

FÁBIO CRUZ MOLEIRO



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DOS
EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Mouriri elliptica* Mart.
(MELASTOMATACEAE) E *Byrsonima basiloba* A. Juss.
(MALPIGHIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu – SP
2007

Fábio Cruz Moleiro



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA DOS
EXTRATOS E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Mouriri elliptica* Mart.
(MELASTOMATACEAE) E *Byrsonima basiloba* A. Juss.
(MALPIGHIACEAE)**

Botucatu, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Moleiro, Fábio Cruz.

Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Mouriri elliptica* Mart. (Melastomataceae) e *Byrsonima basiloba* A. Juss. (Malpighiaceae) / Fábio Cruz Moleiro. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientadora: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Assunto CAPES: 21001006

1. Plantas medicinais 2. Etnofarmacologia

CDD 581.634

Palavras-chave: *Mouriri elliptica*; *Byrsonima basiloba*; Etnofarmacologia; Gastroproteção; Plantas medicinais.

BANCA EXAMINADORA - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MEMBROS TITULARES:

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

Profa. Dra. Fabiana Gaspar Gonzalez

Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi

MEMBROS SUPLENTE:

Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon

Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profa. Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha

Profa. Dra. Mirtes Costa

Profa. Dra. Maria de Lourdes Paulino

Prof. Dr. Wagner Vilegas

DATA: 20 / 04 / 2007

Auxílio financeiro



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

“A Ciência sem a Religião é aleijada. A Religião sem a Ciência é cega.”

Albert Einstein

“O Altíssimo é quem produziu da terra todos os medicamentos, e o homem prudente não lhes terá oposição.

Porventura não foi por meio de um lenho que se tornou doce a água amargosa?

Ao conhecimento dos homens pertence a virtude dos medicamentos, e o Altíssimo lhes deu ciência para ser por eles honrado em suas maravilhas.

Assim, os profissionais promovem a cura e mitigam a dor, fazem perfumes suaves e compõem unguentos. Dessa maneira, as obras de Deus não têm fim, e Dele vem o bem-estar para a terra”.

Eclesiástico 38:4

Dedicatórias

Em primeiro lugar, dedico o meu trabalho a cada um dos **camundongos e ratos** que tiveram suas vidas sacrificadas em prol da nobre tentativa de se obter novos medicamentos que amenizem e curem as mazelas da humanidade.

Aos meus primos, tios, avós, pais, irmão e demais familiares que eu tanto amo e admiro, dedico este trabalho como forma de justificar os anos em que estive ausente do carinho de vocês!

Aos amigos que eu tanto estimo, sejam eles de Assis, Palmital, Ribeirão Preto, os farmacêuticos da minha turma de graduação (🎵 caiu na rede é peixe, lê lê ahhh, Federal do Paranááááá 🎵 !!), os também amigos farmacêuticos tanto da República Várzea como as meninas do curso de homeopatia em Araraquara, os mais novos amigos que fiz durante o mestrado em Botucatu e outras amizades que eu fiz durante minhas andanças, eu dedico este trabalho a vocês!

Aos meus inúmeros professores, desde o “Jardim I” até a profa. Clélia orientadora deste mestrado, eu agradeço imensamente pela transmissão de conhecimento e sabedoria! Este trabalho também é dedicado a vocês!

E dedico também a **todas as pessoas** que se interessam pelo estudo e emprego clínico seguro, eficaz e acessível das plantas medicinais, em detrimento a este modelo de medicamento inalcançável a 80% da população mundial!

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima**, por ter me acolhido como seu aluno, mesmo sem me conhecer previamente já que cursei farmácia na UFPR (Curitiba). Agradeço de coração pelo voto de confiança e pelo empenho demonstrado durante todo este período de mestrado.

À **Profa. Daniela Felipe Pinheiro**, pela orientação e dedicação prestada durante meu estágio de docência junto à turma de Biologia (Noturno) da UNESP - Botucatu.

À **Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves**, primeiro por me apresentar à Profa. Clélia, e também pela amizade nestes dois anos e auxílio durante o Workshop de Plantas Medicinais.

Ao **Prof. Dr. Wagner Vilegas e sua equipe (Miriam Sannomiya, Maria Heloísa Figueiredo e Márcio Adriano Andréo)**, do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP pela elaboração dos extratos e frações, e também pela caracterização fitoquímica.

À **Profa. Dra. Cláudia Helena Pellizzon**, do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP pelo auxílio na realização das etapas referentes aos estudos morfológicos, assim como aos seus alunos (e agora meus amigos) **Ariane Rozza (Sponja)** e **Paulo Vasconcelos (Rita Kadilac)**, pelas instruções e auxílio em partes importantes do meu projeto.

À **Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito**, do Departamento de Fisiologia e Bioquímica, Instituto de Biociências da UNICAMP, Campinas-SP, por disponibilizar o laboratório. E a todos os alunos de seu laboratório, principalmente o **Victor** e o **Anderson**, pelo auxílio prestado e pela atenção despendida comigo.

À Profa. Dra. Lúcia 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 Dra. Adriana Polachini do Valle e Maria Salette Sartori, da Seção de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu-SP, por disponibilizar o uso dos equipamentos para a análise sérica dos parâmetros bioquímicos.

Ao meu querido tio Degmar Ferro, por me convencer da grandeza e da importância do estudo de plantas medicinais sob várias óticas, e por me estimular a seguir neste caminho!

À CAPES e também à **“bolsa-PAI”**, pelo auxílio e socorro financeiro respectivamente, e com isto tornarem possível a realização deste trabalho!

Aos inúmeros amigos do laboratório que, aliás, eu agradeço a Deus por fazer grandes amizades por onde quer que eu passe. Amigos incríveis, capazes de me fazer sorrir mesmo nos momentos mais improváveis! Os moleques (Thiago “Apicultor Inexperiente” Mingo, Hélio “Boneco de Olinda” Pom-pom Kushima, Victor “Muro de Pedra” Cebóla, Roney “Senhor de família” Rick de Carvalho) e as meninas, “olha quanta mulherada invadindo a ciência!” (Raquel “Nossaaaaaa Pocotó!”, a dupla “caso e descaso” Zeilinha Pinheiro & Catharine Ferrazoli, Paty “não fala mal da Barra perto de mim!” Mazzolin, Catarine “envenenada” Nishijima, Flávia Kalose “Miss Simpatia” Bonamin, Roberta “Baianinha”, Ana Paula “Floripa”, Ana Paula “Rridícula”, Larissa “Apanho do Instat” Cocotinha Melanchauski (escrevi certo?), Celi “Girafales”, Vivian “Minholeta”, Renata e Mariana “Sexy Machine”!! Ufa... acho que é isso! Opa, falando em “ufa” me lembrei da Livia “Ufa”, hahahahahah! Agora sim!

Aos colegas de pós-graduação, Celso “Sakuda”, Leonardo Noboru Seito, Gustavo “Babito”, Uiliam “Prumo”, André “Pinóculos”, Aline, Carol, Claudinha, Deborah, Vanessa, Fernanda, Patrícia, Érica, Valéria, Fábio Michelotto e outros, seja pelo auxílio nos experimentos ou pelo coleguismo durante os congressos!

Aos funcionários dos Departamentos de Farmacologia e Fisiologia (Luciana, Cris, Tardivo, Paulão “que tomou um gol do perna-de-pau aqui”, Luis, Aninha, Ângela) pelos auxílios gerais durante o projeto. Em especial, quero agradecer a amizade e o empenho do seu Júnior “parmerense” em manter o biotério limpo e os animais bem cuidados (*nós percebemos como dá trabalho!), e também ao cafezinho da Janete “que não pode faltar”, já que só isso me faz despertar nas manhãs frias de Botucatu!

Aos funcionários da seção de pós-graduação (Sérgio, Luciene, Maria Helena), por resolverem toda a parte burocrática relacionada a relatórios, documentos, elaboração de bancas, matrícula em disciplinas, sorteio de aulas e outros.

Ao colega de apartamento Guilherme “Ô Panguão, a fila anda!” Cirilo e toda sua turma da Biologia, principalmente Aline “Orca” e Mariama “Mari”, agradeço a todos vocês pelo convívio e pelos bons momentos nesta minha passagem de dois anos em Botuca!

Aos meus tios Luiz Antônio da Silva e Diva Cruz, e primos Luís Fernando e Gustavo, pelos dois anos de convívio e almoço (que sobrinho sanguessuga!), e também pela estadia nos últimos meses do mestrado!

“Era uma vez...

... um menino recém-formado que resolveu saltar de pára-quedas, e foi cair dentro do Departamento de Fisiologia da Unesp (mais especificamente dentro da salinha da professora Clélia) ...

RESUMO

A partir da indicação popular de espécies do gênero *Mouriri* e *Byrsonima* para gastrites e distúrbios do trato gastrointestinal, foram realizados experimentos para a avaliação da atividade gastroprotetora, cicatrizante e tóxica do extrato metanólico das folhas de *Mouriri elliptica* (manapuá) (EMME) e *Byrsonima basiloba* (murici-de-ema) (EMBB). As frações derivadas destes extratos (fração acetato de etila de *M. elliptica* - FAEME e fração aquosa de *Byrsonima basiloba* - FABB) também tiveram sua ação gastroprotetora avaliada, assim como o comportamento destas frente à expressão de PGE₂ pela mucosa gástrica. Após a comprovação dos efeitos gastroprotetores de ambas espécies em modelos experimentais de indução de lesões gástricas por etanol acidificado, etanol absoluto, e piroxicam ($p < 0,05$), os estudos foram direcionados no intuito de se caracterizar os mecanismos de ação envolvidos. Assim, ambos os extratos apresentaram atividade gastroprotetora relacionada com os grupamentos sulfidrílicos, sendo que o EMBB também exerce proteção mediada pelo óxido nítrico. A gastroproteção conferida pelos extratos também agiu de maneira independente do efeito anti-secretório e também sem causar alterações na velocidade do trânsito intestinal. Na análise imunohistoquímica, o EMME estimula a proliferação celular na região de regeneração e a expressão de COX₂, enquanto que o EMBB atua aumentando a angiogênese. No modelo de etanol absoluto, a FAEME conferiu uma dose efetiva 5 vezes menor que a do seu precursor EMME (50 e 250 mg/Kg respectivamente). Para a FABB, a menor dose efetiva foi de 200 mg/Kg contra 500 mg/Kg do EMBB neste mesmo modelo experimental. As frações também foram capazes de melhorar a expressão de PGE₂ na mucosa gástrica (no entanto sem significância estatística). Porém, a expressão de PGE₂ foi revertida no caso da FABB pela prévia administração de uma DAINÉ. Substâncias polifenólicas (principalmente flavonóides) parecem estar diretamente envolvidas com as ações farmacológicas encontradas para as 2 espécies vegetais. Nenhuma alteração relevante nas análises de toxicidade foi encontrada.

ABSTRACT

The medicinal plants evaluated in this work were selected based on their Brazilian folk medicine information, which appoints their use for gastritis and gastrointestinal disturbances. Thus, pre-clinical experiments were accomplished for gastroprotective activity, healing gastric mucosal evaluation and toxicity of the methanolic extracts obtained from the leaves of *M. elliptica* (manapuçá) (EMME) and *Byrsonima basiloba* (murici-de-ema) (EMBB). Fractions derived from these extracts (*M. elliptica* ethyl acetate fraction – FAEME and *B. basiloba* aqueous fraction - FABB) were investigated for their gastroprotective potential and PGE₂ quantification on gastric mucosa. After the gastroprotective effect from both extracts was observed, the tests were directed to find information about the mechanisms of action involved. Then, it was found that both extracts presented a gastroprotective activity related to the sulfhydryl compounds, being EMBB also dependent of the protection mediated by nitric oxide. The gastroprotection conferred by the extracts also acted independently of the antisecretory or intestinal mobility alteration effects. At the immunohistochemical analysis, EMME seems to stimulate cell proliferation at the healing area, while EMBB apparently stimulates the local angiogenesis. For the absolute ethanol gastroprotective model, FAEME conferred an effective dose 5 times lower than its precursor EMME (50 and 250 mg/Kg respectively). For FABB, the minor effective dose was 200 mg/Kg against 500 mg/Kg obtained for its originator EMBB, at the same experimental model cited. The fractions were also capable to increase the PGE₂ expression at the gastric mucosa, although without statistical significance. However, the expression of PGE₂ was antagonized for FABB when a non-steroidal anti-inflammatory drug (piroxicam 60 mg/Kg) was previously administered. Polyphenolic substances (mostly flavonoids) seemed to be responsible for the pharmacological actions encountered for both vegetal species. No relevant alteration at the toxicological analysis was found.

ÍNDICE

I –	INTRODUÇÃO	
	I.1 – PLANTAS MEDICINAIS	01
	I.2 – AS ÚLCERAS PÉPTICAS	04
	I.2.1 – EPIDEMIOLOGIA	04
	I.2.2 – ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA	05
	I.3 – A TERAPÊUTICA ATUAL	07
	I.3.1 – AS CLASSES DE DROGAS	07
	I.3.2 – LIMITAÇÕES E DIFICULDADES DA TERAPÊUTICA ATUAL	10
	I.3.3 – A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E A ÚLCERA GÁSTRICA	11
	I.4 – AS PLANTAS ESTUDADAS	14
	I.4.1 – <i>Mouriri elliptica</i> Mart. (MELASTOMATACEAE)	14
	I.4.2 - <i>Byrsonima basiloba</i> A. Juss. (MALPIGHIACEAE)	15
II –	OBJETIVOS	17
III –	MATERIAIS E MÉTODOS	18
	III.1 – ANIMAIS	18
	III.2 – PLANTAS	18
	III.2.1 – COLETA	18
	III.2.2 – EXTRAÇÃO	19
	III.3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS	21
	III.3.1 – TOXICIDADE AGUDA E “SCREENING HIPOCRÁTICO”	21
	III.3.2 – ATIVIDADE GASTROPROTETORA	22
	A. Lesões Gástricas	22
	B. Modelo de Indução de Úlcera por HCl / Etanol	23
	C. Indução de Úlcera por Etanol Absoluto	23
	D. Indução de Úlcera por DAINE (Piroxicam)	24
	III.3.3 – MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS	24
	A. Úlceras Induzidas pela Ligadura de Píloro e Avaliação dos Parâmetros do Suco Gástrico.....	24
	B. Determinação do Papel dos Grupamentos Sulfidrílicos na Gastroproteção	25
	C. Determinação do Papel do Óxido Nítrico (NO) na Gastroproteção	26
	D. Determinação da Motilidade Intestinal	26
	E. Avaliação da Atividade Cicatrizante	27
	1) Análises morfológicas	27
	a) Avaliação macroscópica	27
	b) Microscopia de luz	27

c) <i>Morfometria</i>	28
d) <i>Imunohistoquímica</i>	29
2) <i>Avaliação da atividade subaguda dos extratos</i>	30
III.4 – <i>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DAS FRAÇÕES DE M. elliptica</i>	
<i>E B. basiloba</i>	31
III.4.1 – <i>ATIVIDADE GASTROPROTETORA E MECANISMOS DE AÇÃO</i>	31
A. <i>Doses empregadas nos experimentos com frações</i>	31
B. <i>Indução de Úlcera por Etanol Absoluto</i>	31
C. <i>Indução de Úlcera por DAINE (Piroxicam)</i>	31
D. <i>Determinação de Prostaglandina E₂ basal da mucosa gástrica</i>	32
III.5 – <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	32
IV – <i>RESULTADOS</i>	33
IV.1 – <i>EXTRATO METANÓLICO DE Mouriri elliptica (EMME)</i>	33
A. <i>“Screening” hipocrático e Toxicidade Aguda</i>	33
B. <i>Modelo de Indução de Úlcera por HCl / Etanol</i>	35
C. <i>Modelo de Indução de Úlcera por Etanol Absoluto</i>	36
D. <i>Modelo de Indução de Úlcera por DAINE (Piroxicam)</i>	37
E. <i>Úlceras induzidas pela Ligadura de Píloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico ..</i>	38
F. <i>Determinação do papel dos Grupamentos Sulfidrílicos na gastroproteção</i>	40
G. <i>Determinação do papel do óxido nítrico (NO) na gastroproteção</i>	41
H. <i>Determinação da Motilidade Intestinal</i>	42
I. <i>Avaliação da Atividade Cicatrizante e Tóxica</i>	42
IV.2 – <i>FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE Mouriri elliptica (FAEME)</i>	50
A. <i>Justificativas para os ensaios de gastroproteção com a FAEME</i>	50
B. <i>Modelo de Indução de Úlcera por Etanol Absoluto</i>	51
C. <i>Modelo de Indução de Úlcera por DAINE (Piroxicam)</i>	52
D. <i>Determinação dos Níveis de Prostaglandina E₂ basal da mucosa gástrica</i>	53
IV.3 – <i>EXTRATO METANÓLICO DE Byrsonima basiloba (EMBB)</i>	54
A. <i>“Screening” hipocrático e Toxicidade Aguda</i>	54
B. <i>Modelo de Indução de Úlcera por HCl / Etanol</i>	56
C. <i>Modelo de Indução de Úlcera por Etanol Absoluto</i>	57
D. <i>Úlceras induzidas pela Ligadura de Píloro e avaliação dos parâmetros do suco gástrico...</i>	57
E. <i>Determinação do papel dos Grupamentos Sulfidrílicos na gastroproteção</i>	59
F. <i>Determinação do papel do óxido nítrico (NO) na gastroproteção</i>	60
G. <i>Determinação da Motilidade Intestinal</i>	61
H. <i>Avaliação da Atividade Cicatrizante e Tóxica</i>	62

IV.4 – EXTRATO CLOROFÓRMICO DE <i>Byrsonima basiloba</i> (ECBB)	69
A. Determinação da Motilidade Intestinal	69
IV.5 – FRAÇÃO AQUOSA DE <i>Byrsonima basiloba</i> (FABB)	70
A. Modelo de Indução de Úlcera por Etanol Absoluto	70
B. Determinação dos Níveis de Prostaglandina E ₂ basal da mucosa gástrica	71
V – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	72
V.1 – Discussão dos resultados de Toxicidade Aguda e Subaguda	72
V.2 – Discussão dos resultados de Gastroproteção	73
V.3 – Discussão dos Mecanismos de Ação	75
V.4 – Discussão dos resultados de Cicatrização, Análises Histológicas e Imunohistoquímicas ...	78
V.5 – Correlação dos Dados Fitoquímicos aos Resultados Encontrados	81
VI – CONCLUSÃO	84
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
VIII – ANEXO.....	100

I - INTRODUÇÃO

I.1 – PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágico-religiosos (Firenzuoli *et al.*, 2005) ou como medicamento (Li & Ohizumi, 2004). Os primeiros registros do uso de plantas provêm da China (~3000 a.C.), onde o Imperador Shen Nung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa). Este livro teve várias edições subseqüentes, e muitas das 1000 ou mais drogas descritas ainda são utilizadas na China (Langmead & Rampton, 2001).

Já no período da Revolução Industrial e com o desenvolvimento da química orgânica e de produtos sintéticos para tratamentos farmacológicos, o emprego de plantas medicinais foi paulatinamente sendo substituído por medicamentos sintetizados em laboratório, já que estes transmitiam uma maior sensação de segurança, eficácia e constância de qualidade (Rates, 2001).

No entanto, as plantas medicinais tornaram-se um tópico de importância global crescente nos últimos anos, tendo repercussões tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional. Nos últimos 15 anos, as plantas medicinais têm desfrutado de um renascimento e essa fase tem sido alimentada por muitos consumidores interessados na medicina preventiva e por desapontamento com os medicamentos alopáticos sintéticos (Mahady, 2001).

Apesar de atravessar uma fase de declínio e renascimento perante a ciência, as plantas medicinais sempre tiveram um papel muito importante na saúde humana, principalmente entre as classes menos favorecidas (Kinghorn, 2002). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais, sendo a maioria de países em desenvolvimento (Farnsworth &

Morris, 1976; 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, 2002). De acordo com Newman *et al.* (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-Fakim, 2006).

Na busca por novos medicamentos oriundos de plantas medicinais, o modelo de purificação e isolamento molecular prevalece no mercado, devido às dificuldades observadas no controle de qualidade de extratos vegetais sob o ponto de vista físico-químico, toxicológico e farmacológico (Lapa *et al.*, 2000; Corrêa *et al.*, 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. A escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) traz vantagens devido ao acúmulo milenar de informações empíricas, o que facilita a triagem de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos. Com isso, ela permite economia de tempo e dinheiro. Já a seleção com base na similaridade dos constituintes químicos ativos (quimiotaxonomia), encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante principalmente pela possibilidade de se encontrar novos protótipos ou novas estruturas químicas ativas (Amorozzo, 1996; Holetz *et al.*, 2002; Souza Brito, 1996).

Após a seleção da espécie a ser testada, é necessário fazer a seleção do material. Nesta fase, é essencial garantir a uniformidade química e a estabilidade do produto a ser utilizado durante todo o ensaio. Nesse sentido, os estudos envolvendo as plantas medicinais oferecem dificuldades já na fase preliminar. Primeiramente, porque é comum a confusão botânica entre espécies afins; em segundo lugar, porque exemplares de uma mesma espécie, colhidos em épocas diferentes, ou de locais diferentes, não têm necessariamente a mesma atividade biológica e; em terceiro lugar, porque é difícil controlar quimicamente um extrato vegetal em virtude do grande número de substâncias normalmente presente (Lapa *et al.*, 2000).

Então, a avaliação científica cuidadosa da segurança e eficácia se torna essencial antes que as plantas medicinais ou fitoterápicos possam ser oficialmente incorporados nos sistemas primários de saúde e antes da aceitação global de seus benefícios à saúde (Mahady, 2001).

Seguindo esse princípio, o Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista busca contribuir para o uso seguro de plantas medicinais, através da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas, para a validação das plantas medicinais com atividade sobre o trato gastrointestinal. A demonstração da sua eficácia, em conjunto com a determinação da toxicidade e do estudo dos mecanismos de ação destes produtos formam parte importante dos estudos realizados no nosso laboratório.

I.2 - AS ÚLCERAS PÉPTICAS

I.2.1 – EPIDEMIOLOGIA

A humanidade tem convivido com as úlceras pépticas desde tempos remotos, e a primeira possível descrição dessa doença tenha sido inscrita nos pilares do templo de Esculápio, em Epidaurus, por volta do século IV antes de Cristo (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

A úlcera péptica já 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 (Sontaj, 1997; Spirt, 2004). Nos Estados Unidos, aproximadamente 4 milhões de pessoas têm úlceras pépticas, sendo que a cada ano 350 mil novos casos são diagnosticados, cerca de 100 mil pacientes são hospitalizados e pelo menos 3000 pessoas morrem em decorrência dessa enfermidade (Crawford, 2000). No Brasil não existem números oficiais, mas segundo dados do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, calcula-se que 10% da população têm, tiveram ou terão úlcera péptica (Eisig & Laudanna, 2001).

