seja estimulada por reflexo vago-vagal, em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido à obstrução do piloro. Este procedimento estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gástrico é estimular as células parietais a secretar HCl (Baggio *et al.*, 2003). As diferenças nas formas de administração dos tratamentos se devem ao fato de possibilitarem a observação dos efeitos local (via oral) ou sistêmico (via intra-duodenal) dos extratos. Os parâmetros avaliados foram: concentração de íons H⁺, pH e volume do conteúdo gástrico. O extrato de *E. ligulatum* não produziu alterações significativas em nenhum dos parâmetros citados. Portanto, o mecanismo pelo qual o extrato protege a mucosa gástrica não envolve inibição da secreção ácida gástrica. Na dose testada (500 mg/Kg), EELc mostrou um aumento na concentração do íon H⁺ e diminuição do pH. Tal fato pode ser explicado pela presença de flavonóides e isocumarinas isolados no extrato metanólico desta planta. Os flavonóides possuem várias hidroxilas fenólicas, sendo que estas substâncias apresentam caráter ácido.

A atual terapêutica para o tratamento de úlceras pépticas consiste no emprego de fármacos com atividade anti-secretora. Esta estratégia, embora muito eficaz, pode causar quadros de hipergastrinemia em usuários crônicos. Uma vez interrompido o tratamento, a hipergastrinemia é responsável por um efeito rebote na secreção de ácido gástrico (Kuipers & Meuwissen, 2000). A ausência de ação antissecretória é desejável, pois previne o crescimento microbiano e a hipergastrinemia em seus pacientes que fazem uso destas drogas de forma crônica. A atividade antiulcerogênica de certas plantas medicinais, não depende de mecanismos antissecretórios (Lamberts *et al.*, 1993).

Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (Cho, 2001; Kwiecien *et al.*, 2002; Ancha *et al.*, 2003). Porém, o papel do NO na

regulação e manutenção das funções da mucosa gástrica ainda não foi totalmente conhecido (Khattab *et al.*, 2001). Os grupamentos sulfidrílicos participam da proteção da mucosa pela ligação aos radicais-livres (exercem um efeito antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco de maneira a impedir a sua dissociação (Avila *et al.*, 1996). Esses grupamentos estão presentes na glutatona, uma substância endógena que, em sua forma reduzida, tem importância na redução do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e se complexar com compostos eletrofílicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos (Klaassem *et al.*, 1985; Hayes & McLellan, 1999; Kimura *et al.*, 2001). Apesar de se conhecer o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na proteção da mucosa em experimentos de indução de úlcera por etanol, os mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos (Hiraishi *et al.*, 1999). Os resultados dos experimentos com o inibidor de NO (L-NAME) e de grupamentos sulfidrílicos (NEM) mostram que o efeito gastroprotetor do EELc se manteve independentemente da administração dos inibidores, indicando, portanto que o EELc atua de maneira independentemente destas vias.

A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico. De acordo com Suzuki *et al.* (2000) a hiperomotilidade gástrica é de grande importância no processo inicial de formação de lesões em modelo de úlcera por DAINÉ. Ao se determinar a ação de EELc sobre a motilidade intestinal, não foram observadas alterações dos padrões normais de velocidade do trânsito, o que indica a não participação desse tipo de mecanismo inespecífico na atividade do extrato.

Com o intuito de investigar quais compostos são responsáveis pela ação farmacológica do EELc, avaliamos as diferentes frações orgânicas obtidas deste extrato. As doses utilizadas para avaliar a atividade gastroprotetora das frações partiram das respectivas porcentagens de cada fração presente em 500 mg (menor dose efetiva) de extrato bruto (EELc). No modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, que foi o modelo experimental em que o EELc exerceu sua melhor ação, avaliamos a ação das frações de flavonóides agliconas

(FA), flavonóides glicosilados (FG) e flavonóides glicosilados + isocumarinas + flavonóides agliconas (ISO). Estas frações possuem uma atividade gastroprotetora inferior a atividade do extrato bruto (EELc). O que sugere que o efeito gastroprotetor do extrato (EELc) se dá pelo sinergismo entre os compostos, e não pela ação de determinados compostos isolados.