O sexo masculino é mais susceptível ao desenvolvimento das úlceras pépticas, sendo que a proporção entre este sexo e o feminino para as úlceras duodenais é cerca de 3:1, e para as úlceras gástricas é cerca de 1,5:1 a 2:1. As mulheres, por sua vez, são geralmente mais afetadas durante ou após a menopausa (Crawford, 2000).

A prevalência mundial de úlceras pépticas é variável, sendo que as úlceras duodenais predominam nas populações ocidentais enquanto que as úlceras gástricas são mais frequentes na Ásia, especialmente no Japão (Sonnenberg, 1985).

I.2.2 – ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

A úlcera, por definição, é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes dos tecidos epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos, podem ser destruídos (Milani & Calabrò, 2001).

As úlceras pépticas são lesões na mucosa gástrica e duodenal provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, NO, prostaglandina, dentre outros) e lesivos (pepsina, ácido clorídrico, H₂O₂, OH⁻, O₂⁻, dentre outros). Além destes fatores lesivos, as lesões também podem ser desencadeadas e/ou agravadas pelo estresse, consumo excessivo de álcool, tabagismo, uso de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) e pela presença de *Helicobacter pylori* no trato gastrointestinal (Wallace & Granger, 1996; Maity *et al.*, 2003).

Sob condições de estresse, o Sistema Nervoso Central é alterado com estimulação do hipotálamo e do centro medular causando alterações na motilidade gastrointestinal, aumento da secreção ácida e de pepsina, alteração da liberação de substâncias endógenas como glicocorticóides, catecolaminas e histamina; e também alterações da microcirculação causando isquemia, que provocam diminuição da vitalidade das células gástricas e de capilares, levando a necrose e ao desenvolvimento de úlceras (Pachaly *et al.*, 1993).

As DAINEs permanecem entre os agentes farmacológicos mais utilizados clinicamente, e a sua habilidade de causar ulceração gastrointestinal foi demonstrada há mais de 60 anos (Wallace, 2001). As lesões tópicas iniciam com as erosões da mucosa gástrica induzidas pelas DAINEs, mas a depleção de prostaglandinas (PGs) é essencial

para o desenvolvimento de úlceras gástricas clinicamente significativas (Atay *et al.*, 2000).

As doenças do trato gastrointestinal relacionadas ao álcool possuem um papel importante na gastroenterologia clínica. A lesão da mucosa gástrica ocorre devido a uma diminuição de função da barreira de muco, a principal proteção contra o ácido gástrico. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela re-difusão de íons H^+ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo local (Siegmund, 2003). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (Repetto & Llesuy, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido reportadas como mediadoras dos distúrbios microvasculares que precedem as lesões da mucosa gástrica induzidas por estresse, DAINes e etanol (Rastogi *et al.*, 1998; Repetto & Llesuy, 2002). Essas moléculas, como por exemplo o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são constantemente geradas nas células através de processos como a fosforilação oxidativa/transporte de elétron mitocondrial, o metabolismo de xenobióticos e a inflamação. O aumento dos níveis intracelulares de ROS, tais como quando as defesas antioxidantes celular são insuficientes para manter abaixo do limiar tóxico, é comumente referido como estresse oxidativo. Essas moléculas são altamente reativas e interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais como o DNA, proteínas e lipídios (Cnubben *et al.*, 2001).

Atualmente, grande parte das pesquisas científicas envolvendo úlceras pépticas estão direcionadas no estudo de *Helicobacter 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 úlceras pépticas (Go, 1997; Bauer & Marker-Hermann, 2003; Peura, 2004).

A análise destes achados nos permite afirmar que a etiologia da doença péptica é complexa e multifatorial, ou seja, o desencadeamento das lesões geralmente se relaciona a uma associação de fatores (hereditariedade, sexo, raça, idade, tipo de alimentação, tabagismo, estresse, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, presença de *H. pylori*, uso de DAINES, etc), e raramente a um fator isolado.

Os desafios futuros para a ciência incluem a compreensão mais detalhada sobre a etiologia e patogênese da doença, e também a “individualização” do caso clínico de cada paciente, possibilitando assim uma intervenção farmacológica mais direcionada caso a caso.

I.3 – A TERAPÊUTICA ATUAL

I.3.1 – AS CLASSES DE DROGAS

Na tentativa de proteger a mucosa do ácido gástrico, aumentar a cicatrização e prevenir a recorrência da úlcera, o controle farmacológico da secreção ácida tem representado um alvo desejável. Vários fármacos, como os antagonistas dos receptores histaminérgicos e colinérgicos, inibidores da H^+/K^+ -ATPase e agentes citoprotetores têm sido desenvolvidos, e muito deles ativamente utilizados para o tratamento de doenças gástricas (Aihara *et al.*, 2003). Nos casos em que a úlcera péptica está

relacionada à presença de *H. pylori*, as drogas anti-úlceras são então associadas com antibióticos (Hoogerwerf & Pasricha, 2003; McQuaid, 2005).

O primeiro antagonista dos receptores H₂ foi desenvolvido por Black *et al.* (1972) e com pequenas alterações Brimblecombe *et al.* (1975) desenvolveram a cimetidina, a qual foi amplamente prescrita para o tratamento de úlceras pépticas no mundo inteiro. Através da modificação da estrutura química da cimetidina, foram desenvolvidos a ranitidina, a famotidina e a nizatidina (Aihara *et al.*, 2003). Estas drogas inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores na membrana basolateral das células parietais (Hoogerwerf & Pasricha, 2003). Recentemente, os antagonistas dos receptores H₂ têm se tornado a primeira linha de terapia para doenças pépticas relacionadas ao ácido, levando a uma marcante melhora na qualidade de vida para um grande número de pacientes, bem como a uma redução dramática no uso de intervenção cirúrgica para o tratamento da úlcera (Aihara *et al.*, 2003).

Os compostos anticolinérgicos pirenzepina e telenzepina, podem reduzir a produção basal de ácido em cerca de 40-50%, mas devido a sua eficácia relativamente baixa, assim como pelos seus acentuados efeitos colaterais anticolinérgicos, a sua utilização está diminuindo (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

A identificação da bomba de ácido, H⁺/K⁺-ATPase, como o passo final da secreção ácida gástrica proporcionou uma oportunidade única para desenvolver uma nova classe de drogas que hoje são os supressores da secreção ácida gástrica mais eficazes. Fellenius *et al.* (1981) descobriram que os derivados benzimidazóis inibiam fortemente a secreção ácida gástrica. Depois da triagem de um vasto número de derivados, o primeiro inibidor da bomba (omeprazol) foi descoberto. Atualmente, existem vários inibidores da bomba de próton disponíveis para o uso clínico: omeprazol,

lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol (Aihara *et al.*, 2003; Hoogerwerf & Pasricha, 2003). Estudos animais e clínicos demonstraram que o efeito antissecretor do omeprazol persiste por um longo período devido à ligação covalente da droga a H⁺/K⁺-ATPase. Portanto, o omeprazol aumenta a cicatrização da úlcera devido ao seu potente e persistente efeito antissecretor (Aihara *et al.*, 2003).

Os antiácidos, como o bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio ou preparações combinadas, proporcionam imediatamente o alívio efetivo da dor pela neutralização do ácido intraluminal. Porém, como as drogas antissecretoras mais potentes e seguras, como os antagonistas dos receptores H₂ e inibidores da bomba de ácido, estão disponíveis, os antiácidos neutralizadores não são comumente utilizados na clínica médica para o tratamento da úlcera péptica (Aihara *et al.*, 2003).

A busca de outros mecanismos de ação, além da neutralização ou inibição da secreção ácida para a cicatrização da úlcera tem aumentado. Os agentes citoprotetores são capazes de potencializar os mecanismos de proteção da mucosa e/ou proporcionar uma barreira física sobre a superfície da úlcera (Rang *et al.*, 2001). Dentre os agentes citoprotetores mais conhecidos está o Misoprostol, um análogo estável da prostaglandina E₁ (PGE₁) que inibe a secreção ácida gástrica, tanto basal quanto a que ocorre em resposta aos alimentos, à histamina, pentagastrina e cafeína através de uma ação direta sobre a célula parietal (Rang *et al.*, 2001). Estes agentes mantêm a barreira da mucosa gástrica e o fluxo sanguíneo da mucosa (Hawkins & Hanks, 2000), mas apresenta efeitos colaterais como diarreia e cólicas abdominais e, além disso, é um abortivo em potencial (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

Outro agente citoprotetor é o sucralfato que consiste em octassulfato de sacarose e em ambiente ácido sofre um amplo encadeamento cruzado (polimerização) para

produzir um gel viscoso e pegajoso que adere firmemente às células epiteliais. Além da inibição da hidrólise das proteínas da mucosa pela pepsina, o sucralfato estimula a produção local de prostaglandinas e do fator de crescimento epidermal (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

I.3.2 – LIMITAÇÕES E DIFICULDADES DA TERAPÊUTICA ATUAL

Um dos maiores problemas relativo à úlcera gastroduodenal é que, embora a taxa de cicatrização com antagonistas H₂ e inibidores da bomba de prótons seja de 80-100% depois de uma terapia de 4 semanas, a recorrência da úlcera dentro de 1 ano depois do término do tratamento está entre 40-80% na maioria dos estudos. Dados na literatura indicam que as úlceras cicatrizadas espontaneamente ou depois do uso de cimetidina (antagonista H₂) são precariamente vascularizadas e têm de 2-3 vezes menos densidade de vasos sanguíneos novos do que no tecido normal ao redor, acreditando-se ser uma das razões da recorrência (Szabo & Vincze, 2000).

Além da alta porcentagem de recorrência de úlcera pós-tratamento discutida acima, um outro efeito adverso tem preocupado a comunidade científica – estudos recentes mostram que o uso prolongado de antagonistas H₂ e inibidores da bomba de prótons pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer (La Vecchia & Tavani, 2002; Raghunath *et al.*, 2005).

Outros efeitos indesejáveis relacionados ao uso de drogas no tratamento de úlceras pépticas são: arritmias, impotência, ginecomastia, alterações hematopoiéticas, náuseas, dores abdominais, prisão de ventre, flatulência, diarreia e cefaléia (Hoogerwerf & Pasricha, 2003).

Desta forma, apesar dos grandes avanços com o surgimento destas drogas, refletindo inclusive na diminuição de morbidade e mortalidade dos pacientes, a

abordagem farmacológica da úlcera péptica ainda é insatisfatória, já que na maioria das vezes os fármacos se limitam a atuar de maneira sintomática e paliativa, sendo que a situação ideal seria a busca da cura.

Relatos científicos mostram a existência de uma grande variedade de plantas com atividade gastroprotetora, com diferentes mecanismos de ação, indicando que as plantas medicinais constituem-se numa fonte importante de novas drogas (Goel & Sairam, 2002; Zayachkivska *et al.*, 2004; Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005).

I.3.3 – A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E A ÚLCERA GÁSTRICA

A química de produtos naturais é um ramo do conhecimento bastante diversificado e explorado atualmente, compreendendo várias famílias de substâncias das quais são classificadas de acordo com suas propriedades físico-químico-estruturais. Dentre as classes de compostos químicos, sabe-se que boa parte delas é de interesse nos estudos envolvendo patologias gástricas por apresentarem efeito gastroprotetor e/ou cicatrizante.

No caso de alcalóides por exemplo, o trabalho de Toma *et al.* (2004) demonstrou que o extrato das inflorescências de *Senecio brasiliensis* apresentou efeito gastroprotetor em diversos modelos animais devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos. No entanto, o uso medicinal desta espécie vem sendo desencorajada devido às propriedades hepatotóxica e carcinogênica atribuídas a este tipo de alcalóide. Algumas espécies do gênero *Berberis* contêm matrina e oximatrina, alcalóides que também possuem atividade gastroprotetora (Lewis & Hanson, 1991).

A classe dos terpenóides (que inclui monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos) também possui importância significativa na busca por novos compostos com atividade antiúlcera. Os terpenóides com ação gastroprotetora têm sido isolados de

várias espécies medicinais, nas quais podem ser citados os sesquiterpenos de *Artemisia douglasiana* (Giordano *et al.*, 1990), poligodial (Matsuda *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2002), triterpenos de *Fabiana imbricata* (Astudillo *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003) e *Protium heptaphyllum* (Oliveira *et al.*, 2004a; Oliveira *et al.*, 2004b), lupeol, ácido ursólico, taraxerol (Lewis & Hanson, 1991) e carbenoxolona de *Glycyrrhiza glaba*.

Nos últimos anos, algumas publicações destacam a atividade de diterpenos com estruturas moleculares bastante variadas. É o caso da *trans*-dehidrocrotonina isolada de *Croton cajucara* (Souza Brito *et al.*, 1998; Hiruma-Lima *et al.*, 2002), cordatina de *Aparisthium cordatum* (Hiruma-Lima *et al.*, 2001) e trichorabdal A de *Rabdosia trichocarpa* (Kadota *et al.*, 1997).

Apesar da importância das classes citadas acima na obtenção de novos compostos de ação antiúlcera, talvez nenhuma delas esteja tão bem descrita na literatura e nem sejam capazes de fornecer tantas moléculas se comparadas à classe dos compostos fenólicos. Nesta classe se incluem por exemplo os ácidos fenólicos, taninos, cumarinas e flavonóides.

De uma maneira geral, substâncias polifenólicas possuem significativa atividade antioxidante (Alanko *et al.*, 1999). E esta característica, por sua vez, parece estar intimamente relacionada à atividade gastroprotetora e/ou cicatrizante destas substâncias. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Gharzouli *et al.* (1999), que observou o efeito gastroprotetor do ácido tânico, um tanino hidrolisável de estrutura molecular bastante simples, frente ao modelo de indução de lesões por etanol absoluto.

Os flavonóides têm chamado a atenção de muitos pesquisadores devido ao amplo espectro de atividades biológicas exercidas por eles (Harbone, 1996). Dentre os que apresentam atividade gastroprotetora, podem ser citados os que são encontrados em *Diitrichia viscosa* (Alarcón de la Lastra *et al.*, 1993), *Piper ossanum* (Apecechea *et al.*,

2000), hidroxichalconas (Yamamoto *et al.*, 1992), catequina, apigenina, luteonina, miricetina, quercetina e naringenina (Lewis & Hanson, 1991).

Além do número elevado de flavonóides que apresentam efeito gastroprotetor, é interessante notar que este efeito farmacológico é mediado através de diferentes mecanismos, e que cada tipo de flavonóide parece atuar de maneira intrínseca (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies vegetais ricas em flavonóides e seus mecanismos conhecidos de gastroproteção*

Mecanismo de ação farmacológica	Origem
Gastroprotetor e antiúlcera	- Sementes de <i>Citrus paradisi</i> - <i>Panax ginseng</i>
Alterações na quantidade e no conteúdo de glicoproteínas do muco gástrico	- <i>Erica andevalensis</i>
Efeitos preventivos e curativos	- <i>Hippophae rhamnoides</i>
Inibição da secreção ácida basal e da induzida por histamina	- <i>Azadirachta indica</i> - <i>Phellodendron amurense</i>
Aumento de óxido nítrico na microcirculação da mucosa	- <i>Ginkgo biloba</i> - <i>Silybum marianum</i> - sementes de <i>Citrus paradisi</i> - <i>Bacopa monniera</i> - sementes de uva
Secreção alcalina e de muco	- <i>Tasmannia lanceolata</i> - <i>Bacopa monniera</i> - <i>Azadirachta indica</i> - <i>Mikania cordata</i>
Liberação de prostaglandina	- <i>Tasmannia lanceolata</i> - <i>Petasites hybridus</i> - <i>Ruta chalepensis</i>
Anticancerogênico	- Sementes de <i>Citrus paradisi</i> - <i>Garcinia kola</i> - sementes de uva

* adaptado de Zayachkivska *et al.*, 2005

Em suma, a química de produtos naturais possui uma infinidade de plantas e moléculas a serem exploradas, e seu desenvolvimento em conjunto com estudos de farmacologia e toxicologia torna-se, sem dúvida, uma grande estratégia na obtenção de novos fármacos.

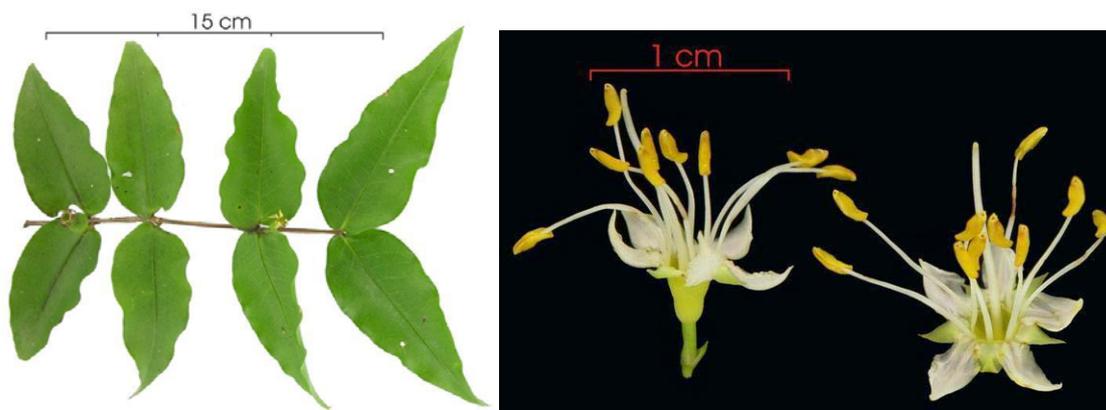
I.4 – AS PLANTAS ESTUDADAS

I.4.1 – *Mouriri elliptica* Mart. (MELASTOMATACEAE)

Neste trabalho, o gênero *Mouriri* foi selecionado a partir de diversas citações na medicina popular como útil no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como úlceras e gastrites. Para tal fim, suas partes aéreas são preparadas na forma de chá (Silva *et al.*, 2000).

Várias espécies do gênero *Mouriri* são conhecidas popularmente como coroa-de-frade, manapuça, mandapuça, jaboticaba-do-cerrado, pusa, pusa-preta, xiputa e dezenas de outras denominações, de acordo com suas localizações geográficas. Em geral, são arbustos de 2 a 7m de altura com frutos comestíveis muito apreciados pelos nativos do norte do Brasil (Corrêa, 1984).

Dentre as poucas publicações existentes sobre o gênero *Mouriri*, a mais significativa descreve as atividades citotóxica contra o *Plasmodium falciparum*, anti-HIV e anti-câncer de *M. myrtilloides* (Calderon *et al.*, 2000). Adicionalmente foi encontrada expressiva atividade antioxidante em *M. myrtilloides* (Frankel & Berenbaum, 1999).

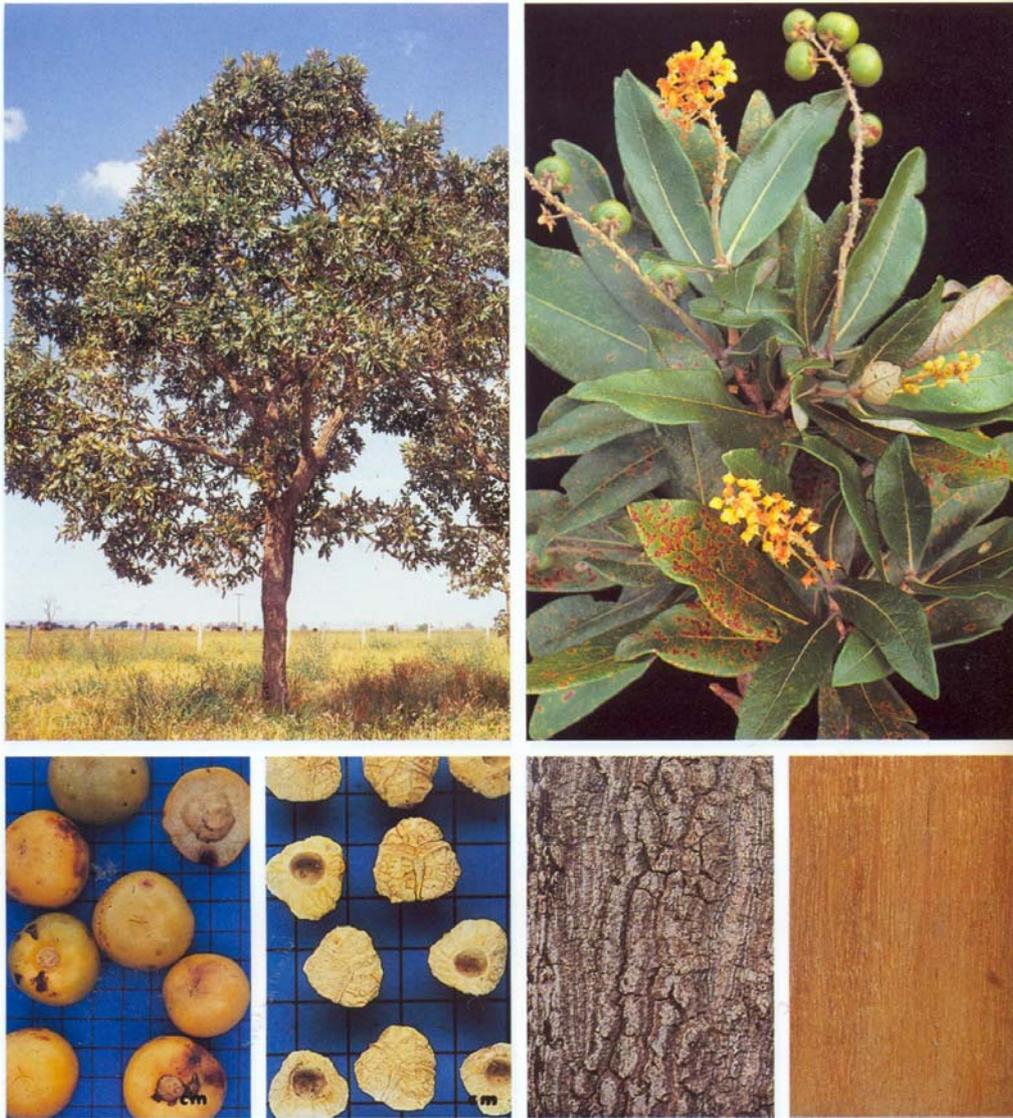


Fotos 1 e 2 – Detalhe das folhas e flores de *Mouriri myrtilloides* (© Copyright Smithsonian Tropical Research Institute, 2003-2006. A autoria de Steven Paton)

I.4.2 - *Byrsonima basiloba* A. Juss. (MALPIGHIACEAE)

Dados gerais – A espécie *B. basiloba* é popularmente denominada de murici, murici-de-ema ou murici-do-campo, e sua ocorrência se dá nos Cerrados do Brasil Central. O desenvolvimento das mudas, bem como das plantas, é lento no campo. Floresce quase o ano inteiro, porém predominando nos meses de verão (Janeiro a Março). É uma planta decídua, heliófita, seletiva xerófito, características de terrenos altos do Cerrado. A maturação dos frutos ocorre na maioria do ano, porém ocorre com maior intensidade de Abril a Junho (Lorenzi, 1998).

As poucas publicações existentes sobre o gênero *Byrsonima* referem-se principalmente às espécies *B. crassa* e *B. microphylla*. Em relação à atividade antiulcerogênica, o trabalho de Sannomiya *et al.* (2005) observou efeito gastroprotetor para os extratos hidrometanólico (20:80), metanólico e clorofórmico das folhas de *B. crassa*.



Byrsonima basiloba Juss.

Família Malpighiaceae

Foto 3 – *Byrsonima basiloba* (Lorenzi, 1998).

II – OBJETIVOS

- 1 – Avaliar as atividades gastroprotetoras dos extratos e frações de *Mouriri elliptica* e *Byrsonima basiloba*
- 2 – Caracterizar os efeitos citoprotetor, cicatrizante e/ou antissecretor dos extratos e frações de ambas as espécies
- 3 – Avaliar a segurança dos extratos e frações, através de ensaios de toxicidade aguda e subaguda

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-45g) e ratos machos albinos Wistar (170-250g), 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 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 (25-45g), submetidas às mesmas condições de criação e manutenção citadas acima. 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 - PLANTAS

III.2.1 - COLETA

As folhas de *Mouriri elliptica* foram coletadas em Ipueiras, Tocantins. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Géza de Faria Arbocz, da Universidade Federal do Tocantins. A exsicata foi depositada no Herbário HTINS sob o nº. 3341.

As folhas de *Byrsonima basiloba* foram coletadas pelo doutorando Luís Fernando Rolim (IBB-UNESP-Botucatu, SP) em Pratânia / SP, e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da Unesp-Botucatu sob o nº 24163.

III.2.2 - EXTRAÇÃO

As folhas de *M. elliptica* e *B. basiloba* foram secas em estufa entre 40-50°C e moídas em moinho de facas. O material moído foi extraído por maceração com solventes orgânicos por 48 horas. As soluções foram filtradas em papel de filtro e concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperatura < 40°C. Em seguida, os extratos foram transferidos para vidros e deixados em capela até que a massa se estabilizasse. Extratos e frações foram evaporados em evaporador rotatório (Tecnal, modelo TE-210), equipado com bomba a vácuo (Tecnal, modelo TE-058) e banho para controle da temperatura. Quando necessário, extratos e frações foram liofilizados em sistema Savant Micromodulyo equipado com bomba Valupump VLP200. Uma balança analítica Libror AEG-45SM, de capacidade para 45g e precisão de 0,01mg (Shimadzu®) foi usada na pesagem dos extratos e frações.

A seguir, as figuras de 1 a 4 esquematizam a obtenção dos extratos e frações estudadas neste trabalho.

Figura 1 – Fluxograma da obtenção do extrato metanólico (EMeOH) das folhas de *Mouriri elliptica* (Me)

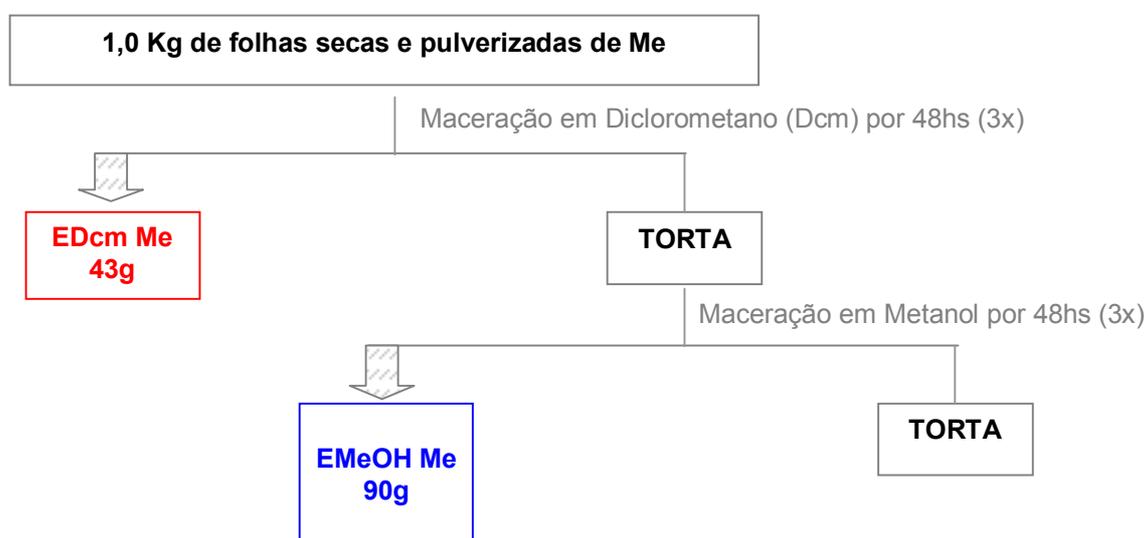


Figura 2 – Fluxograma da obtenção da fração acetato de etila (FAcOEt) a partir do extrato metanólico (EMeOH) de *Mouriri elliptica* (Me)

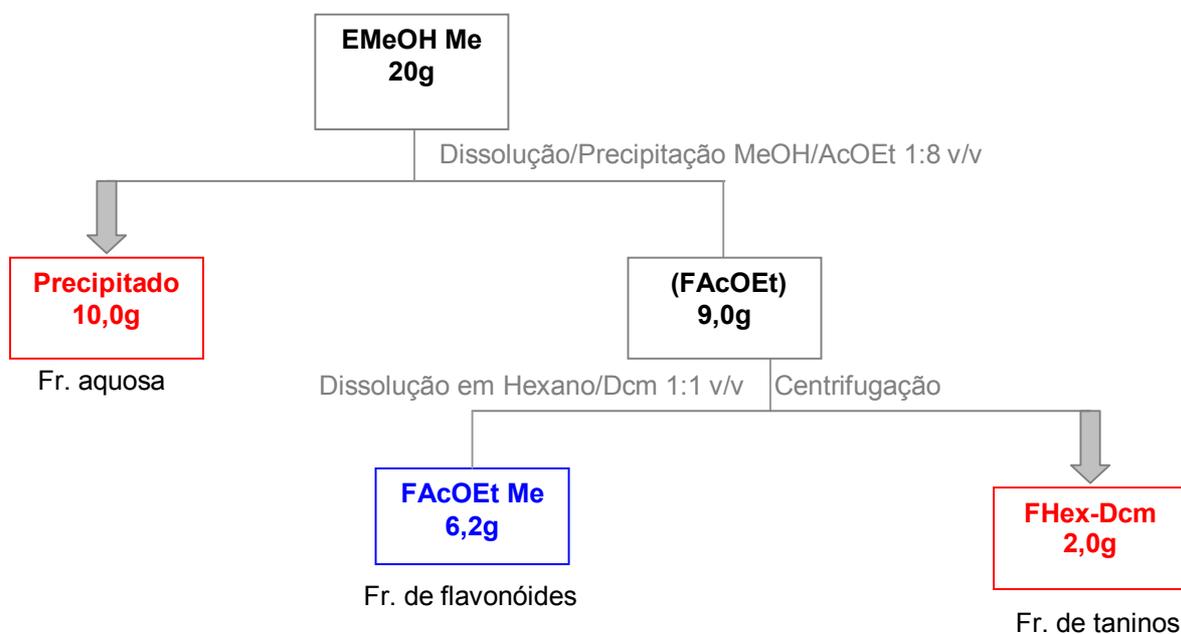


Figura 3 – Fluxograma da obtenção do extrato metanólico (EMeOH) e clorofórmico (CHCl₃) das folhas de *Byrsonima basiloba* (Bb)

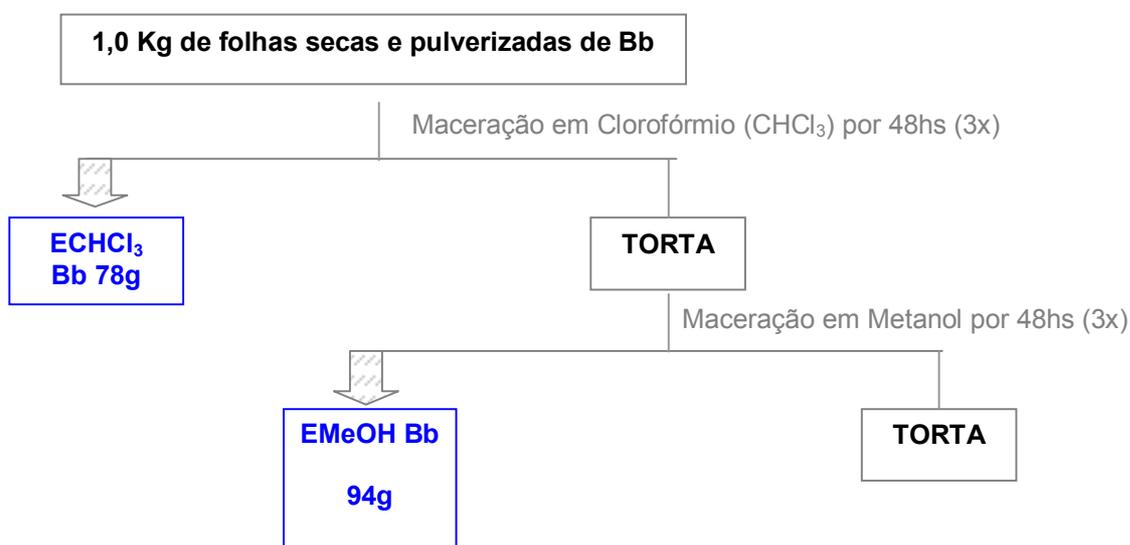
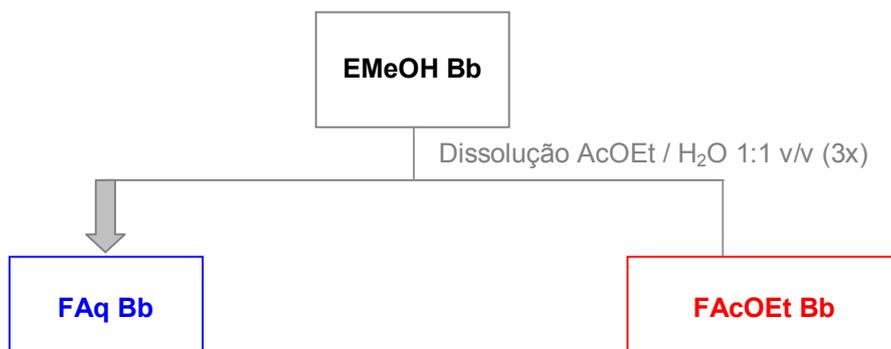


Figura 4 – Fluxograma da obtenção da fração aquosa (FAq) a partir do extrato metanólico (EMeOH) de *Byrsonima basiloba* (Bb)*



* Não foi possível obter informações a respeito do rendimento das frações derivadas de Bb

III.3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS

III.3.1 – TOXICIDADE AGUDA E “SCREENING” HIPOCRÁTICO

Estudos foram realizados a fim de se constatar possíveis efeitos tóxicos agudos dos extratos que podem estar relacionados a alterações de comportamento, a ocorrência de mortes e de modificações macroscópicas de órgãos vitais como fígado, rins, coração, baço e pulmão.

Foram realizados experimentos paralelos que utilizaram camundongos Swiss machos ou fêmeas, divididos aleatoriamente em grupos para os respectivos tratamentos: salina (controle) e extratos metanólicos de *M. elliptica* e *B. basiloba* na dose única submáxima de 5000 mg/kg. Os tratamentos foram realizados por via oral (p.o.) e os parâmetros comportamentais observados foram aqueles descritos por Malone & Robichaud (1962) e Souza Brito (1994). As análises foram feitas aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração dos extratos (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 análise dos órgãos vitais. Estes foram devidamente pesados, no intuito de se 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 controle positivo (cimetidina, lansoprazol ou carbenoxolona) e negativo (salina) dependendo da especificidade de cada modelo. Os animais, antes de cada tratamento, foram mantidos em gaiola especial (para evitar coprofagia), sem maravalha e com água *ad libitum*. Em todos os experimentos de indução de úlcera, as lesões ulcerativas foram medidas e classificadas de acordo com a severidade (Szelenyi & Thiemer, 1978) em lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (I.L.U.) obtido através da equação:

$$\text{I.L.U.} = (\sum \text{lesões nível 1}) + (2 \times \sum \text{lesões nível 2}) + (3 \times \sum \text{lesões nível 3})$$

Para a medição de lesões, foi utilizada uma lupa estereoscópica binocular (Carl Zeiss Jena, modelo Technival) com aumento de 6,3x.

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 camundongos Swiss machos, foram tratados com os respectivos extratos 50 min. antes da indução de lesão gástrica por etanol acidificado. Grupos de animais receberam carbenoxolona 100 mg/Kg ou lansoprazol 30 mg/kg (controle positivo), salina (controle negativo) e os extratos nas doses 125, 250 e 500 mg/kg (*M. elliptica*) ou 250, 500 e 1000 mg/Kg (*B. basiloba*). Todos os tratamentos foram feitos 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%. Os animais foram mortos por deslocamento cervical 1 hora após a administração do agente lesivo, os estômagos retirados, o pH do suco gástrico determinado e os estômagos abertos ao longo da grande curvatura para então serem prensados em placas de vidro, escaneados e realizados os procedimentos de medida e classificação das lesões gástricas pelo I.L.U.

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 125, 250 e 500 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 aplicado em todos os animais.

Transcorrido 1 hora deste tratamento, todos os animais foram mortos e os estômagos foram analisados de acordo com os procedimentos descritos previamente.

D. Indução de úlcera por Droga Antiinflamatória Não Esteroidal (DAINE)

O experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Rainsford (1987), com modificações. Foram utilizados camundongos Swiss machos (40-45g), submetidos a jejum por um período de 36 horas. As lesões gástricas foram induzidas pela administração de piroxicam na dose de 30mg/kg, por via subcutânea. Os tratamentos (p.o.) com os extratos nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e salina (controle negativo) foram realizados 30 minutos antes da administração dos agentes indutores. Os animais foram mortos por deslocamento cervical 4 horas após o estímulo lesivo para a retirada dos estômagos e posterior quantificação das lesões gástricas (I.L.U.).

III.3.3 – MECANISMOS DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS

A. Úlceras induzidas pela Ligadura de piloro 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 dos extratos administrados oral ou intraduodenalmente 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 amarradura do piloro. A administração das amostras vegetais (500 mg/kg), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) ou salina (controle negativo), foi

realizada logo após a amarradura, por via intraduodenal ou 30 minutos antes nos tratamentos por via oral. A dose única dos extratos (500 mg/kg) foi utilizada com base nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, por ser considerada a mais efetiva em indução de proteção.

Logo após a ligadura do piloro, suturou-se as incisões e 4 horas após a cirurgia os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e a incisão reaberta. Logo em seguida foi realizada uma ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo gástrico) para a retirada do estômago. O conteúdo estomacal foi coletado e, em seguida, determinado o volume do suco gástrico, o pH e a concentração de íons hidrogênio na secreção gástrica através de titulação com NaOH 0,01N em bureta digital 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). Quando possível, as lesões gástricas foram avaliadas segundo o cálculo do I.L.U.

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

Ratos Wistar machos permaneceram em jejum por 24 horas. Os animais foram separados em 6 grupos, onde 3 grupos foram pré-tratados com uma injeção intraperitoneal de NEM (N-ethylmaleimida), enquanto os 3 restantes 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 10mL/kg numa dose de 10mg/kg de NEM. Decorridos 30 minutos, cada grupo experimental recebeu (p.o.) seu tratamento correspondente (salina, carbenoxolona 100 mg/kg e extratos 500 mg/kg). Depois de 60 minutos, os animais receberam um volume fixo de 1mL de etanol absoluto

99,5% (p.o), sendo mortos após 1 hora deste último tratamento. Os estômagos foram retirados e abertos pela grande curva, para então suas lesões serem medidas e o I.L.U. calculado.

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

Ratos Wistar machos em jejum por 24 horas foram divididos em 6 grupos, onde 3 receberam injeção intraperitoneal de L-NAME (N-nitro-L-arginina metil éster), inibidor da enzima NO-sintase, enquanto os outros 3 grupos receberam salina pela mesma via. Após 30 minutos, os grupos sofreram administração oral dos respectivos tratamentos (salina, carbenoxolona 100 mg/kg e extratos 500 mg/kg). Após 60 minutos, os animais foram tratados pela via oral com 1mL de etanol absoluto 99,5%. Os animais foram mortos após 1 hora, e os estômagos removidos e abertos na grande curvatura para contagem e avaliação das lesões (cálculo do índice de lesão ulcerativa).

D. Determinação da motilidade intestinal

Seguindo o método descrito por Stickney & Northup (1959) com modificações, camundongos Swiss machos, em jejum de 6h e divididos em 5 grupos, receberam seus respectivos tratamentos orais: salina, atropina 5 mg/kg e extratos (250, 500 e 1000 mg/kg). Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% p.o. no volume de 10mL/kg. Os animais foram mortos 30 minutos após o último tratamento. O passo seguinte foi retirar todo o intestino delgado juntamente com o estômago, para medir o comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado. Os dados obtidos foram transformados em uma relação de distância percorrida e comprimento total do intestino para análise estatística.

E. Avaliação da atividade cicatrizante (Okabe & Amagase, 2005)

Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, pesados e anestesiados com éter para a realização de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide. A parede anterior do estômago foi exposta e um volume de 0,05 ml de ácido acético a 30%, injetado na camada submucosa da junção do fundo com o antro. Imediatamente em contato com o ácido, houve a formação da lesão hemorrágica profunda. Logo em seguida, realizou-se a sutura e os animais retornaram ao biotério em caixas de contenção normais, com alimento e água *ad libitum* para sua completa recuperação. Os animais foram tratados durante 14 dias com salina, cimetidina 100 mg/kg e os extratos na dose de 500 mg/kg. Após o tratamento de 14 dias, todos os animais foram mortos e tiveram os estômagos retirados, para avaliação macroscópica da área de cicatrização, realização das análises morfológicas e de toxicidade.

1) Análises Morfológicas

a) Avaliação macroscópica

Os estômagos dos animais submetidos aos tratamentos, após sua retirada, foram abertos pela curvatura maior e as lesões foram medidas no maior e menor diâmetro (em mm).

b) Microscopia de luz

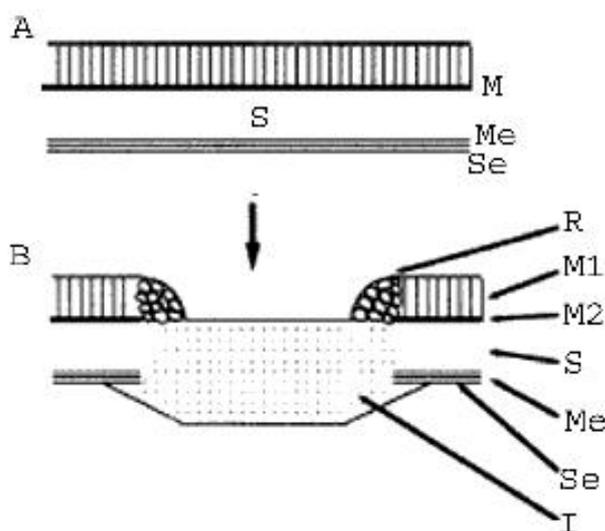
O material destinado à microscopia de luz foi fixado em solução de ALFAC (formalina 30%; álcool 80%; ácido acético), após distender cuidadosamente a amostra em uma placa de isopor e fixada com alfinetes, por 24 horas, a temperatura ambiente.

As peças foram desidratadas e incluídas em paraplast. Posteriormente, os blocos foram cortados em 10 µm de espessura em micrótomo de maneira semi-seriada, onde foi coletado todo corte múltiplo de cinco até aproximadamente 20% do volume da peça. As lâminas cortadas por esse método semi-seriado foram submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H&E) (Behmer *et al.*, 1976), sendo destinadas às análises morfológica e morfométrica.

c) *Morfometria*

A análise morfométrica foi feita no analisador de imagens Leica Q-Win Standard Versão 3.1.0 (Reino Unido) acoplado ao microscópio Leica DM existente no laboratório de análises de imagens do Setor de Histologia do Departamento de Morfologia, sob a orientação da Profa. Dra. Claudia Helena Pellizzon. As medidas das áreas de regeneração e da mucosa normal foram feitas por medidas lineares da luz até a muscular da mucosa (figura 5), seguindo a metodologia descrita por Ishihara & Ito (2002), com modificações. Além das medidas semi-automáticas descritas acima, foram também realizadas contagens de células positivamente marcadas para as diversas reações imunohistoquímicas em número de campos fixos.

Figura 5: Esquema representativo da região do estômago, onde foi realizado o experimento



A. Representação da região não lesada onde: **M**= Mucosa, composta de epitélio de revestimento e suas glândulas, lâmina própria e a muscular da mucosa; **S**= Submucosa; **Me**= Muscular externa; **Se**= Serosa. **B.** Região lesada, onde a seta indica a submucosa exposta. **R**= Área de regeneração; **M1**= Epitélio de revestimento mais glândulas e lâmina própria; **M2**= Muscular da mucosa; **S**= Submucosa; **Me**= Muscular externa; **Se**= Serosa; **I**= Invasão de células do tecido conjuntivo (modificado de Ishihara & Ito, 2002).

d) *Imunohistoquímica*

Os cortes histológicos foram desparafinizados e re-hidratados conforme padrão do laboratório de histologia, posteriormente foram submetidos a recuperação antigênica pelo método do tampão citrato 0,1M em forno de microondas em alta temperatura por 10 minutos. Após a recuperação antigênica, os cortes foram colocados em solução de bloqueio da reação, que foi feito em leite desnatado a 1%, peróxido de hidrogênio a 3% e soro normal de cabra 1% em PBS por uma hora. Esses cortes foram lavados em PBS e posteriormente foram incubados por no

mínimo duas horas, a temperatura ambiente, com anticorpo primário diluído em solução PBS mais BSA 1%.