O método baseado no reagente DPPH (2,2 di-fenil-2-pieryl-hidrazyl) é utilizado para analisar a atividade seqüestradora de radicais livres encontrada em extratos vegetais contendo polifenóis e aminas aromáticas, sendo uma técnica para triagem química de material biológico com potencial atividade antioxidante farmacológica (Ancerewicz *et al.*, 1998). O ensaio com o reagente DPPH, realizado pela equipe do laboratório de química da UNESP-Araraquara demonstrou que a capacidade seqüestradora de radicais livres dos extratos e das frações dos capítulos de *E. ligulatum* (EELc) foi positiva, sendo esta superior para o extrato em relação às frações. Estes resultados, portanto, nos indicou um provável mecanismo de ação desta espécie.

Os antioxidantes, derivados dos compostos fenólicos, funcionam como seqüestradores de radicais livres e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Soares, 2002). Certos flavonóides, ou compostos com propriedades similares a dos flavonóides, têm demonstrado atividade antiulcerogênica por proteger a mucosa em alguns modelos de indução de úlcera gástrica (Alarcón De La Lastra *et al.*, 1992). Existem também evidências do efeito antiinflamatório e antioxidante de certos flavonóides (Goel *et al.*, 1988).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão relacionadas à formação de lesões gástricas causadas por diferentes agentes, como: álcool, estresse, infecção por *H. pylori* e uso de DAINE (Kwiecien *et al.*, 2002).

Os danos gerados no processo de indução de úlcera por álcool (etanol absoluto) são multifatoriais, ou seja, podem se dar por diferentes mecanismos, como: ação direta do etanol sobre a mucosa gástrica, liberação de substâncias vasoativas, diminuição do muco, interferência na produção de cisteína, aumento

na respiração celular devido à produção de acetaldeído, com ativação do sistema xantina oxidase (Oates & Hakkinen, 1988; Cnubben *et al.*, 2001) Estes mecanismos de uma forma ou de outra, acabam desencadeando a liberação de radicais livres ou mesmo interferindo na ação do sistema antioxidante endógeno. A produção de radicais livres no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol se dá de forma indireta. Segundo Kim e colaboradores (2005) a produção de EROs desempenha um papel crucial no desenvolvimento de úlceras gástricas induzidas pelo etanol.

A geração de EROs no modelo de Etanol absoluto é evidenciado por aumento na peroxidação lipídica (LPO) da mucosa gástrica (Kahraman *et al.*, 2003) e depleção da glutathiona (GSH) (Bagchi *et al.*, 1998). A liberação do ânion superóxido (O_2^-) neste tipo de lesão pode estar relacionada à produção de acetaldeído, formado pela ação da álcool desidrogenase sobre o etanol. O acetaldeído serve como substrato para a xantina oxidase (enzima chave no metabolismo das purinas), a qual produz radicais livres (Hiraishi *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2004). A infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, também pode se configurar como fonte de EROs (La Casa *et al.*, 2000). O decréscimo na quantidade de GSH pode estar relacionado à sua oxidação por metabólitos tóxicos do etanol ou por sua ligação ao acetaldeído, sintetizado pela álcool desidrogenase ou, ainda, por uma diminuição em sua síntese (Bilici *et al.*, 2002). Os tratamentos com carbenoxolona, EELc, FA, FG e ISO não foram eficazes em impedir a peroxidação lipídica nem a depleção de GSH da mucosa gástrica submetido ao efeito do etanol. Embora os níveis de GSH tenham se mantido elevados nos grupos tratados com carbenoxolona, FG e ISO em relação ao grupo tratado com o veículo, as diferenças destes grupos em relação ao grupo que recebeu somente o veículo, não foi estatisticamente significativa.

O sistema enzimático de defesa antioxidante endógeno também é afetado pela administração do etanol diretamente na mucosa gástrica ao promover redução na atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (Rukkumani *et al.*, 2004). O ciclo "redox" da glutathiona desempenha importante papel para garantir a integridade da mucosa em exposição ao etanol. A

GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois, às custas da conversão da GSH a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GR (Ferreira & Matsubara, 1997). Com relação aos tratamentos com carbenoxolona, EELc, FA, FG e ISO foi observado uma queda na atividade das enzimas GPx e GR, quando comparadas aos animais tratados somente com o veículo. No entanto, as maiores quedas nas atividades de ambas as enzimas coincidem com os maiores níveis de GSH.

Os radicais livres estão envolvidos em várias afecções, dentre elas a úlcera gástrica (Fukawa *et al.*, 1983). Os neutrófilos são a maior fonte endógena de radicais livres na mucosa gástrica de humanos ou animais (Sakurai *et al.*, 2005). A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente dentro dos lisossomos dos neutrófilos. Uma vez nos tecidos, após estímulos pró-inflamatórios, os neutrófilos sofrem um processo de degranulação com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (armazenada nos grânulos azurófilos). A enzima MPO atua na presença do ânion superóxido e do ânion cloreto (Cl^-) para formar o ácido hipoclorídrico. O ácido hipoclorídrico apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo também lesivo para as células do tecido (Halliwell & Gutteridge, 2006). A mieloperoxidase pode ser usada como um índice de infiltração de neutrófilo nos tecidos (Krawisz *et al.*, 1984). Os tratamentos com carbenoxolona, EELc, FA, FG e ISO foram capazes de reduzir significativamente a atividade da MPO em relação aos animais tratados somente com o veículo, conferindo proteção à mucosa gástrica por prevenir a infiltração de neutrófilos e a resposta inflamatória local. Tal resultado indica uma importante atividade antiinflamatória gástrica destes compostos.

Nos modelos experimentais realizados, após a abertura dos estômagos, um denso revestimento com a coloração do extrato se apresentava aderido a parece da mucosa gástrica, o que sugere que em adição aos mecanismos antiinflamatórios, a formação de uma barreira física, impedindo que o agente lesivo agrida a mucosa pode contribuir para a ação gastroprotetora de EELc e das frações FA, FG e ISO.