Após a incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados por 5 vezes, 5 minutos cada, com PBS mais BSA 1%, depois fazendo a incubação com o anticorpo secundário e revelando com os reagentes do kit Vectastain ABC (complexo avidina-biotina). O resultado do processo foi analisado em microscópio LEICA e as imagens capturadas pelo software Leica Q-Win. Os controles das reações foram realizados de acordo com as instruções do fabricante dos anticorpos.

Foram utilizados anticorpos anti-PCNA (marcador de divisão celular, para avaliar potencial de regeneração), anti-COX-2 (ciclooxigenase-2, para avaliar efeitos sobre inflamação), anti-SOD (superóxido dismutase, para avaliar a atividade antioxidante sobre os radicais superóxidos), e anti-CXCR4 (CX chemokine receptor 4, marcador endotelial para avaliar efeito sobre angiogênese).

2) Avaliação da atividade tóxica subaguda dos extratos

Como parâmetros adicionais de atividade biológica, foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos subagudos dos extratos sobre os animais submetidos ao tratamento diariamente com os extratos durante 14 dias. Os parâmetros analisados foram peso corporal e análise macroscópica dos órgãos vitais: coração, pulmões, fígado, baço e rins. Além disso, o sangue dos animais foi coletado para análise de alterações de parâmetros bioquímicos e enzimáticos, que compreendem a avaliação dos níveis séricos de glicose, γ -GT (gama glutamiltransferase), uréia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). Para a quantificação utilizou-se o analisador bioquímico automático Cobas Mira S[®] (Roche) e kits cinéticos e colorimétricos CELM[®], Brasil, disponibilizado para uso pela Seção de Bioquímica do Laboratório de

Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu, aos cuidados de Maria Salete Sartori e Dra. Adriana Polachini do Valle.

III.4 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DAS FRAÇÕES DE *M. elliptica* E *B. basiloba*

III.4.1 – ATIVIDADE GASTROPROTETORA E MECANISMOS DE AÇÃO

A. Doses empregadas nos experimentos com frações

As doses das frações foram determinadas a partir de uma relação com aquelas empregadas nos controles positivos (100 mg/kg para cimetidina ou carbenoxolona). Uma vez que as drogas padrão são substâncias puras, o uso de doses similares a desses controles e a comprovação de atividade gastroprotetora pelo uso das frações (mistura de várias substâncias), indicariam sua potência, havendo um direcionamento dos estudos para a elucidação dos mecanismos ação envolvidos com tal atividade. Desta forma, foi estabelecida uma curva de 25, 50 e 100 mg/Kg para a fração acetato de etila de *Mouriri elliptica* (FAEME), e de 50, 100 e 200 no caso da fração aquosa de *Byrsonima basiloba* (FABB).

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

Este modelo foi realizado como descrito anteriormente. Tanto a FAEME como a FABB foram submetidas a este modelo experimental.

C. Indução de úlcera por Droga Antiinflamatória Não Esteroidal (DAINE)

Este modelo foi realizado como descrito anteriormente. Neste caso, somente a FAEME foi testada.

D. Determinação dos níveis de prostaglandina E₂ basal da mucosa gástrica

Após 18 horas de jejum, ratos Wistar machos foram divididos em 7 grupos, sendo que 3 grupos receberam injeção subcutânea de indometacina (30 mg/kg), e outros 3 grupos receberam salina pela mesma via. O sétimo grupo trata-se do controle “sham”. Trinta minutos depois, os grupos sofreram administração oral dos respectivos tratamentos: salina, FAEME 100 mg/Kg ou FABB 200 mg/Kg. Passados 30 minutos os animais foram mortos e seus estômagos retirados para o preparo do material. A porção do corpo estomacal foi raspada para a retirada da mucosa gástrica, em seguida pesada e suspensa em 1mL de tampão fosfato de sódio (10 mM) de pH 7,4. O tecido foi homogeneizado com o uso de um Polytron[®] PT-10-35 (Kinematica AG-Switzerland), e incubado em banho-maria a 37°C por 20 minutos. A prostaglandina E₂ contida no tampão foi mensurada com o uso de um kit imunoenzimático (Parameter[™] PGE₂ Assay – R&D Systems), e a leitura realizada em leitor de ELISA.

III.5 - 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 quando o número de grupos era maior que 2. No caso da análise entre 2 grupos, recorreu-se ao teste “t” de Student não pareado (unpaired t test). A escolha dos testes citados se baseou no tipo dos dados analisados, sendo que estes se classificam como dados contínuos que obedecem a uma distribuição gaussiana (paramétrica). A significância mínima considerada foi de $p < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad InStat[®] versão 3.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA).

IV - RESULTADOS

IV.1 – EXTRATO METANÓLICO DE *Mouriri elliptica* (EMME)

A – “SCREENING” HIPOCRÁTICO E TOXICIDADE AGUDA

A administração da dose de 5000 mg/Kg do EMME, avaliados tanto em camundongos machos como fêmeas, não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados (dados não apresentados) quando comparados aos obtidos com o grupo de animais tratados com salina. O monitoramento diário do peso dos animais não indicou variação significativa em relação ao grupo salina (Figuras 6 e 7), e também não ocorreram mortes durante o período de observação (14 dias).

Figura 6 - Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do extrato metanólico de *M. elliptica* 5000 mg/Kg

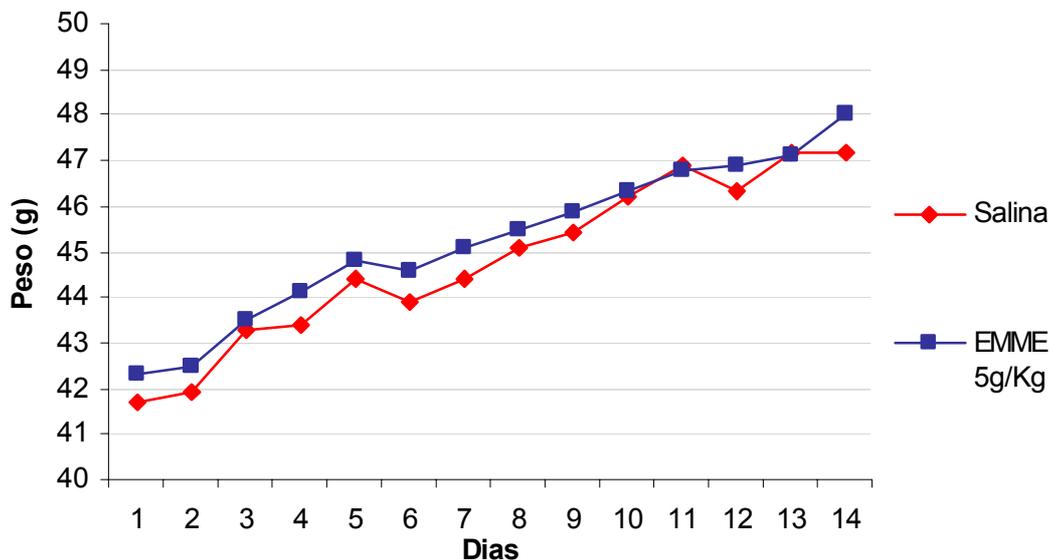
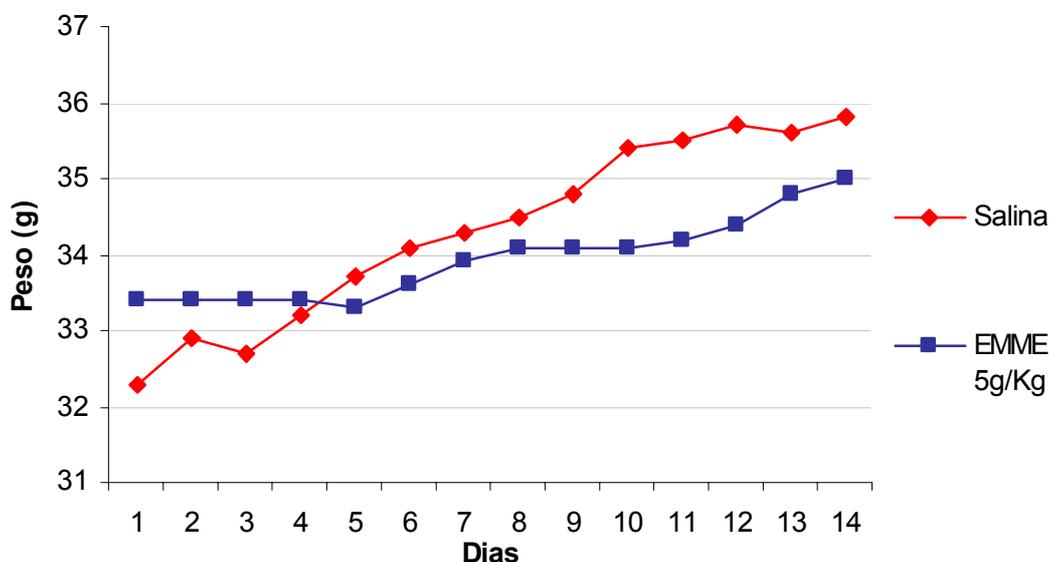


Figura 7 - Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratadas com dose única do extrato metanólico de *M. elliptica* 5000 mg/Kg



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 2).

Tabela 2 - Efeito da administração aguda do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos e fêmeas

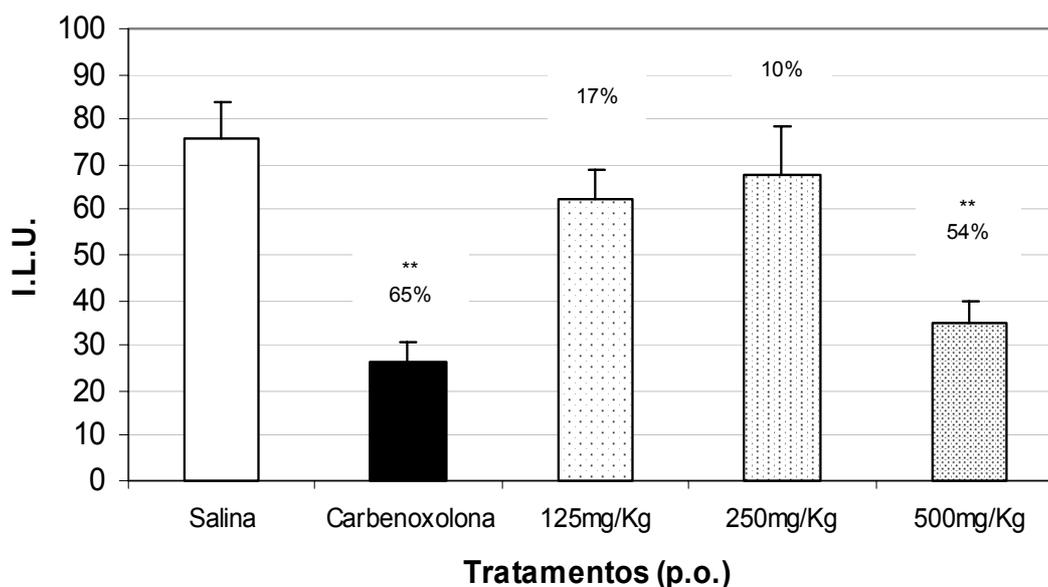
	Tratamentos (p.o.)	N	Fígado	Coração	Pulmão	Rins	Baço
Machos	Salina	9	13,84 ± 0,17	3,99 ± 0,05	4,46 ± 0,07	6,29 ± 0,08	3,99 ± 0,18
	EMME 5g/Kg	8	13,62 ± 0,29	3,84 ± 0,07	4,50 ± 0,11	6,12 ± 0,05	3,68 ± 0,13
Fêmeas	Salina	10	12,86 ± 0,14	3,99 ± 0,07	4,73 ± 0,09	5,72 ± 0,07	3,56 ± 0,10
	EMME 5g/Kg	9	12,90 ± 0,13	3,89 ± 0,16	5,63 ± 0,74	6,11 ± 0,27	3,79 ± 0,13

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformados em arcoseno. 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

Neste modelo, o EMME apresentou significativo efeito gastroprotetor com a maior dose utilizada do extrato (500 mg/Kg), obtendo-se 54% de proteção em relação ao grupo controle negativo. Já o grupo controle positivo (carbenoxolona 100 mg/Kg) conferiu uma proteção de 65%. As menores doses do extrato (125 e 250 mg/Kg) não apresentaram redução significativa das lesões (Figura 8).

Figura 8 – Ação do extrato metanólico de *M. elliptica* no modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol em camundongos

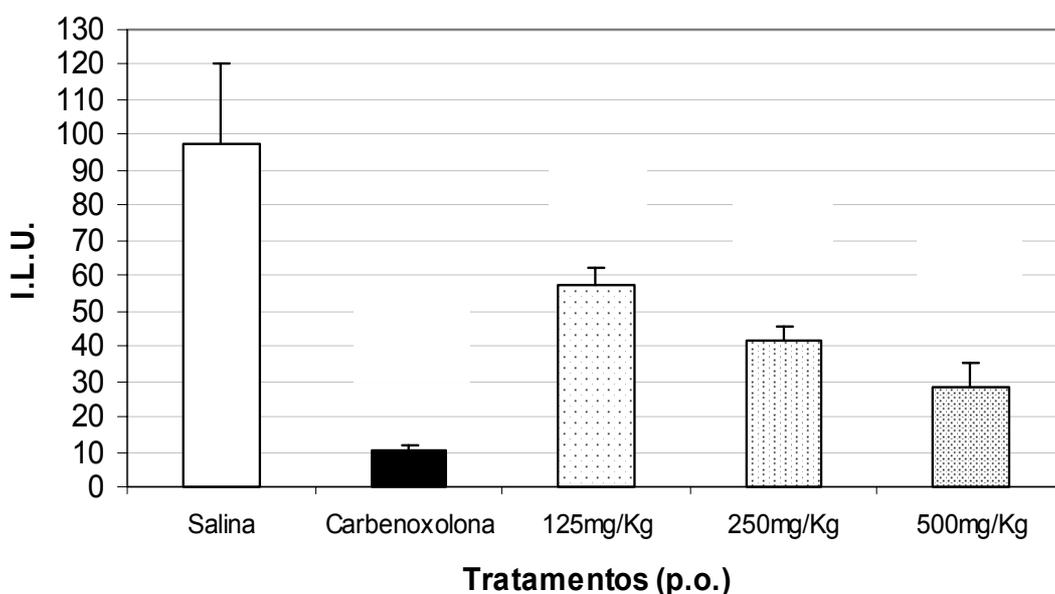


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

C – MODELO DE INDUÇÃO DE ÚLCERA POR ETANOL ABSOLUTO

O EMME conferiu um efeito gastroprotetor significativo nas doses de 250 e 500 mg/Kg, com porcentagens de proteção de 58% e 71% respectivamente. No caso do grupo controle positivo, a taxa de proteção observada foi de 89%. O grupo de animais tratado na dose de 125 mg/Kg também apresentou uma redução média no índice de lesões, porém sem relevância estatística (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos

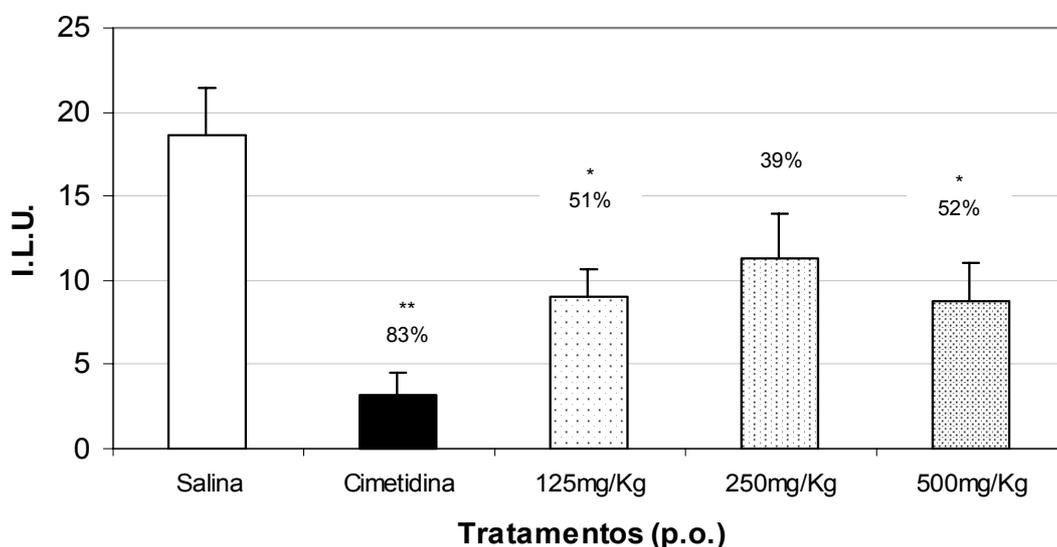


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

D – MODELO DE INDUÇÃO DE ÚLCERA POR DROGA ANTIINFLAMATÓRIA NÃO-ESTEROIDAL (PIROXICAM)

Figura 10 - O extrato também conferiu gastroproteção frente às lesões induzidas por piroxicam, nas doses de 125 e 500mg/Kg (51% e 52% de proteção respectivamente). O controle positivo carbenoxolona foi o que apresentou melhor resultado, com redução de 83% na média de lesões. Uma possível explicação para o não aparecimento de proteção significativa na dose de 250 mg/Kg pode estar atribuída ao valor considerável de erro padrão da média (EPM) nos grupos salina e EMME 250 mg/Kg.

Figura 10 - Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* em modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não esteroidal (Piroxicam) em camundongos



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

E – ÚLCERAS INDUZIDAS PELA LIGADURA DE PILORO E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SUCO GÁSTRICO

A análise da tabela 3 - referente aos valores de pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de íons H^+ - permite afirmar que o EMME (500 mg/Kg) não alterou estes parâmetros de maneira significativa, seja por tratamento oral ou por tratamento intraduodenal. No caso do controle positivo cimetidina, apesar de não ter ocorrido alterações no volume do conteúdo gástrico, verificou-se um efeito inibitório da secreção ácida pela observação conjunta do aumento significativo de pH somado à diminuição da concentração de H^+ , nas duas vias de administração avaliadas.

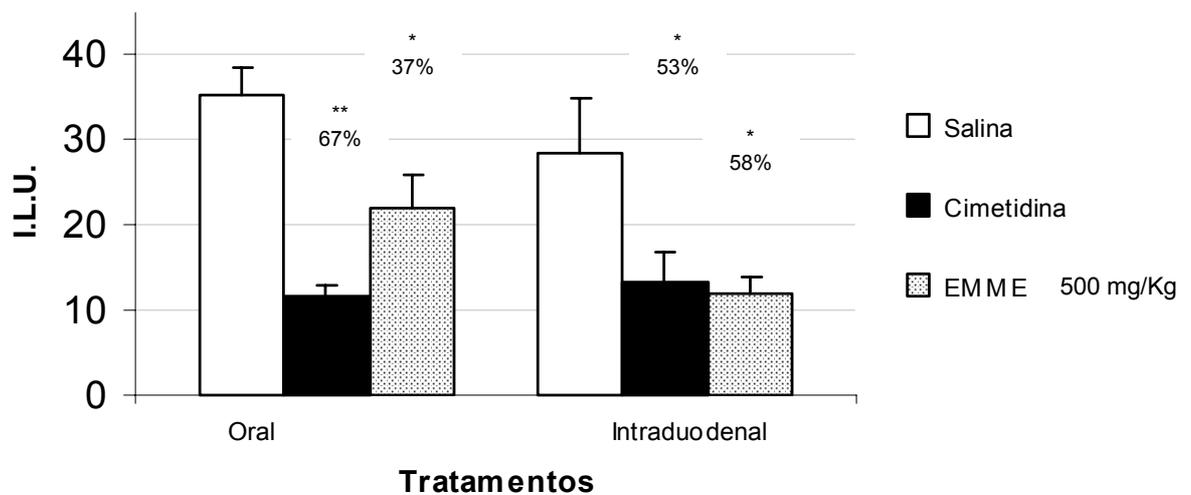
Tabela 3 – Efeito da administração oral ou intraduodenal do extrato metanólico de *M. elliptica* sobre o pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de H^+ no modelo de ligadura de piloro em ratos

	<i>pH</i>		
	SALINA	CIMETIDINA	EMME
Piloro Oral	1,57 ± 0,20	3,43 ± 0,81*	1,43 ± 0,20
Piloro Intraduodenal	1,43 ± 0,20	2,57 ± 0,48*	1,14 ± 0,14
	<i>Volume do conteúdo gástrico (mL)</i>		
	SALINA	CIMETIDINA	EMME
Piloro Oral	6,34 ± 0,59	4,26 ± 0,79	8,08 ± 0,68
Piloro Intraduodenal	8,15 ± 1,7	4,11 ± 0,42	10,54 ± 2,02
	<i>Concentração de H^+ (mEq $[H^+]$ / mL / 4h)</i>		
	SALINA	CIMETIDINA	EMME
Piloro Oral	17,71 ± 0,23	8,12 ± 1,21**	17,39 ± 0,94
Piloro Intraduodenal	15,81 ± 0,54	8,70 ± 1,00**	14,63 ± 1,49

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

A contagem do índice de lesões também foi realizada neste experimento, para averiguar o comportamento do EMME (500 mg/Kg) frente às lesões induzidas pelo acúmulo de suco gástrico em animais submetidos à ligadura de piloro (Figura 11). E novamente foi constatado um efeito gastroprotetor tanto na administração via oral (37%) como na intraduodenal (58%).

Figura 11 - Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) no modelo de indução de úlcera por ligadura de piloro em ratos

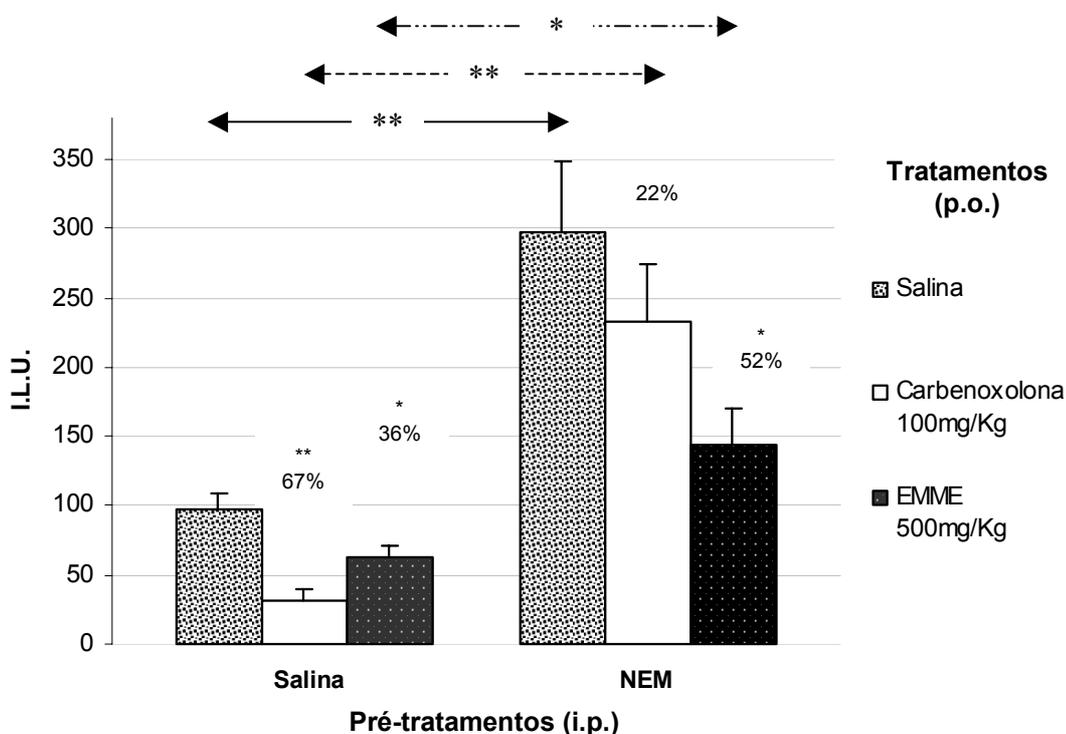


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

F – DETERMINAÇÃO DO PAPEL DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS NA GASTROPROTEÇÃO

A pré-administração da droga NEM intraperitonealmente (i.p.) provocou aumento expressivo das lesões gástricas em comparação aos grupos pré-tratados com salina pela mesma via. É possível verificar essa diferenciação em termos estatísticos pelas flechas transversais traçadas no gráfico (Figura 12) de maneira a comparar os pré-tratamentos com NEM e salina (i.p.). Em ambos os casos, o tratamento com EMME apresentou uma proteção significativa ($p < 0,05$) ao promover 36% de redução das lesões no tratamento com salina (i.p.) e de 52% nos animais pré-tratados com NEM. Porém, a depleção dos grupamentos sulfidrílicos reduziu de forma significativa o efeito gastroprotetor pelo tratamento com EMME.

Figura 12 - Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) frente ao depletor de grupamentos sulfidrílicos endógenos (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol

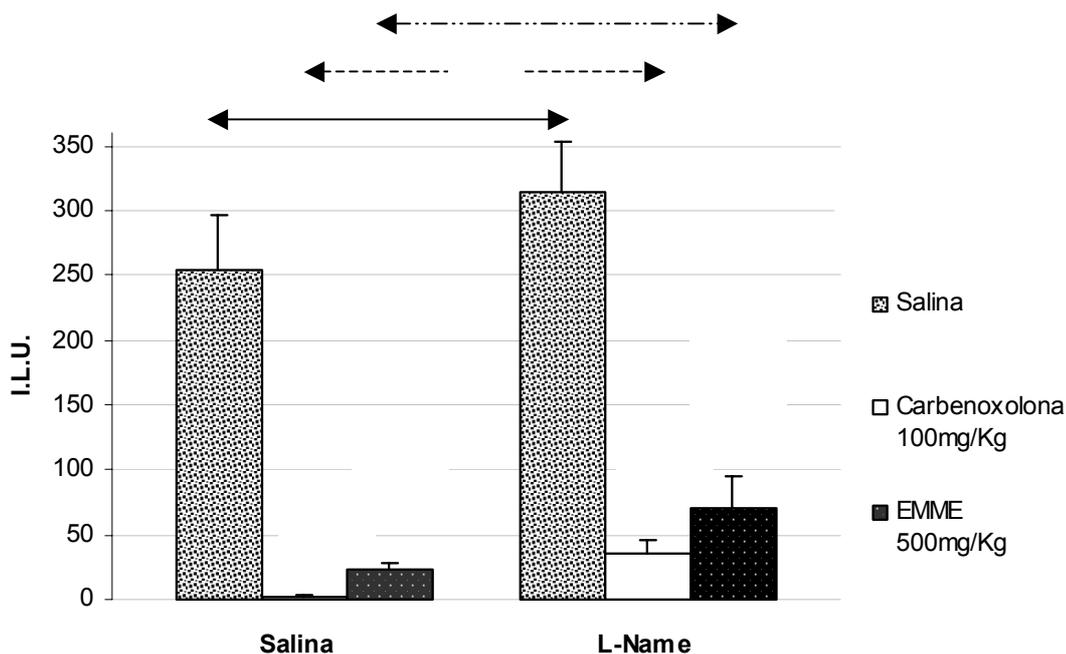


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Análise entre os grupos com o mesmo tratamento (representado por flechas): teste “t” não pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao respectivo grupo tratado com salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

G – DETERMINAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA GASTROPROTEÇÃO

A droga L-NAME foi capaz de aumentar a média de lesões gástricas em ambos os grupos controles (positivo e negativo), em relação aos grupos pré-tratados com salina. No entanto a aplicação do inibidor de NO não exerceu alterações significativas nos animais que receberam EMME pela via oral, pois estes apresentaram significativa gastroproteção (77%) em relação ao seu respectivo grupo controle, enquanto os animais pré-tratados com salina apresentaram 91% de proteção (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) frente ao inibidor de NO endógeno (L-NAME) em modelo de úlcera induzida por Etanol

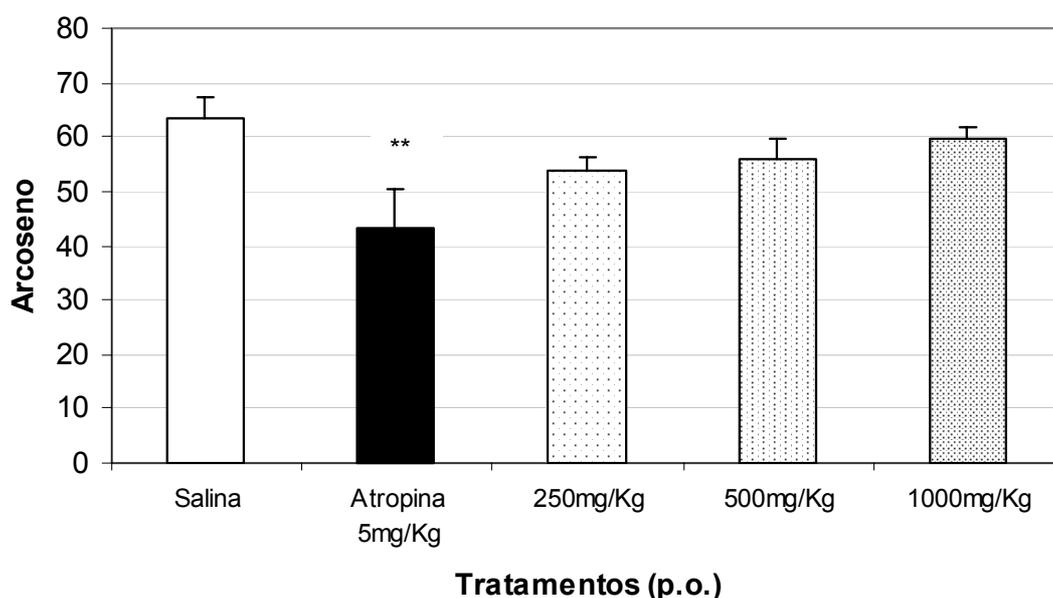


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. Análise entre os grupos com o mesmo tratamento (representado por flechas): teste “t” não pareado. * $p < 0,05$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao respectivo grupo tratado com salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

H – DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

Neste modelo não foi possível observar modificações estatisticamente significativas do trânsito intestinal nos grupos de animais tratados com EMME.

Figura 14 – Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* sobre a motilidade intestinal de camundongos



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

I – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE E TÓXICA

A atividade cicatrizante do EMME (500 mg/Kg) foi avaliada 14 dias após a indução da lesão com ácido acético. Na tabela 4 pode-se observar que o EMME apresentou uma leve atividade cicatrizante em comparação ao grupo salina, porém sem relevância na análise estatística.

Tabela 4 - Efeito do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) sobre o processo de cicatrização em lesões causadas por ácido acético em ratos

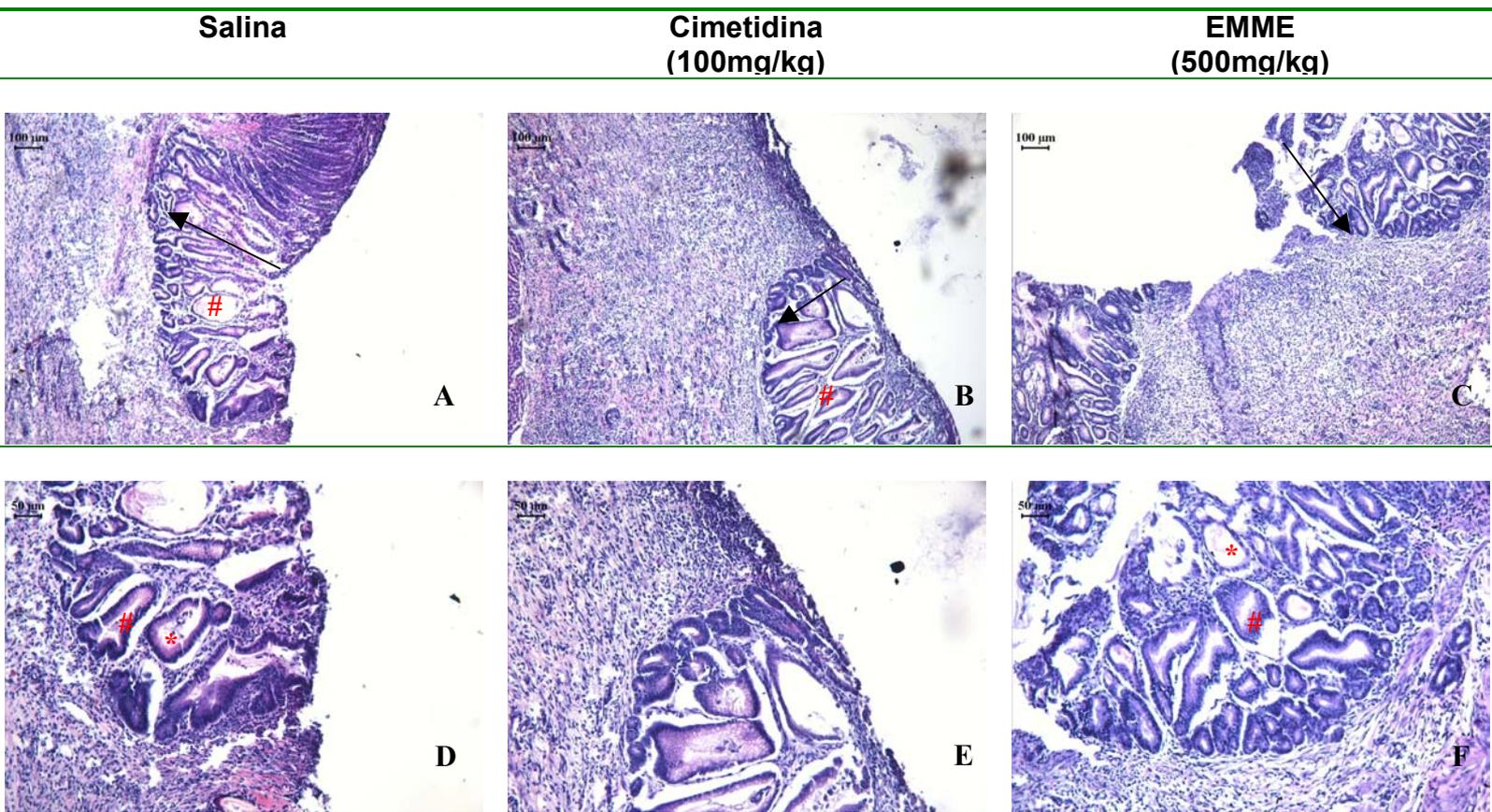
Tratamentos	Doses (mg/Kg)	N	Borda interna (mm)	% de cicatrização	Borda externa (mm)	% de cicatrização
Salina	10mL/Kg	06	46,76 ± 4,48	--	213,63 ± 5,34	--
Cimetidina	100	07	40,56 ± 4,78	13	159,55 ± 17,07	25
EMME	500	04	39,91 ± 5,36	15	175,76 ± 24,32	18

Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Na análise histológica, a fotomicrografia de H&E (Tabela 5) mostra que para A e D (grupo tratado com o veículo salina 10 mL/Kg) pode-se notar a dilatação das glândulas (#) com pouco material sendo secretado na luz (*). Para B (grupo tratado com cimetidina 100 mg/Kg), podemos verificar a dilatação das glândulas (#) mas com um maior produto de secreção na luz. Já para as imagens C e F (grupo tratado com EMME 500 mg/Kg), observa-se uma dilatação das glândulas (#) com o padrão semelhante ao grupo cimetidina, entretanto sem haver grande secreção em sua luz (*). As setas indicam as regiões de regeneração das lesões, que foram utilizadas na análise morfométrica.

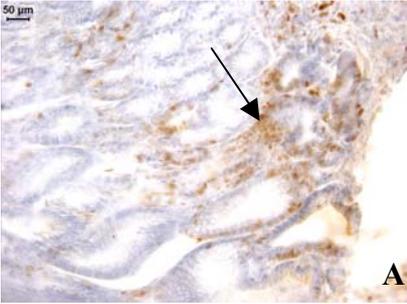
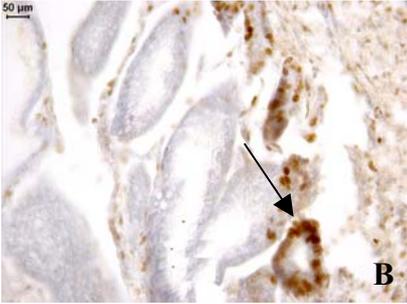
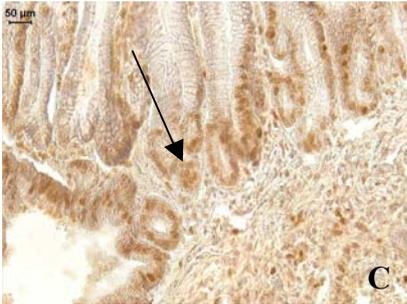
Para a tabela 6, nota-se que os núcleos PCNA positivos são marcados pela reação com a cor marrom, onde A = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), B = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e C = grupo tratado com EMME (500 mg/Kg), sendo observado um maior número de células PCNA positivas no grupo EMME.

Tabela 5: Fotomicrografia de lesões estomacais produzidas por ácido acético em ratos corados com H&E do efeito de cicatrização do extrato metanólico de *Mouriri elliptica* (EMME)



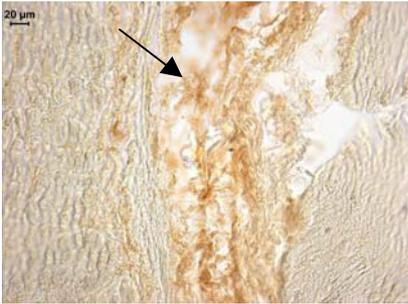
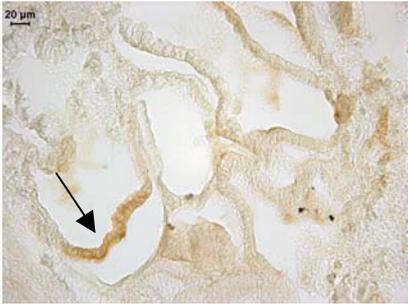
As setas indicam a área utilizada como parâmetro morfométrico (altura) da região de regeneração em lesões gástricas causadas por ácido acético em ratos.

Tabela 6: Análise histológica de estômagos de ratos tratados com salina, cimetidina (100 mg/Kg) e *Mouriri elliptica* (EMME) por 14 dias em imunohistoquímica por PCNA

Salina	Cimetidina (100mg/kg)	EMME (500 mg/kg)
		

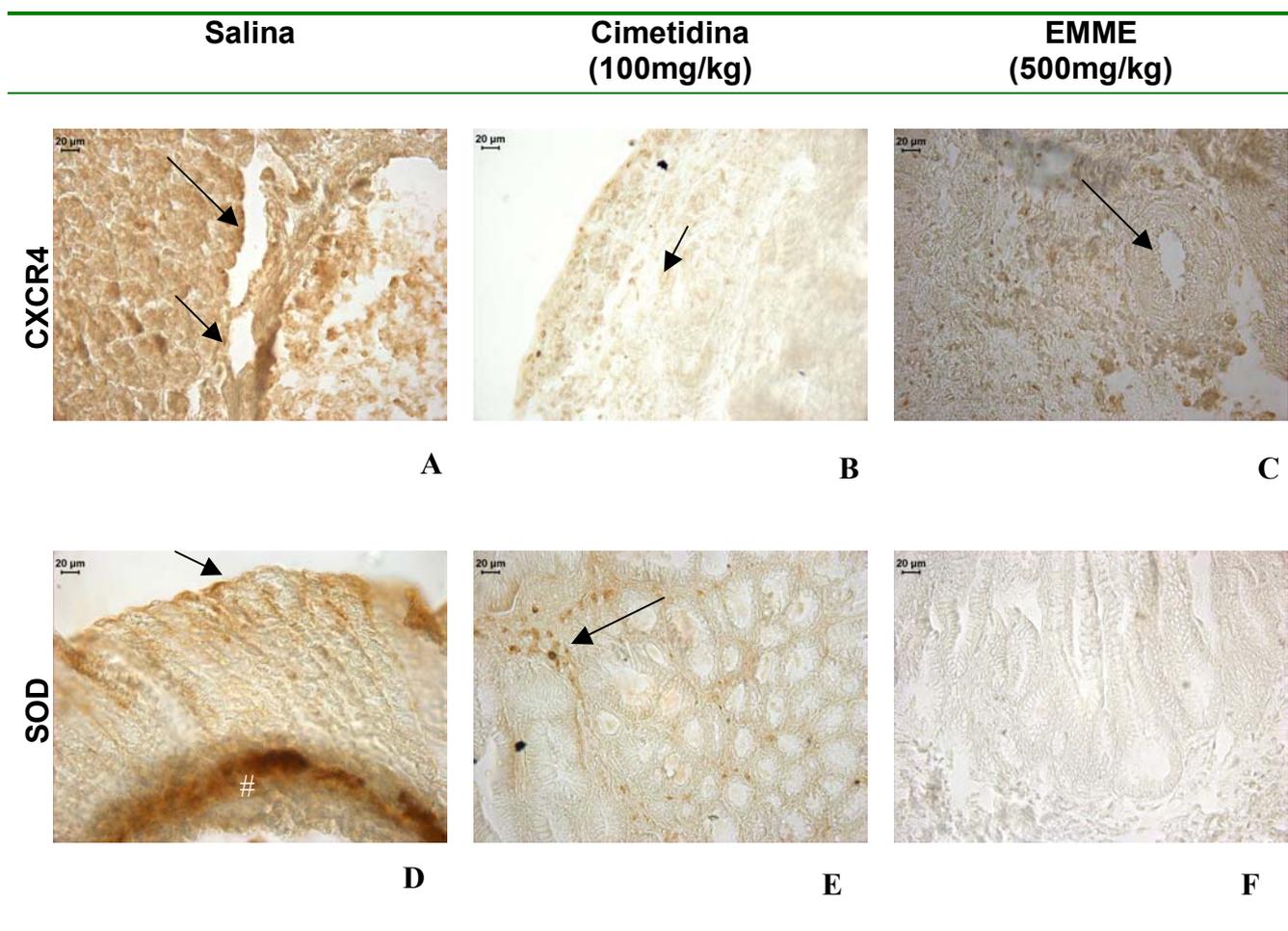
A região de re-organização da mucosa encontra-se com muitas células PCNA positivas (cor marrom, indicado pela seta)

Tabela 7: Análise histológica de estômagos de ratos tratados com salina, cimetidina (100 mg/Kg) e *Mouriri elliptica* (EMME) por 14 dias em imunohistoquímica por COX2.

Salina	Cimetidina (100mg/kg)	EMME (500mg/kg)
		
A	B	C

As setas indicam regiões com expressão de COX-2 (em marrom)

Tabela 8: Análise histológica de estômagos de ratos tratados com salina, cimetidina (100 mg/Kg) e *Mouriri elliptica* (EMME) por 14 dias em imunohistoquímica por CXCR4 e SOD



Para CXCR4: as setas indicam os vasos. Para SOD: as setas indicam a marcação para células SOD positivas. #: possível artefato.

A fotomicrografia de imunohistoquímica para COX₂ (Tabela 7) analisa lesões estomacais de ratos submetidos à indução de úlcera gástrica com ácido acético e revelado com peroxidase.

Notar que as células das regiões COX₂ positivas são marcadas pela reação com a cor marrom, onde A = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), B = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e C = grupo tratado com EMME (500 mg/Kg). Observa-se um maior número de células COX₂ positivas no grupo EMME quando comparada com os demais grupos.

Já nas fotomicrografias da tabela 8, nota-se que os núcleos SOD positivos são marcados pela reação com a cor marrom. E os vasos ficam evidenciados pela positividade com CXCR4, onde A = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), B = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e C = grupo tratado com EMME (500 mg/Kg), verificando-se uma maior evidência dos vasos da submucosa graças a imunomarcação com CXCR4.

Em D = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), E = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e F = grupo tratado com EMME (500 mg/Kg) observa-se que a positividade para SOD no grupo salina e uma maior positividade na região apical da glândula. No grupo cimetidina observamos algumas células SOD positivas na região da lâmina própria, e no grupo EMME não observamos positividade para essa enzima.