VI. CONCLUSÃO

- 1- A análise dos resultados nos permite concluir que o extrato metanólico dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* apresenta atividade gastroprotetora frente aos agentes indutores de lesões gástricas mais comuns ao homem, tais como o etanol e as drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs);
- 2- O extrato não apresenta efeito tóxico agudo aparente tanto em machos quanto em fêmeas, frente às análises realizadas (comportamental, evolução do peso corporal e peso relativo dos órgãos);
- 3- O fracionamento do extrato demonstrou uma redução na ação gastroprotetora em comparação com o extrato bruto de forma que o sinergismo entre os compostos, provavelmente, seja o responsável pela ação gastroprotetora desta espécie e
- 4- O extrato bruto (EELc) e as frações (FA, FG e ISO) de *E. ligulatum* apresentam seu efeito gastroprotetor relacionado a inibição da atividade da enzima mieloperoxidase.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón de la Lastra, C.; López, A.; Motilva, V. *Gastroprotective and prostaglandin E₂ generation in rats by flavonoids of Dittrichia viscosa*. *Planta Medica*, 59, 497-501, 1993.
- Ancerewicz, J.; Migliavacca, E.; Carrupt, P.A.; Testa, B.; Bree, F.; Zini, R.; et al. *Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants*. *Free Radic Biol Méd*, 25 (1), 113-120, 1998.
- Ancha, H.; Ojeas, H.; Tedesco, D.; Ward, A.; Harty, R.F. *Somatostatin-induced gastric against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow*. *Regulatory peptides*, 110, 107-113, 2003.
- Arrieta, J.; Benitez, J.; Flores, E.; Castilho, C.; Navarrete, A. *Purification of gastroprotective triterpenoids from stem bark of Amphipterygium adstringens; roles of prostaglandins, sulphidryls, nitric oxide and capsaicin neurons*. *Planta Medica*, 69, 905-909, 2003.
- Avila, J.R.; Lastra, A.D.L.; Martín, M.J.; Motilva, V.; Luque, I.; Delgado, D.; Esteban, J.; Herrerias, J. *Role of endogenous sulphidryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats*. *Inflamm. Res.*, 45, 83-88, 1996.
- Bagchi, D.; Carryl, O.R.; Tran, M.X.; Krohn, R.L.; Bagchi, D.J.; Garg, A.; Bagchi, M.; Mitra, S.; Stohs, S.J. *Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate*. *J Appl Toxicol.*, 18(1), 3-13, 1998.
- Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Rieck, L.; Marques, M.C.A. *Gastroprotective effects of a crude extract of Baccharis illinita DC in rats*. *Pharmacological Research*, 47, 93-98, 2003.
- Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. *Drug discovery from medicinal plants*. *Life Sciences*, 78, 431-441, 2005.
- Bate-Smith, E.C. & Harborne, J.B. *Comparative biochemistry of the flavonoids. Quercetagenin and Patuletin in Eriocaulon*. *Phytochemistry*, 8, 1035-1037, 1969.

- Batista, M. L.; De Almeida, A. A.; Magri, L. P.; Toma, W.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. *Gastric Antiulcer of Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 328-332, 2004.
- Bauer, H.; Mark-Hermann, E. *Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. *Orthopade*, 32 (12), 1088-1099, 2003.
- Bicili, D.; Süleyman, H.; Banoglu, Z.N.; Kiziltunç, A.; Avci, B.; Çiftçioglu, A. et al. *Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect*. *Dig Dis Sci*, 47 (4), 856-861, 2002.
- Bradford, M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem*, 72, 248-254, 1976.
- Carlberg, I.; Mannervik, B. *Glutathione reductase*. *Methods Enzymol*, 113, 484-490, 1985.
- Chan, F.L.; Leung, W.K. *Peptic ulcer disease*. *Lancet*, 360, 933-941, 2002.
- Cho, C.H. *Current roles of oxide nitric in gastrointestinal disorders*. *Journal of physiology. Paris* 95, 253-256, 2001.
- Cnubben, N.H.P.; Rietjens, I.M.C.M.; Wortelbore, H.; Van Zanden, J.; Van Bladeren, P.J. *The interplay of glutathione related process in antioxidant defense*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 10, 141-152, 2001.
- Curtis, G.H.; ManNaughton, W.K.; Gall, D.G.; Wallace, J.L. *Intraluminal pH modulates gastric protaglandin synthesis*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 73, 130-134, 1995.
- Di Stasi, L. C.; Camuesco, D.; Nieto, A.; Vilegas, W.; Zarzuelo, A.; Galvez, J. *Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, as isocoumarin isolated from the capitula of Paepalanthus bromelioides, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis*. *Planta Med.* 70: 315-320, 2004.

- Faure, P.; Lafond, J.L. *Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation*. In *Analysis of free radicals in biological systems*. Ed. Verla Bostonp, 237-248, 1995.
- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.M. *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. *Rev Ass Méd Brasil* 43(1): 61-8, 1997.
- Firenzuoli, F.; Gori, I.; Neri, D. *Clinical phytotherapy: opportunities and problematics*. *Ann Ist.Super Sanita*. 41 (1), 27-33, 2005.
- Fukawa, K.; Kawano, O.; Misaki, N.; Uchida, M.; Irino, O. *Experimental studies on gastric ulcer (4). Seqüencial observation and evaluation of gastric ulcer by endoscope in rat*. *Jpn J Pharmacol* 33:175-179, 1983.
- Giulietti, A.M. *Some taxonomic changes in the genus Eriocaulon L.* *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 6, 39-47, 1978.
- Giulietti, A. M.& Hensold, N. *Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae*. *Acta Bot. Bras.* 4: 133-158, 1990.
- Goel R.K.; Gambhir S.S.; Das Gupta, G. *Mechanism of anti-ulcerogenic effect of amentoflavone*. *Indian J Med Res*, 88, 192-6, 1988.
- Gurbuz, I.; Ustun, O.; Yesilada, E.; Sezik, E.; Akyurek, N. *In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies agaisnt ethanol-induced lesions*. *Journal of Ethnopharmacology*, 83 (3), 241-244, 2002.
- Gurib-Fakim, A. *Medicinal plants: traditions of yesterday*. *Molecular Aspect of Medicine*, 27, 1-93, 2006.
- Harborne, B.J.; Williams, C.A. *Advances in flavonoids research since 1992*. *Phytochemistry*, 55, 481-504, 2000.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free redicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006. ISBN 019856869X.

- Halter, F.; Tarnawski, A.S.; Schmassmann, A.; Peskar, B.M. *Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives*. Gut, 49 (3): 443-53, 2001.
- Hayes, J.D. & McLellan, L.I. *Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress*. Free Radical Research, 4, 273-300, 1999.
- Hiraishi, H., Shimada, T., Ivey, K.J. Terano, A. *Role of Antioxidant Defenses Against Ethanol-Induced Damage in Cultured Rat Gastric Epithelial Cells*¹. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic, 289:103–109, 1999.
- Hirokawa, M.; Miura, S.; Yoshida, H.; Kurose, I.; Shigematsu, T.; Hokari, R.; Higuchi, H.; Watanabe, N.; Yokoyama, Y.; Kimura, H.; Kato, S.; Ishii, H. *Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration*. Alcohol. Clin. Exp. Res., 22(3 Suppl):111S-114S, 1998.
- Ho, J.C. & Chen, C.M. *Flavonoids from the aquatic plant Eriocaulon buergerianum*. Phytochemistry, 61, 405-408, 2002.
- Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. *Screening of some plants used in the Brazilian medicine for treatment of infectious disease*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97 (7), 1027-1031, 2002.
- Kahraman, A.; Erkasap, N.; Köken, T.; Serteser, M.; Aktepe, F.; Erkasap, S. *The antioxidant and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions*. Toxicology, 183, 133-142, 2003.
- Kim, J.M.; Choi, S.M.; Kim, D.H.; Oh, T.Y. Ahn, B.O.; Kwon, J.W.; et al. *Combined use of omeprazole and a novel antioxidative cytoprotectant for treatment of peptic ulcer. Facilitation of ulcer healing in experimental animals*. Arzneimittelforschung, 55 (7), 387-393, 2005.
- Kimura, M.; Goto, S.; Ihara, Y.; Wada, A.; Yahiro, K.; Niidome, T.; Oyagi, H.; Hirayama, T.; Kondo, T. *Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from Helicobacter pylori*. Microbial Pathogenesis, 31, 29–36, 2001.