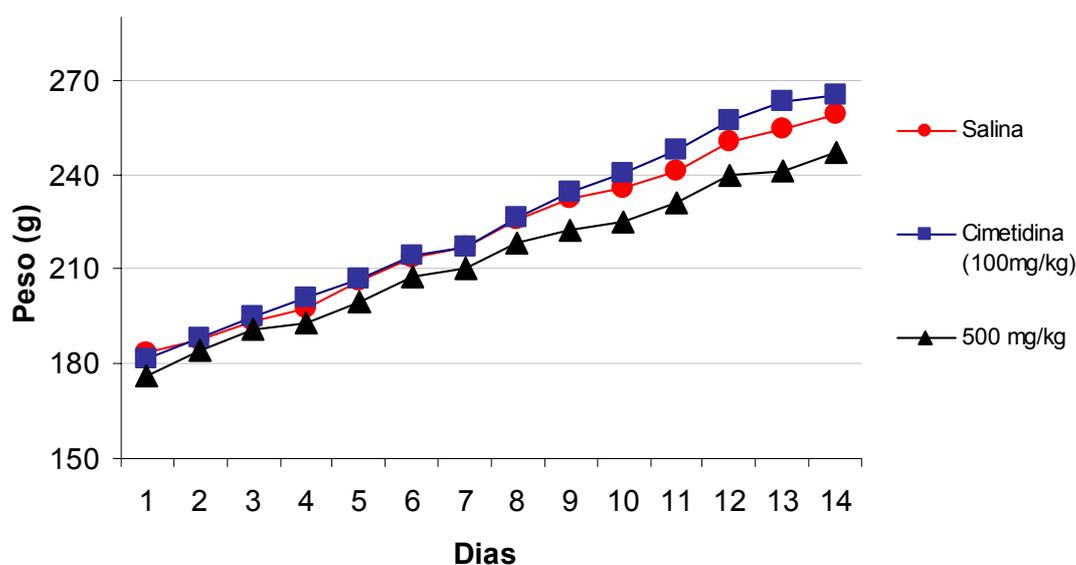
Os estudos de toxicidade subaguda do EMME englobaram o monitoramento diário do peso corporal dos animais (Figura 15) e a relação peso dos órgãos vitais dividido pelo peso corporal (Tabela 9). A análise destes dados não indicou efeitos tóxicos subagudos após tratamento oral diário de 500 mg/Kg durante 14 dias.

Tabela 9 - Efeito da administração subaguda do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) sobre os órgãos vitais em ratos submetidos ao modelo de indução lesões gástricas por ácido acético

Tratamentos (p.o)	Dose (mg/Kg)	Fígado	Coração	Pulmões	Rins	Baço	Mortalidade
Salina	10 mL/Kg	10,22 ± 0,11	3,95 ± 0,05	4,38 ± 0,11	5,24 ± 0,07	3,05 ± 0,05	0/8
Cimetidina	100	10,30 ± 0,13	3,84 ± 0,06	4,44 ± 0,15	5,06 ± 0,04	3,00 ± 0,07	0/9
EMME	500	10,38 ± 0,37	4,00 ± 0,16	4,43 ± 0,27	5,21 ± 0,11	3,24 ± 0,14	0/6

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformados em arcoseno. Valores expressos em média (arcoseno) ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Figura 15 - Evolução do peso corporal de ratos frente ao tratamento diário com *M. elliptica* durante 14 dias em experimento de indução de lesões gástricas por ácido acético



Em relação à análise dos parâmetros bioquímicos, a única alteração observada foi a diminuição dos níveis de creatinina pelo grupo de animais tratados com EMME (Tabela 10), cuja média situou-se em 0,34 mg/dL contra 0,48 mg/dL dos animais tratados com salina.

Tabela 10 - Efeito da administração subaguda do extrato metanólico de *M. elliptica* (EMME) sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade em ratos submetidos ao modelo de indução de lesões gástricas por ácido acético

	<i>Salina</i>	<i>Cimetidina</i>	<i>EMME 500</i> <i>mg/Kg</i>
<i>Glicose (mg/dL)</i>	40,25 ± 3,54	42,33 ± 4,52	42,67 ± 3,28
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,03**
Uréia (mg/dL)	38,38 ± 2,28	36,33 ± 1,61	40,00 ± 3,42
γ-GT (U/L)	2,20 ± 0,20	3,33 ± 1,86	2,33 ± 0,33
AST (U/L)	225,00 ± 18,18	191,22 ± 5,86	212,50 ± 12,90
ALT (U/L)	53,13 ± 7,33	61,11 ± 6,81	44,00 ± 6,09

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

IV.2 – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Mouriri elliptica* (FAEME)

A – JUSTIFICATIVAS PARA OS ENSAIOS DE GASTROPROTEÇÃO COM A FAEME

A fração acetato de etila, que é derivada do extrato metanólico das folhas de *M. elliptica*, foi incluída nos estudos de gastroproteção após os perfis cromatográficos indicarem que a FAEME concentra todas as catequinas e flavonóides presentes no EMME. As classes de substâncias citadas são bastante conhecidas cientificamente por possuírem atividade gastroprotetora, e assim se tornam candidatas pelo efeito gastroprotetor observado no EMME. Mantendo esta linha de raciocínio, e sabendo que

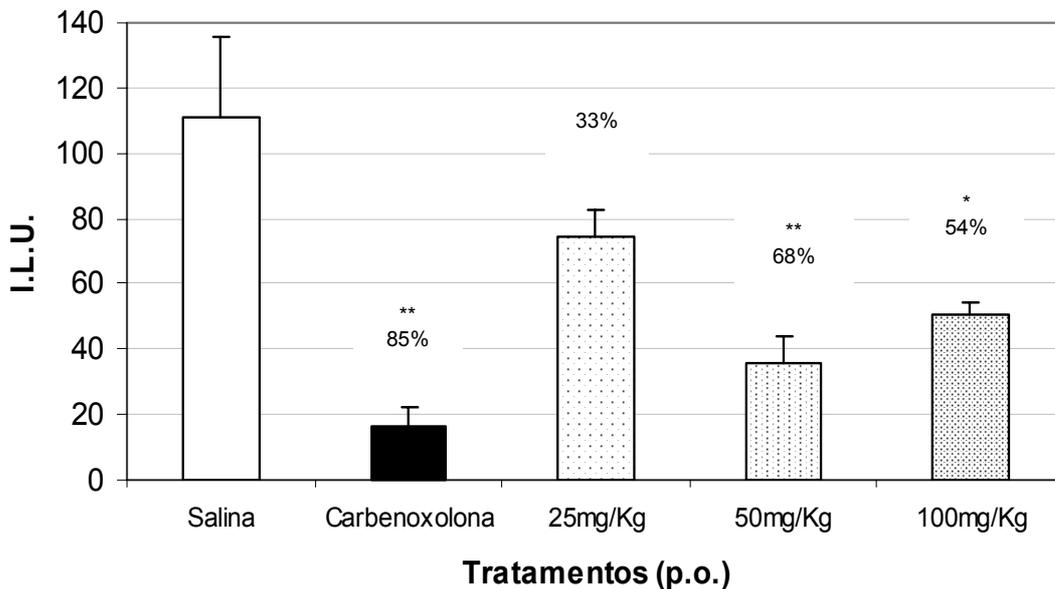
estas substâncias se encontram mais concentradas na FAEME do que no EMME, espera-se que haja uma diminuição na dose efetiva de gastroproteção pela fração.

B – MODELO DE INDUÇÃO DE ÚLCERA POR ETANOL ABSOLUTO

Figura 16 - A FAEME conferiu gastroproteção nas doses de 50 mg/Kg (68%) e 100 mg/Kg (54%) no modelo de indução de lesões por etanol absoluto.

Ainda para este modelo experimental, a comparação da menor dose efetiva do EMME (ver Figura 9) versus a menor dose efetiva da FAEME observada aqui confronta 250 mg/Kg e 50 mg/Kg respectivamente, reduzindo portanto a menor dose efetiva em 5 vezes.

Figura 16 - Efeito da fração acetato de etila de *M. elliptica* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos

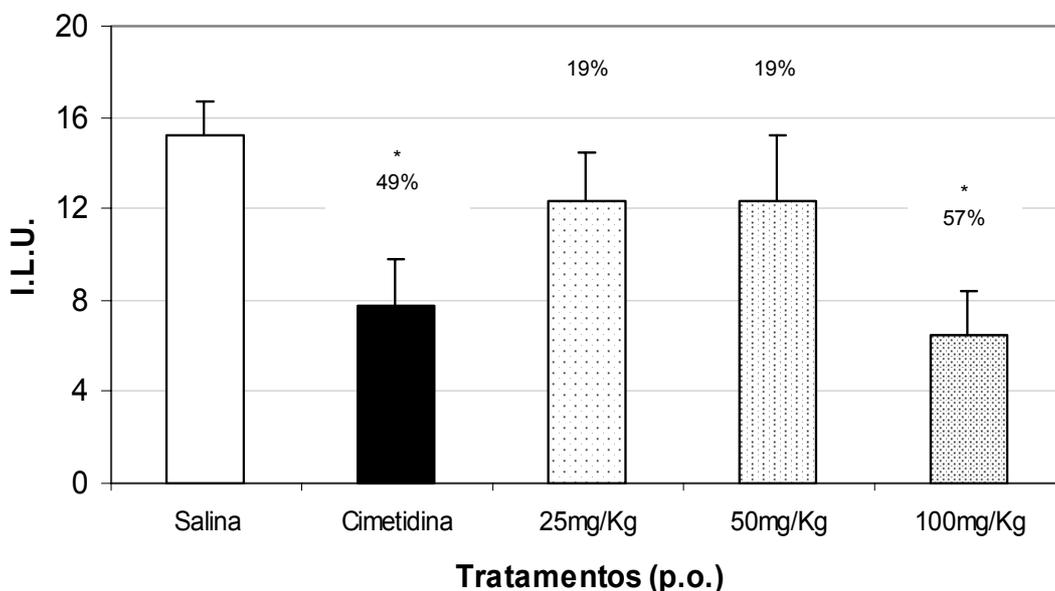


Valores expressos em média ± erro padrão da média. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

C – MODELO DE INDUÇÃO DE ÚLCERA POR DROGA ANTIINFLAMATÓRIA NÃO-ESTEROIDAL (PIROXICAM)

Figura 17 - Neste modelo, a FAEME conferiu gastroproteção na dose de 100 mg/Kg (com 57% de proteção). Comparando este dado ao desempenho do EMME neste mesmo modelo (figura 10), temos para este a menor dose efetiva de 125 mg/Kg com 51% de proteção.

Figura 17 - Efeito da fração acetato de etila de *M. elliptica* em modelo de indução de úlcera por droga antiinflamatória não esteroideal (Piroxicam) em camundongos

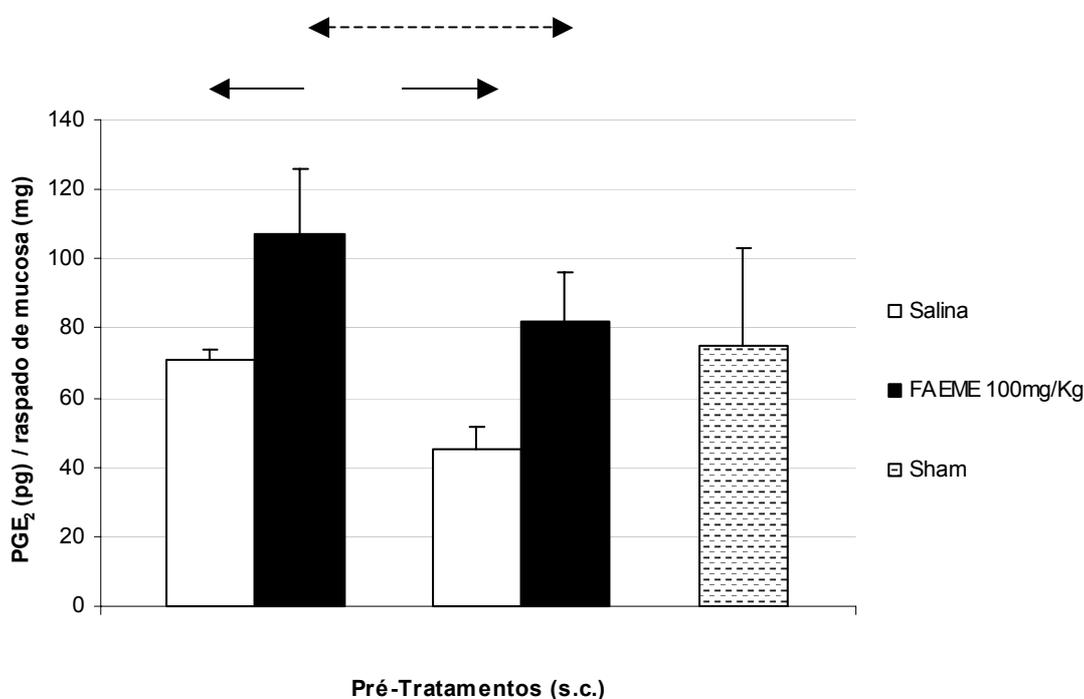


Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

D - DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROSTAGLANDINA E₂ BASAL DA MUCOSA GÁSTRICA

Figura 18 – Este experimento avaliou o comportamento da FAEME frente à expressão de prostaglandina E₂. A comparação entre os grupos controle salina e indometacina (barras brancas) evidencia uma redução drástica na expressão deste mediador ($p < 0,01$), o que já era esperado visto que a inibição de prostaglandinas é uma atividade bastante conhecida para as DAINEs. Para a FAEME, foi observado um aumento importante na expressão de PGE₂ em relação ao grupo salina, porém sem significância estatística devido talvez ao desvio elevado dos valores observados dentro do grupo. Em comparação aos grupos pré tratados com indometacina, a FAEME foi capaz de sustentar os níveis de PGE₂ elevados ($p < 0,05$).

Figura 18 - Efeito da fração acetato de etila de *M. elliptica* (FAEME) sobre a expressão de PGE₂ basal da mucosa gástrica de ratos



Valores expressos em média \pm erro padrão da quantificação de PGE₂ (picogramas) dividido pelo peso do raspado de mucosa (em miligramas). Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$. Análise entre os grupos com o mesmo tratamento (representado por flechas): teste “t” não pareado. ** $p < 0,01$.

IV.3 – EXTRATO METANÓLICO DE *Byrsonima basiloba* (EMBB)

A – “SCREENING” HIPOCRÁTICO E TOXICIDADE AGUDA

A administração da dose de 5000 mg/Kg do EMBB, avaliados tanto em camundongos machos como fêmeas, não provocou alterações nos parâmetros comportamentais analisados (dados não apresentados) quando comparados aos obtidos com o grupo de animais tratados com salina. O monitoramento diário do peso dos animais não indicou variação significativa em relação ao grupo controle negativo (Figuras 19 e 20), e também não ocorreram mortes durante o período de observação.

Figura 19 - Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) 5000 mg/Kg

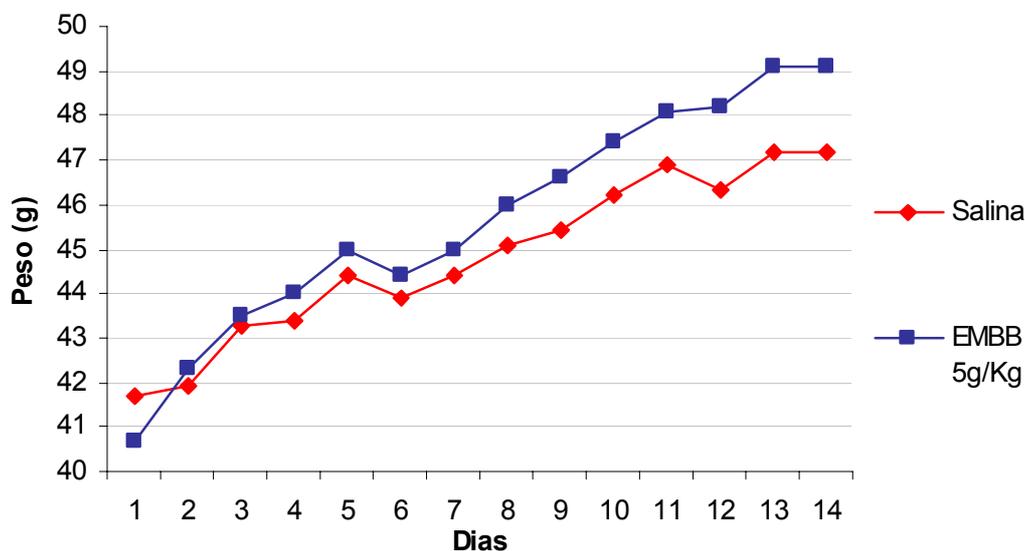
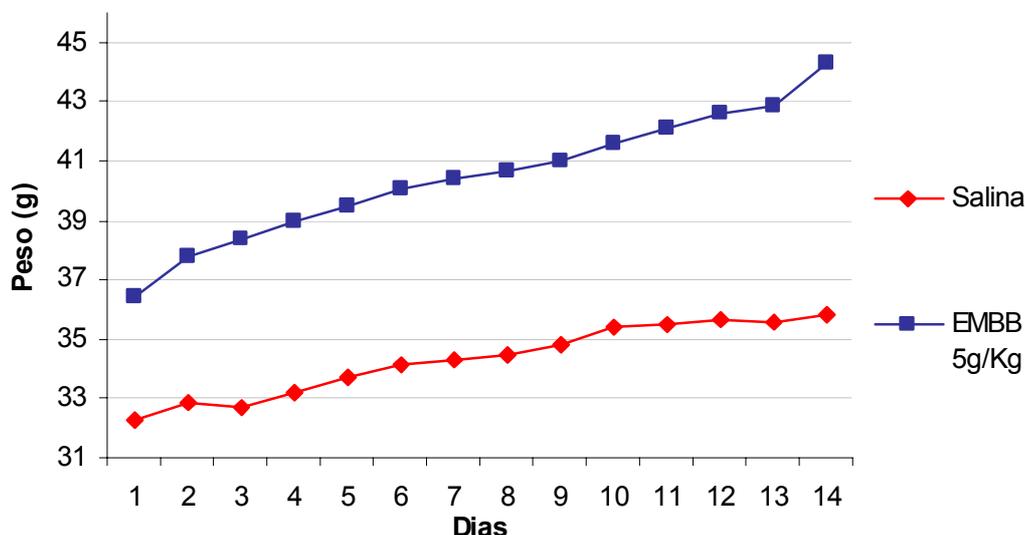


Figura 20 - Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratadas com dose única do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) 5000 mg/Kg



O peso relativo dos órgãos também foi analisado, e a média da razão obtida foi transformada em arcoseno para uma melhor 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 11).

Tabela 11 - Efeito da administração aguda do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos e fêmeas

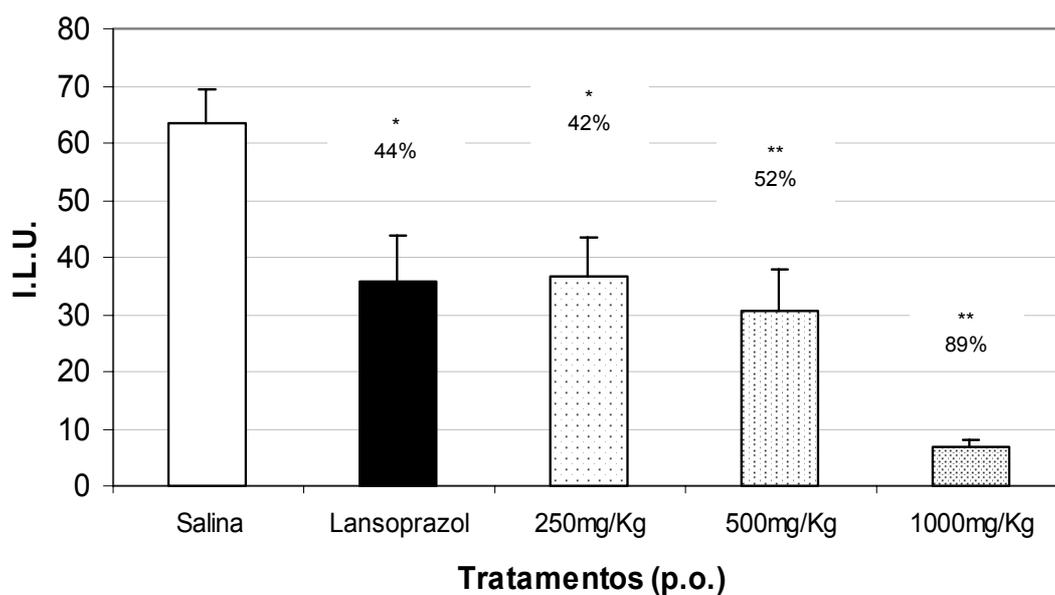
	Tratamentos (p.o.)	N	Fígado	Coração	Pulmão	Rins	Baço
Machos	Salina	9	13,84 ± 0,17	3,99 ± 0,05	4,46 ± 0,07	6,29 ± 0,08	3,99 ± 0,18
	EMME 5g/Kg	9	13,52 ± 0,19	3,97 ± 0,07	4,55 ± 0,10	6,07 ± 0,10	3,63 ± 0,18
Fêmeas	Salina	10	12,86 ± 0,14	3,99 ± 0,07	4,73 ± 0,09	5,72 ± 0,07	3,56 ± 0,10
	EMME 5g/Kg	8	12,44 ± 0,23	3,87 ± 0,06	4,67 ± 0,17	5,67 ± 0,09	3,64 ± 0,18

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformados em arcoseno. 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

Neste modelo o EMBB apresentou gastroproteção nas 3 doses testadas (250, 500 e 1000 mg/Kg), apresentando uma típica “curva dose-efeito”(Figura 21). Também é importante ressaltar que as doses de 500 e 1000 mg/Kg tiveram porcentagem de proteção superior à porcentagem apresentada pelo grupo controle positivo (52% e 89% contra 44%).

Figura 21 – Ação do extrato metanólico de *B. basiloba* no modelo de indução de úlcera por HCl/Etanol em camundongos

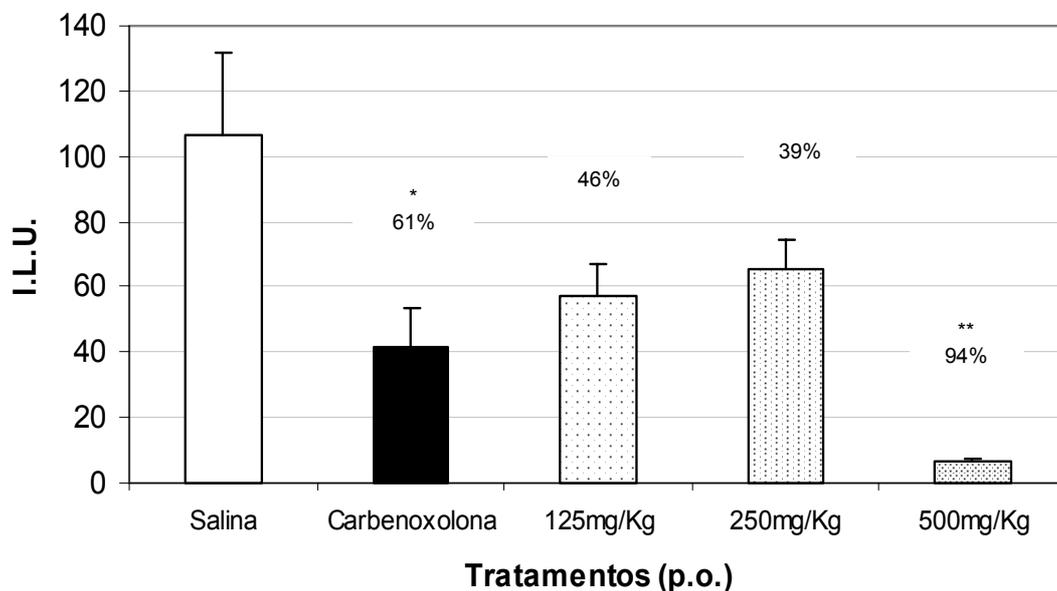


Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

C – MODELO DE INDUÇÃO DE ÚLCERA POR ETANOL ABSOLUTO

Para este ensaio, o EMBB foi estatisticamente eficaz na dose de 500 mg/Kg (Figura 22), com uma proteção de 94% contra 61% conferido pelo grupo controle positivo carbenoxolona (100 mg/Kg).

Figura 22 - Efeito do extrato metanólico de *B. basiloba* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos



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

D – ÚLCERAS INDUZIDAS PELA LIGADURA DE PILORO E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SUCO GÁSTRICO

A análise da tabela 7 - referente aos valores de pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de íons H^+ respectivamente – mostra que a única alteração conferida pelo EMBB (500 mg/Kg) se refere a um aumento no volume do conteúdo gástrico no

tratamento oral (média de 9,3 mL), sendo que o grupo de animais tratados com salina *p.o.* atingiu uma média de 6,34 mL. Já no caso do controle positivo cimetidina, apesar de não ter ocorrido alterações no volume do conteúdo gástrico, verificou-se um efeito inibitório da secreção ácida pela observação conjunta do aumento significativo de pH somado à diminuição da concentração de H⁺, nas duas vias de administração avaliadas.

Tabela 12 – Efeito da administração oral ou intraduodenal do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) sobre o pH, volume do conteúdo gástrico e concentração de H⁺ no modelo de ligadura de piloro em ratos

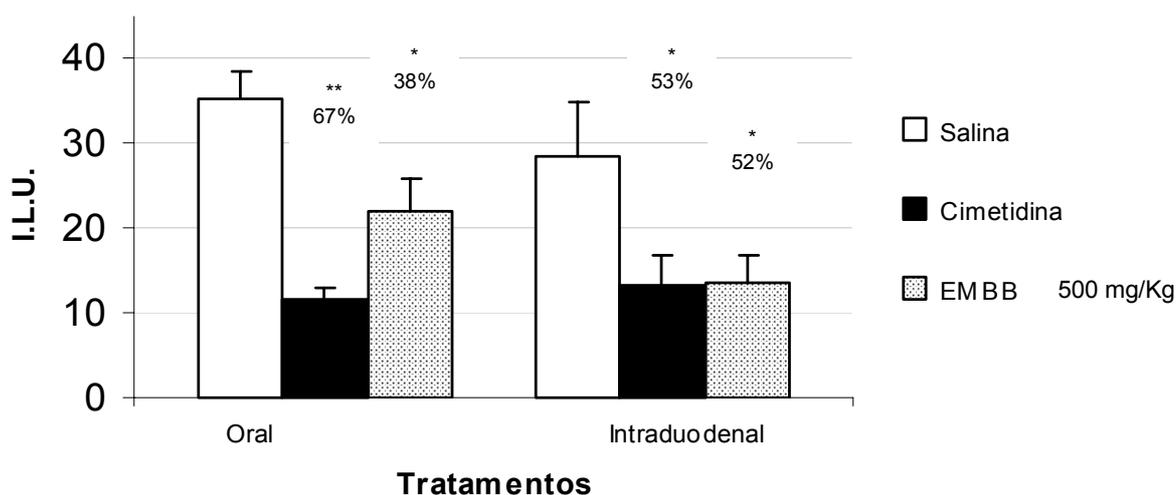
	<i>pH</i>		
	SALINA	CIMETIDINA	EMME
Piloro Oral	1,57 ± 0,20	3,43 ± 0,81*	1,29 ± 0,18
Piloro Intraduodenal	1,43 ± 0,20	2,57 ± 0,48*	1,86 ± 0,14
	<i>Volume do conteúdo gástrico (mL)</i>		
	SALINA	CIMETIDINA	EMME
Piloro Oral	6,34 ± 0,59	4,26 ± 0,79	9,23 ± 0,87*
Piloro Intraduodenal	8,15 ± 1,7	4,11 ± 0,42	8,06 ± 1,74
	<i>Concentração de H⁺ (mEq [H⁺] / mL / 4h)</i>		
	SALINA	CIMETIDINA	EMME
Piloro Oral	17,71 ± 0,23	8,12 ± 1,21**	17,58 ± 1,29
Piloro Intraduodenal	15,81 ± 0,54	8,70 ± 1,00**	16,62 ± 1,46

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

A contagem do índice de lesões também foi realizada neste experimento, para averiguar o comportamento do EMBB (500 mg/Kg) frente às lesões induzidas pelo acúmulo de suco gástrico em animais submetidos à ligadura de piloro (Figura 23). E

novamente foi constatado um efeito gastroprotetor de EMBB tanto na administração via oral (38%) como na intraduodenal (52%).

Figura 23 - Efeito do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) no modelo de indução de úlcera por ligadura de piloro em ratos



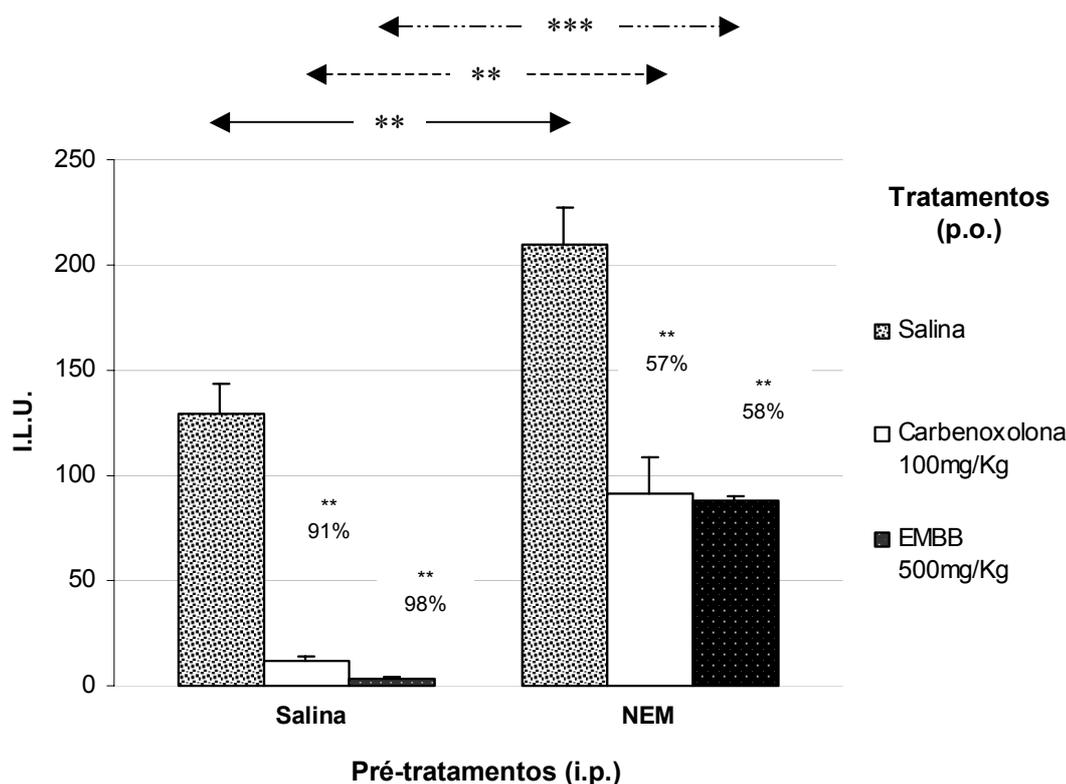
Tratamentos
Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

E - DETERMINAÇÃO DO PAPEL DOS GRUPAMENTOS SULFIDRÍLICOS NA GASTROPROTEÇÃO

A pré-administração da droga NEM intraperitonealmente (i.p.) provocou aumento expressivo das lesões gástricas em comparação aos grupos pré-tratados com salina pela mesma via. É possível verificar essa diferenciação em termos estatísticos pelas flechas transversais traçadas no gráfico (Figura 24) de maneira a comparar os pré-tratamentos com NEM e salina (i.p.). Em ambos os casos, o tratamento com EMBB apresentou uma proteção significativa ($p < 0,01$) ao promover 98% de redução das lesões no tratamento com salina (i.p.) e de 58% nos animais pré-tratados com NEM.

Porém, a depleção dos grupamentos sulfidrílicos reduziu de forma significativa o efeito gastroprotetor pelo tratamento com EMBB.

Figura 24 - Efeito do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) frente ao depletor de grupamentos sulfidrílicos endógenos (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol



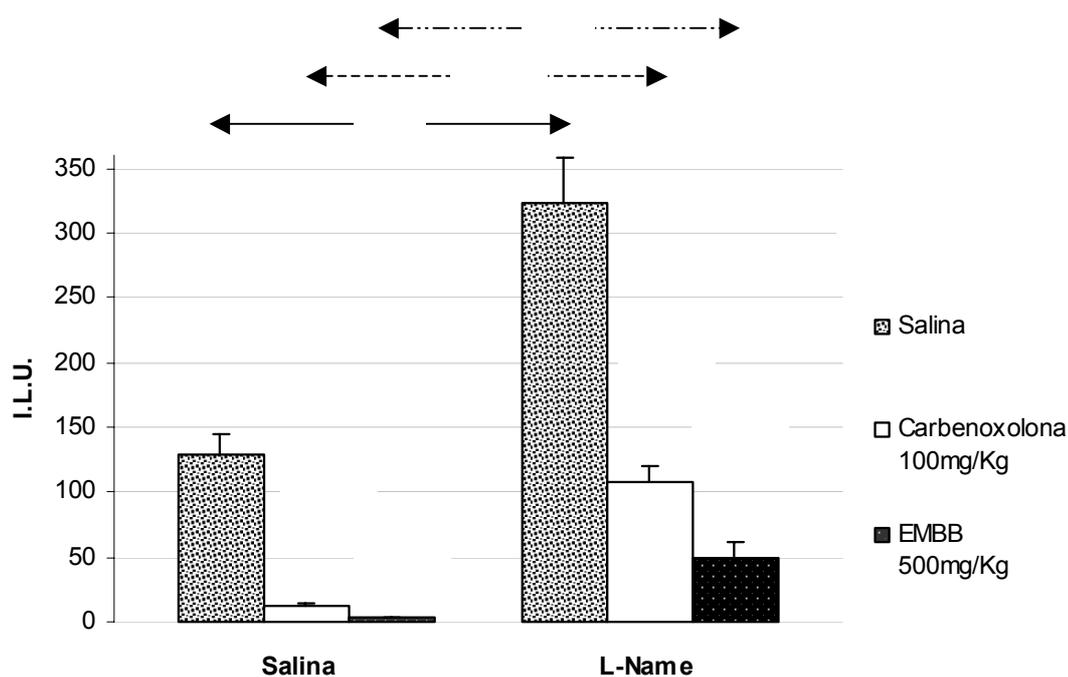
Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. Análise entre os grupos com o mesmo tratamento (representado por flechas): teste “t” não pareado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao respectivo grupo tratado com salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

F – DETERMINAÇÃO DO PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA GASTROPROTEÇÃO

A droga L-NAME foi capaz de aumentar de maneira significativa a média de lesões gástricas em ambos os grupos controles (positivo e negativo), em relação aos seus respectivos grupos pré-tratados com salina (Figura 25). O mesmo fenômeno foi observado entre os grupos de animais tratados com EMME – na presença do inibidor de

NO houve uma significativa diminuição ($p < 0,01$) do efeito gastroprotetor conferido pelo extrato.

Figura 25 - Efeito do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) frente ao inibidor de NO endógeno (L-NAME) em modelo de úlcera induzida por Etanol

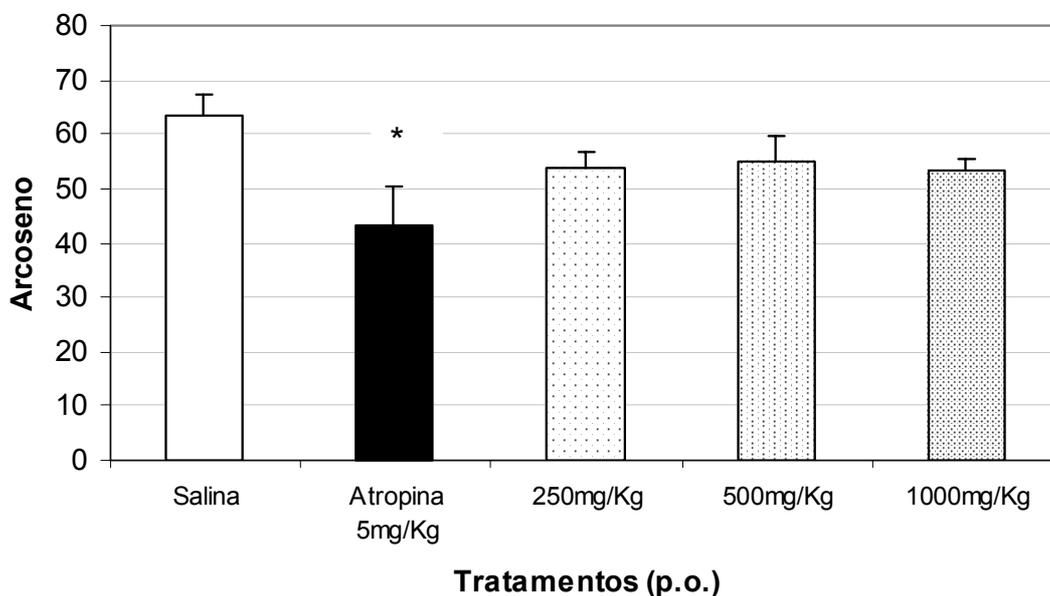


Valores expressos em média \pm erro padrão. Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. ** $p < 0,01$. Análise entre os grupos com o mesmo tratamento (representado por flechas): teste “t” não emparelhado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao respectivo grupo tratado com salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

G – DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

Neste modelo não foi possível observar modificações estatisticamente significativas do trânsito intestinal nos grupos de animais tratados com EMBB (Figura 26).

Figura 26 – Efeito do extrato metanólico de *B. basiloba* sobre a motilidade intestinal de camundongos



Dados da razão da distância percorrida pelo carvão ativado (marcador) dividido pelo comprimento total do intestino delgado e transformados em arcoseno. Valores expressos em média (arcoseno) ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$.

H – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE E TÓXICA

A atividade cicatrizante do EMBB (500 mg/Kg) foi avaliada 14 dias após a indução da lesão com ácido acético. Na tabela 13 pode-se observar que o EMBB apresentou uma leve atividade cicatrizante em comparação ao grupo salina, porém sem relevância na análise estatística.

Tabela 13 - Efeito do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) sobre o processo de cicatrização em lesões causadas por ácido acético em ratos

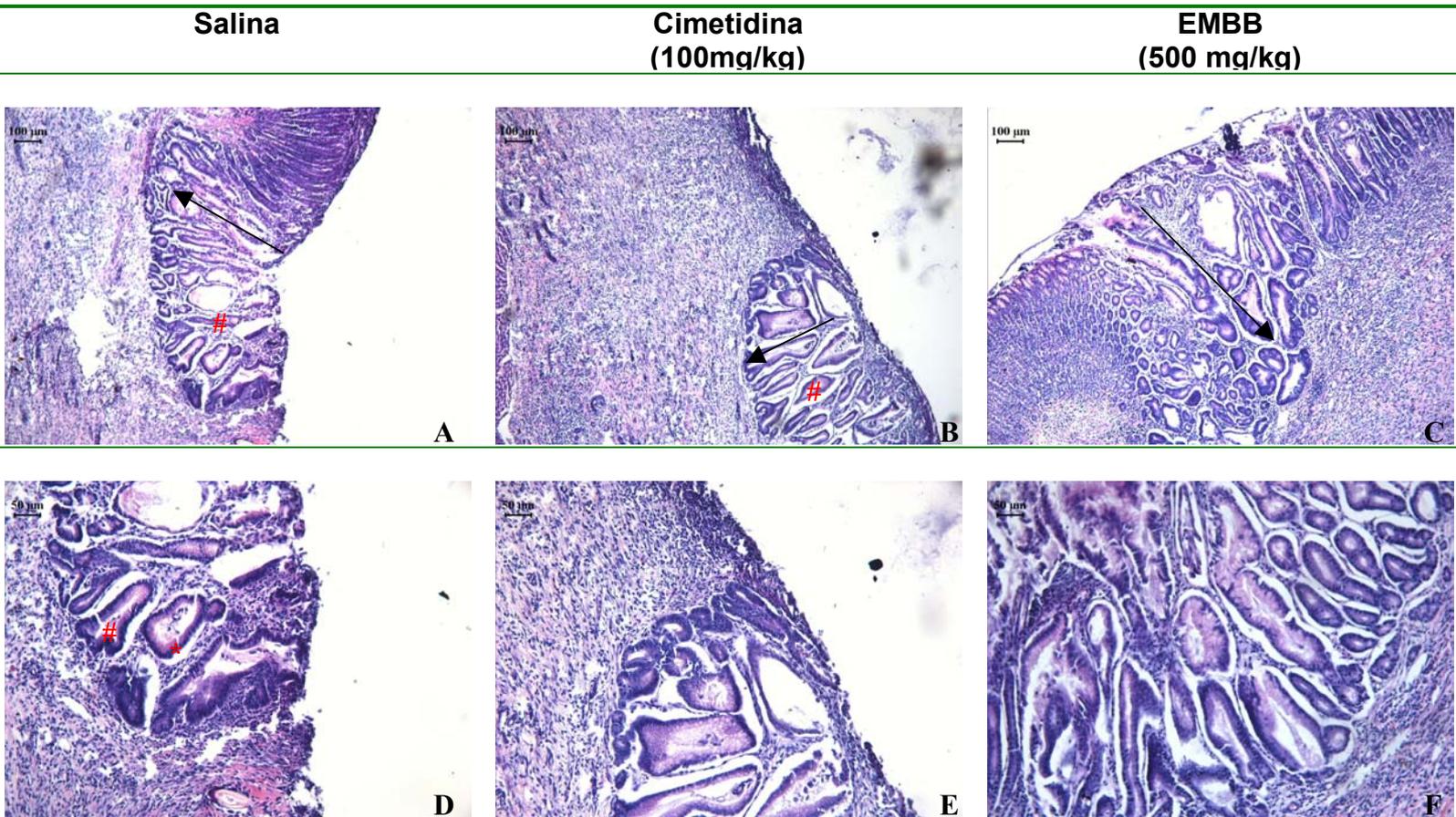
Tratamentos	Doses (mg/Kg)	N	Borda interna (mm)	% de cicatrização	Borda externa (mm)	% de cicatrização
Salina	10mL/Kg	06	46,76 ± 4,48	--	213,63 ± 5,34	--
Cimetidina	100	07	40,56 ± 4,78	13	159,55 ± 17,07	25
EMBB	500	04	39,48 ± 15,78	16	176,7 ± 66,6	17

Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Na análise histológica, a fotomicrografia de H&E (Tabela 14) mostra que para A e D (grupo tratado com o veículo salina 10 mL/Kg) pode-se notar a dilatação das glândulas (#) com pouco material sendo secretado na luz (*). Para B (grupo tratado com cimetidina 100 mg/Kg), podemos observar a dilatação das glândulas (#) mas com um maior produto de secreção na luz. Nas imagens C e F (grupo tratado com EMBB 500 mg/Kg), observa-se a presença de secreção dentro das glândulas assim como a organização das mesmas (alinhas e enfileiradas). As setas indicam as regiões de regeneração das lesões, que foram utilizadas na análise morfométrica.

Para a tabela 15, nota-se que os núcleos PCNA positivos são marcados pela reação com a cor marrom, onde A = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), B = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e C = grupo tratado com EMBB (500 mg/Kg), sendo que a marcação em EMBB encontra-se disperso pelas células da submucosa, reproduzindo um padrão semelhante à marcação do grupo salina.

Tabela 14: Cortes histológicos de lesões estomacais produzidas por ácido acético em ratos corados com H&E do efeito de cicatrização do extrato metanólico de *Byrsonima basiloba* (EMBB)



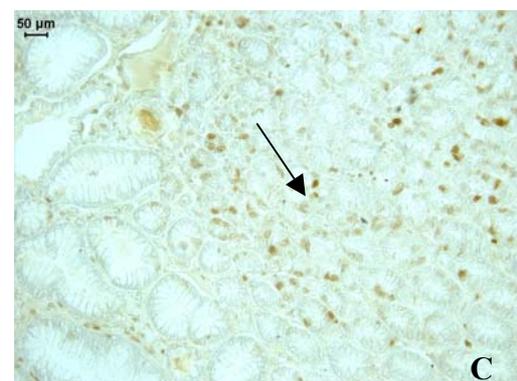
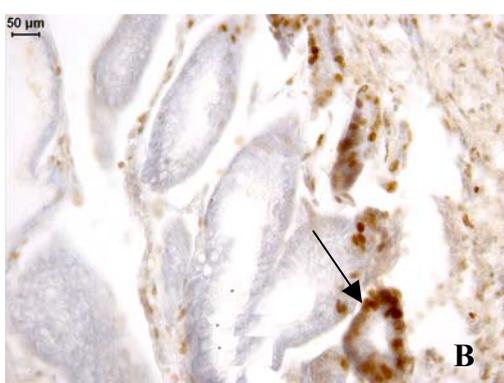
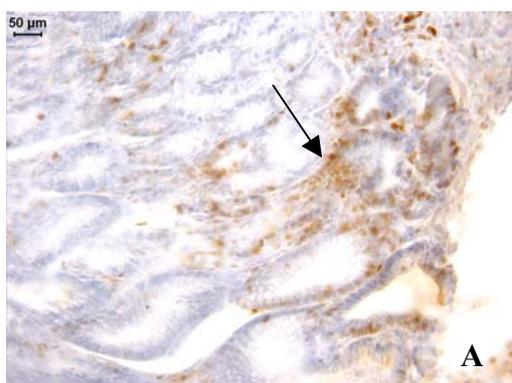
As setas indicam a área utilizada como parâmetro morfométrico (altura) da região de regeneração em lesões gástricas causadas por ácido acético em ratos.