- Kinghorn, A.D. *The role of pharmacognosy in modern medicine*. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 3 (2), 77-9, 2002.
- Kirkpatrick, P. *Stitching together naturally*. *Nature*, 1, 748, 2002.
- Klaassen, C.D.; Bracken, W.M.; Dudley, R.E.; Goering, P.L.; Hazelton, G.A.; Hjelle, J.J. *Role of sulfhydryls in the hepatotoxicity of organic and metallic compounds*. *Fundam Appl Toxicol.*, 5, 806-15, 1985.
- Koch, O.R.; Pani, G.; Borrello, S.; Colavitti, R.; Cravero, A.; Farre, S.; et al. *Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury*. *Mol Aspects Med*, 25 (1-2), 191-198, 2004.
- Krawisz, J.E.; Sharon, P.; Stenson, W.F. *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. *Gastroenterology*, 87 (6), 1344-1350, 1984.
- Kuipers, E.J.; Meuwissen, S.G. *The efficacy and safety on long-term omeprazole treatment for gastroesophageal reflux disease*. *Gastroenterology*, 118 (4), 795-798, 2000.
- Kwiecién, S.; Brzozowski, T.; Konturek, P.C.H.; Konturek, S.J. *The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions*. *Journal of physiology and pharmacology*, 53, 4, 761-773, 2002.
- La Casa, C.; Villegas, I.; De La Lastra, A.; Motilva, V.; Calero, M.J.M. *Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions*. *J of Ethnopharmacology*, 71, 45-73, 2000.
- La Vecchia, C.; Tavani, A. *A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs*. *Eur. J. Cancer Prev.* 11(2), 117-123, 2002.
- Lamberts, R.; Creutzfeldt, W.; Struber, H.G.; Brunner, G.; Solcia, E. *Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease: gastrin, endocrine cell growth, and gastritis*. *Gastroenterology*, 104 (5), 1356-1370, 1993.
- Li, Y.; Ohizumi, Y. *Search for constituents with neutrophilic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand*. *Yakugaku Zasshi*, 124 (7), 417-424, 2004.

- Maity, P.; Biswas, K.; Roy, S.; Banerjee, R.K.; Bandyopadhyay, U. *Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update*. Molecular and Cellular Biochemistry, 253, 329-338, 2003.
- Malone, M.H. & Robichaud, R.C. *A hippocratic screen for pure or crude drug materials*. Llooydia, 25, 320-32, 1962.
- Matsuda, H.; Li, Y.; Yoshikawa, M. *Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, na oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats*. Life Sciences, 65, 27-32, 1999.
- Mincis, M.; Chebli, J.M.F.; Khouri, S.T.; Mincis, R. *Etanol e o trato gastrointestinal*. Arq gastroenterol, 32, 131-139, 1995.
- Mizui, T. & Douteuchi M. *Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats*. Jap. J. Pharmacol. 33, 934-945, 1983.
- Moldenke, N.H. *A fifth summary of the Verbenaceae. Avicenniaceae, Stilbeaceae Discrastyliaceae, Symphoremaceae, Nyctanthaceae and Eriocaulaceae of the world as to valid taxa, geographic distribution and synonymy*. 2v. Ann Arbor., Braun-Brunfield, INC, 1971.
- Moraes, T. M.; Santos, L. C.; Silva, M. A.; Sannomiya, M.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima,C.A.; Souza Brito, A. R. M.; Vilegas, W. *Effect of methanolic extract of Leiothrix flavescens on rodent gastrointestinal tract*. (submetido ao periódico Phytomedicine), 2008.
- Morimoto, Y.; Shimohara, K.; Oshima, S.; Sukamoto, K. *Effects of the new antiulcer agent kb-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine*. Japan J. Pharmacology, 57, 495-505. 1991.
- Newmam, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Natural products as source of new drugs over period 1981-2002*. Journal of Natural Product, 66, 1022-1037, 2003.
- Oates, P.J. & Hakkinen, J.P. *Studies on the mechanisms of ethanol-induced gastric damage in rats*. Gastroenterology, 94, 20-21, 1988.

- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. *Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction*. *Anal Biochem*, 95 (2), 351-358, 1979.
- Perua, D.A. *Prevention of nosteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal symptoms and ulcer complications*. *American Journal of Medicine*, 117 (5A), 63-71, 2004.
- Raghunath, A.S.; O'Morain, C.; Mcloughlin, R.C. *Review article: the long-term use of próton-pump inhibitors*. *Aliment and Pharmacology Therapy*, 22 (1), 55-63, 2005.
- Rainsford, K.D. *Gastric Ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment*. *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 669-672, 1987.
- Rates, S.M.K. *Plants as source of drugs*. *Toxicon*, 39, 603-613, 2001.
- Repetto, M.G. & Llesuy, S.F. *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers Natural antiulcerogenic antioxidant compounds*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 523-534, 2002.
- Rukkumani, R.; Aruna, K.; Varma, P.S.; Rajasekaran, K.N.; Menon, V.P. *Comparative effects of curcumin and na analog of curcumin on alcohol and PUFA induced oxidative stress*. *J Pharm Sci*, 7(2), 274-283, 2004.
- Sakurai, K.; Osaka, T.; Yamasaki, K. *Rebamipide reduces recurrence of experimental gastric ulcer: Role of free radicals and neutrophils*. *Digestive Disease and Sciences*, 50 (1), 90-96, 2005.
- Santos, L.C.; Rodrigues, C.M.; Silva, M.A.; Coelho, R.G.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. *Chemical profile of Eriocaulon ligulatum (Vell.) L.B. Smith (Eriocaulaceae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1159-1166, 2005.
- Schmeda-Hirschmann, G.; Yesilada, E. *Traditional medicine and gastroprotective crude drugs*. *Journal of ethnopharmacology*, 100, 61-66, 2005.
- Shay, H.; Komarov, S.A.; Fels, S.S.; Meranze, D.; Gruenstein, M.; Siplet, H. *A Simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat*. *Gatroenterology*, 5, 43-61, 1945.
- Soares, S.E. *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. *Ver Nutri*, 15 (1), 71-81, 2002.

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

Souza-Brito, A.R.M. *How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries*. Journal of ethnopharmacology, 54, 131-138, 1996.

Spirit, M.J. *Stress-related mucosal disease: risk factor and prophylactic therapy*. Clinical Therapeutics, 26 (2), 197-213, 2004.

Steckney, J.C. & Narthrup, D.W. *Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat*. Proc. Exp. Biol. Med., 101, 582, 1959.

Suzuki, K.; Araki, H.; Komoike, Y.; Takeuchi, K. *Permissive role of neutrophils in pathogenesis indomethacin-induced gastric lesions in rats*. Med. Sci. Monit. 6(5), 908-914, 2000.

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

Watanabe, T.; Chiba, T. *Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly*. Nippon Rinsho, 60 (8), 1515-1520, 2002.

Yoshikawa, T.; Naito, Y.; Kishi, A.; Tomii, T.; Kaneko, T.; Linuma, S.; et al. *Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats*. Gut, 34 (6), 732-737, 1993.

VIII. ANEXO

Anexo 01

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Droga..... Via de administração.....

Dosemg/kg; Volume da injeção;.....mL; Concentração da droga.....

Hora da injeção.....h.....min.;Data...../...../.....

Administrador:.....

Investigador.....Assinatura.....

Animal..... Sexo() ; Peso.....g; Tempo de jejum.....

Sintomas	Normal	Tempo e data					
Aparência geral	4						
Frênto vocal	0						
Irritabilidade	0						
Reposta ao toque	4						
Aperto da cauda	4						
Contorção	0						
Trem posterior	0						
Endireitamento	4						
Tônus muscular	4						
Força de agarrar	4						
Ataxia	0						
Reflexo auricular	4						
Reflexo corneal	4						
Tremores	0						
Convulsões	0						
Estimulações	4						
Straub	0						
Hipnose	0						
Anestesia	0						
Lacrimação	0						
Ptose	0						
Micção	4						
Piloereção	0						
Defecação	4						
Hipotermia	0						
Respiração	4						
Cianose	0						
Morte							

Códigos: Testes com anotação normal "0", a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal "4", a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

Observações gerais/comentários

.....