Tabela 15: Análise histológica de estômagos de ratos tratados com salina, cimetidina (100 mg/Kg) e *Byrsonima basiloba* (EMBB) por 14 dias em imunohistoquímica por PCNA

Salina

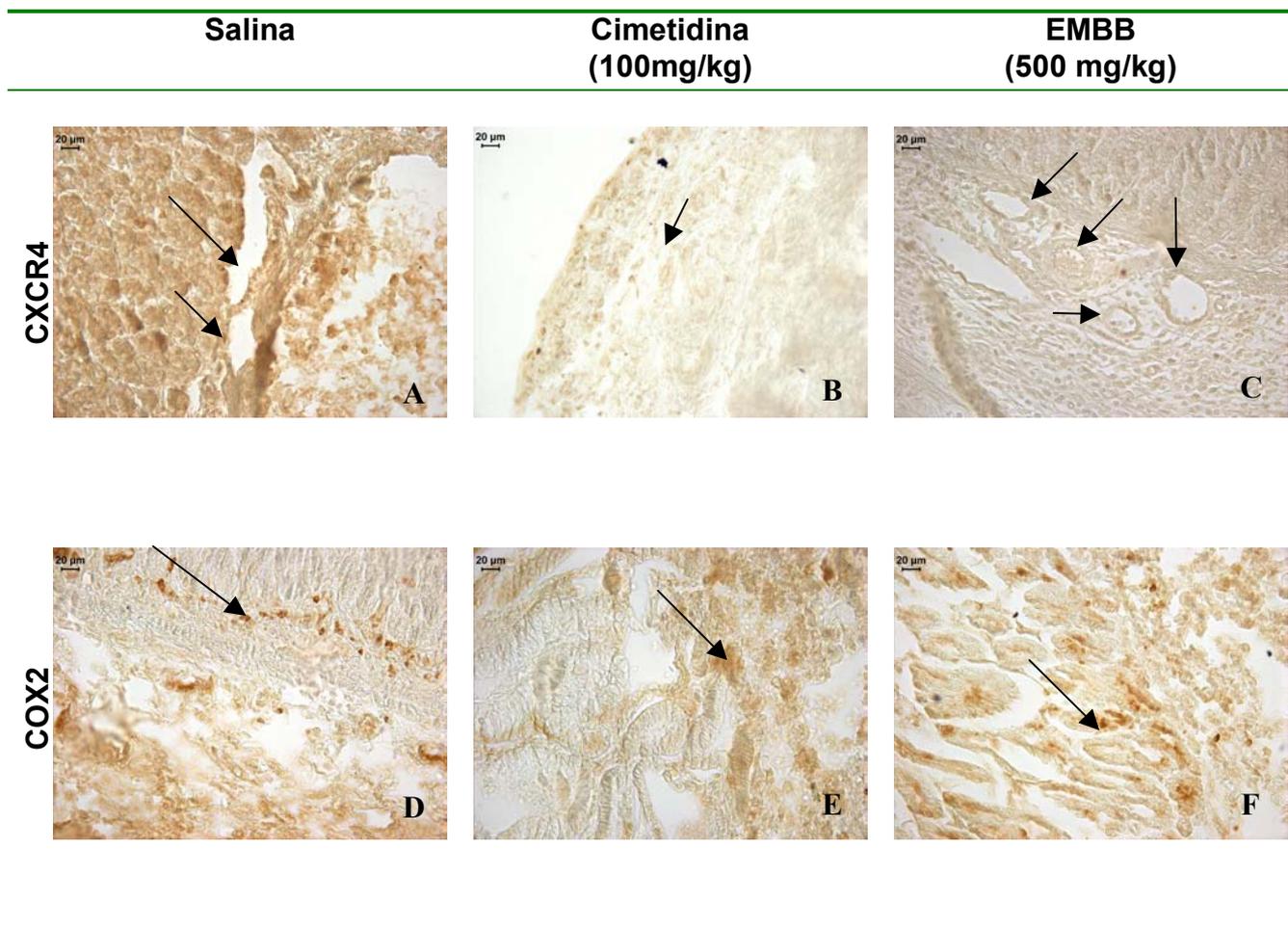
**Cimetidina
(100mg/kg)**

**EMBB
(500 mg/kg)**



A região de re-organização da mucosa encontra-se com muitas células PCNA positivas (cor marrom, indicado pela seta)

Tabela 16: Análise histológica de estômagos de ratos tratados com salina, cimetidina (100 mg/Kg) e *Byrsonima basiloba* (EMBB) por 14 dias em imunohistoquímica por CXCR4 e COX2



Para CXCR4: as setas indicam a presença de vasos; Para COX2: as setas indicam as regiões com expressão de COX-2 (em marrom).

Na tabela 16, os vasos ficam evidenciados pela positividade com CXCR4, onde A = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), B = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e C = grupo tratado com EMBB (500 mg/Kg), verificando-se um aumento significativo na densidade dos vasos para o grupo EMBB na região da submucosa.

Para COX₂, as células das regiões positivas são marcadas pela reação com a cor marrom, onde D = grupo tratado com veículo (salina 10 mL/Kg), E = grupo tratado com cimetidina (100 mg/Kg) e F = grupo tratado com EMBB (500 mg/Kg). A marcação de EMBB neste caso ficou homoganeamente distribuída ao longo da região submucosa, semelhante à marcação observada para o grupo salina.

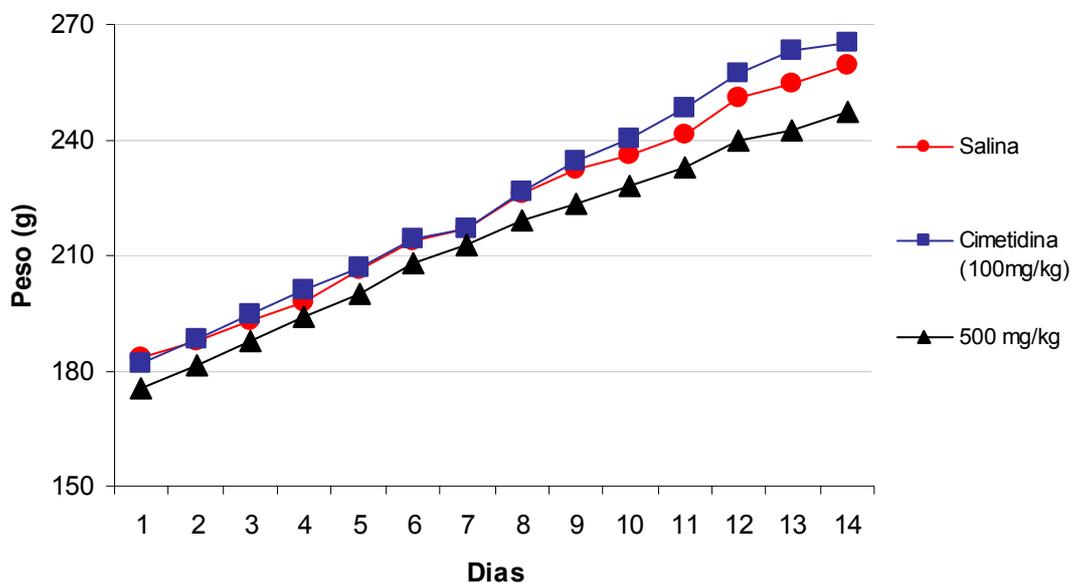
Os estudos de toxicidade subaguda do EMBB englobaram o monitoramento diário do peso corporal dos animais (Figura 27) e a relação peso dos órgãos vitais dividido pelo peso corporal (Tabela 17). A análise destes dados não indicou efeitos tóxicos subagudos após tratamento oral diário de 500 mg/Kg durante 14 dias.

Tabela 17 - Efeito da administração subaguda do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) sobre os órgãos vitais em ratos submetidos ao modelo de indução lesões gástricas por ácido acético

Tratamentos (p.o)	N	Fígado	Coração	Pulmões	Rins	Baço	Mortalidade
Salina	8	10,22 ± 0,11	3,95 ± 0,05	4,38 ± 0,11	5,24 ± 0,07	3,05 ± 0,05	0/8
Cimetidina 100mg/Kg	9	10,30 ± 0,13	3,84 ± 0,06	4,44 ± 0,15	5,06 ± 0,04	3,00 ± 0,07	0/9
EMBB 500mg/Kg	6	10,30 ± 0,16	3,92 ± 0,12	4,35 ± 0,04	5,12 ± 0,08	2,95 ± 0,10	0/6

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformados em arcoseno. Valores expressos em média (arcoseno) ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

Figura 27 - Evolução do peso corporal de ratos frente ao tratamento diário com *B. basiloba* durante 14 dias em experimento de indução de lesões gástricas por ácido acético



Em relação à análise dos parâmetros bioquímicos, nenhuma alteração foi observada após o tratamento diário do EMBB (500 mg/Kg) durante 14 dias (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeito da administração subaguda do extrato metanólico de *B. basiloba* (EMBB) sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade em ratos submetidos ao modelo de indução de lesões gástricas por ácido acético

	<i>Salina</i>	<i>Cimetidina</i>	<i>EMBB 500 mg/Kg</i>
<i>Glicose (mg/dL)</i>	40,25 ± 3,54	42,33 ± 4,52	43,50 ± 5,92
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,52 ± 0,05
Uréia (mg/dL)	38,38 ± 2,28	36,33 ± 1,61	40,50 ± 2,29
γ-GT (U/L)	2,20 ± 0,20	3,33 ± 1,86	2,67 ± 0,33
AST (U/L)	225,00 ± 18,18	191,22 ± 5,86	214,67 ± 16,28
ALT (U/L)	53,13 ± 7,33	61,11 ± 6,81	43,33 ± 1,73

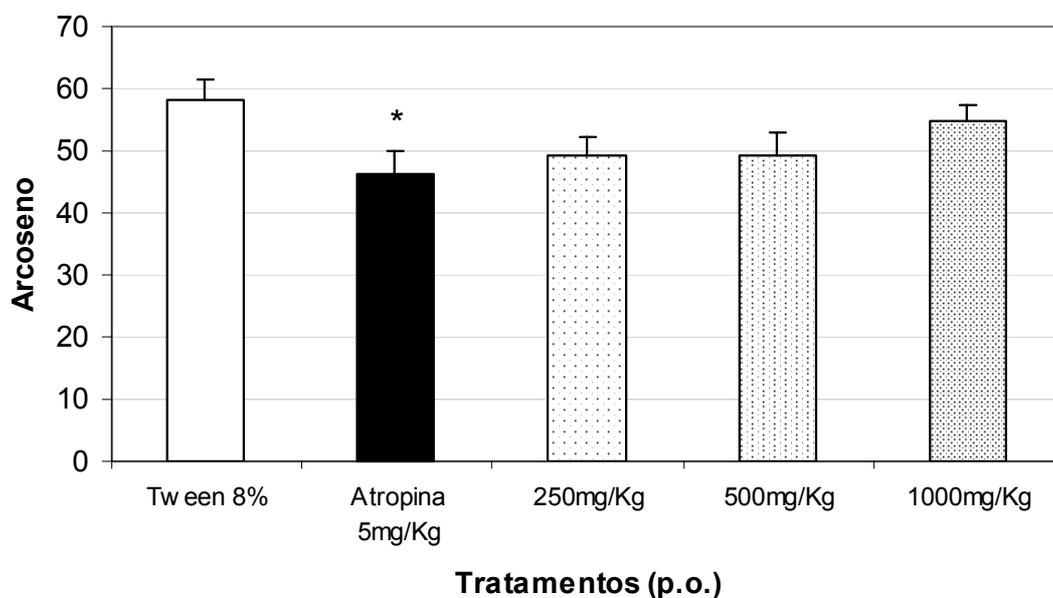
Valores expressos em média ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett.

IV.4 – EXTRATO CLOROFÓRMICO DE *Byrsonima basiloba* (ECBB)

A – DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

Neste modelo não foi possível observar modificações estatisticamente significativas do trânsito intestinal (Figura 28), nos grupos de animais tratados com extrato clorofórmico de *B. basiloba* (ECBB).

Figura 28 – Efeito do extrato clorofórmico de *B. basiloba* sobre a motilidade intestinal de camundongos



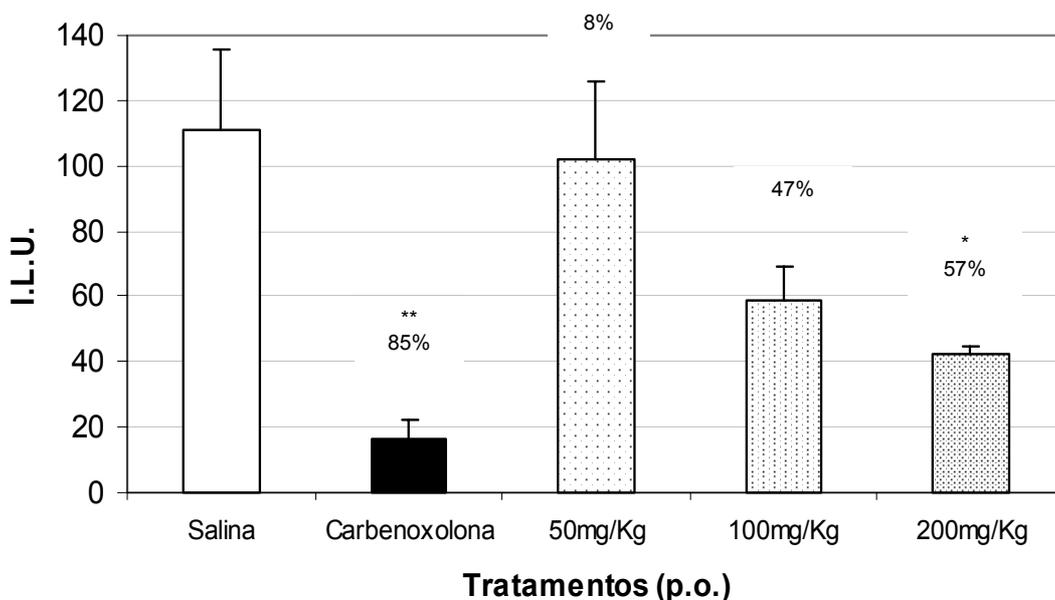
Dados da razão da distância percorrida pelo carvão ativado (marcador) dividido pelo comprimento total do intestino delgado e transformados em arcoseno. Valores expressos em média (arcoseno) ± erro padrão. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$.

IV.5 – FRAÇÃO AQUOSA DE *Byrsonima basiloba* (FABB)

A – MODELO DE INDUÇÃO DE ÚLCERA POR ETANOL ABSOLUTO

A fração aquosa derivada do extrato metanólico de *B. basiloba* apresentou efeito gastroprotetor na dose de 200 mg/Kg, conferindo proteção de 57% em relação ao grupo controle tratado com salina (Figura 29).

Figura 29 - Efeito da fração aquosa de *B. basiloba* no modelo de indução de úlcera por etanol absoluto em ratos

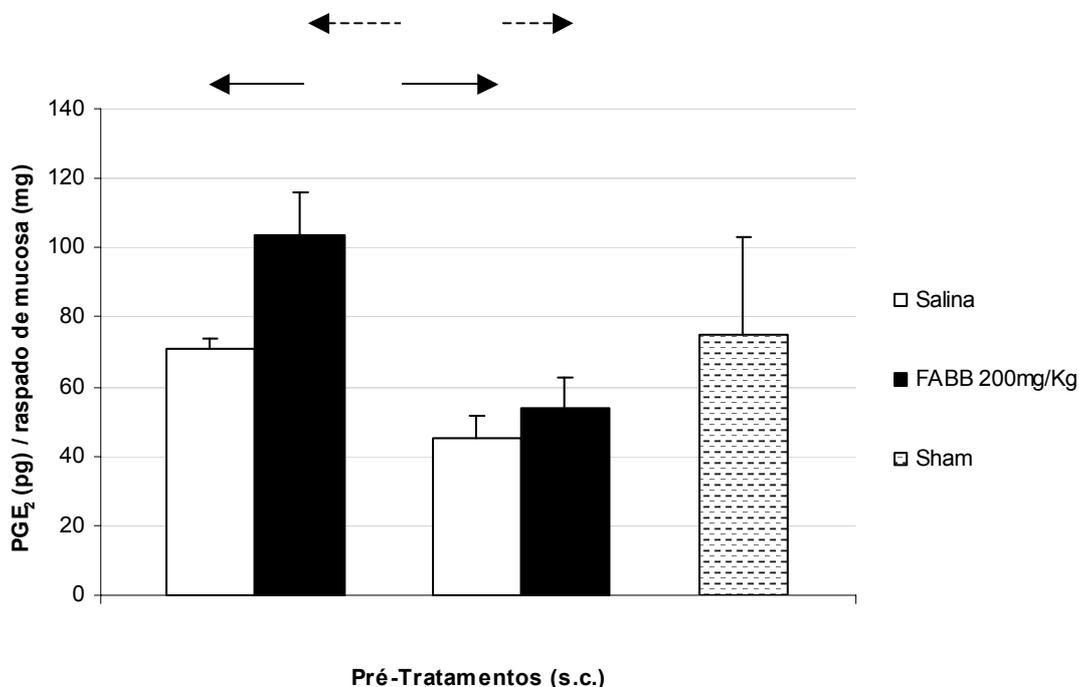


Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Análise estatística entre os grupos: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo salina. I.L.U.: Índice de Lesão Ulcerativa.

B – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROSTAGLANDINA E₂ BASAL DA MUCOSA GÁSTRICA

Figura 30 – Este experimento avaliou o comportamento da FABB frente à expressão de prostaglandina E₂. A comparação entre os grupos controle salina e indometacina (barras brancas) evidencia uma redução drástica na expressão deste mediador ($p < 0,01$), o que já era esperado visto que a inibição de prostaglandinas é uma atividade bastante conhecida para as DAINes. Para a FABB, foi observado um aumento importante na expressão de PGE₂ em relação ao grupo salina, porém sem significância estatística devido talvez ao desvio elevado dos valores observados dentro do grupo. Em comparação aos grupos pré tratados com indometacina, a FAEME não foi capaz de sustentar os níveis de PGE₂ elevados, tanto que na comparação entre os 2 grupos tratados com FABB houve significância com $p < 0,01$.

Figura 30 - Efeito da fração aquosa de *Byrsonima basiloba* (FABB) sobre a expressão de PGE₂ basal da mucosa gástrica de ratos



Valores expressos em média \pm erro padrão da quantificação de PGE₂ (picogramas) dividido pelo peso do raspado de mucosa (em miligramas). Análise entre os grupos com o mesmo pré-tratamento: ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. Análise entre os grupos com o mesmo tratamento (representado por flechas): teste “t” não pareado. ** $p < 0,01$.

V – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

V.1 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA

Os extratos metanólicos de *Mouriri elliptica* e *Byrsonima basiloba* não apresentaram efeito tóxico agudo aparente, após a administração de 5g/Kg em camundongos machos e fêmeas. Ambos os sexos foram avaliados para descartar qualquer tipo de toxicidade relacionada à questão hormonal. De acordo com Souza Brito (1996), uma dose de 1g/Kg de um determinado extrato têm uma correspondência relativa com substâncias isoladas na faixa de 100 mg/Kg, como é o caso da cimetidina. A partir desses dados, pode-se concluir que em 5 g/Kg haveria um aumento de 5 vezes da concentração dos compostos presentes nos extratos, porém não se pode dizer, a partir dos dados deste trabalho, que eles não causem efeitos tóxicos em concentrações ainda mais altas. Porém, nenhum efeito tóxico agudo foi observado através dos parâmetros analisados neste trabalho. Considerando que a população geralmente faz uso de veículos polares para preparação de suas plantas medicinais, existe a necessidade de estudos complementares de toxicidade na fase clínica para que possa garantir a segurança de seu uso e a ausência de toxicidade em humanos.

A análise de toxicidade subaguda foi realizada em ratos, utilizando o mesmo experimento de avaliação da cicatrização. EMME e EMBB (ambos a 500mg / Kg / dia) não demonstraram atividade tóxica após 14 dias de tratamento em nenhum dos parâmetros físicos analisados (peso corporal e peso dos órgãos). Para maior confiabilidade dos resultados, foram avaliados parâmetros bioquímicos usualmente utilizados em laboratórios de análise clínica veterinária. Glicose, AST (indicador de lesão hepática aguda), ALT (indicador de lesão hepática crônica), γ -GT (indicador de

lesão do canal biliar), creatinina e uréia (indicadores de lesão renal) foram analisados (Cury *et al.*, 2005). Apenas uma alteração dos parâmetros foi observada – o EMME apresentou uma diminuição significativa nos valores de creatinina se comparados ao grupo salina (0,34 mg/dL contra 0,48 mg/dL respectivamente). Do ponto de vista clínico, esta alteração não possui acepção importante, já que a insuficiência renal (que seria um real indicativo de toxicidade) teria provavelmente aumentado os valores de creatinina. Este achado não deve ser ignorado, porém encontra-se isolado (não está acompanhado, por exemplo, de uma alteração nos valores de uréia ou então do peso renal), não refletindo portanto numa situação que possa comprometer a segurança do uso terapêutico desta planta. Em humanos, os valores clínicos normais no sangue para a creatinina variam de 0,6 – 1,5 mg/dL (Devlin, 2002).

Todos esses resultados, associados ao estudo de toxicidade aguda dos extratos, confirmam o baixo efeito tóxico das plantas.

V.2 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DE GASTROPROTEÇÃO

Os modelos experimentais utilizados neste trabalho para a avaliação dos efeitos gastroprotetores foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos, conhecidos na indução de lesões gástricas e já introduzidos no item I.2.2 deste trabalho.

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 o epitélio da mucosa através do rompimento da barreira muco-bicarbonato e suas ações celulares refletem em ruptura da parede dos vasos sangüíneos, sendo as hemorragias a conseqüência 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 (Bagchi *et al.*, 1998; Hirokawa *et al.*, 1998; Repetto & Llesuy, 2002).

Os resultados do experimento de indução de úlcera por HCl / etanol mostraram efeito gastroprotetor somente na dose de 500 mg/Kg para EMME e nas 3 doses testadas para EMBB (250, 500 e 1000 mg/Kg). Já no caso do modelo de indução de lesões por etanol absoluto, o efeito gastroprotetor foi observado em pelo menos uma das doses testadas para EMME, FAEME, EMBB e FABB, evidenciando uma capacidade importante destes extratos e frações em impedir a formação de lesões que seriam geradas pelo etanol.

Úlceras causadas por drogas antiinflamatórias não-esteroidais envolvem mecanismos de inibição das cicloxigenases 1 e 2, de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas E₂. As prostaglandinas possuem efeitos 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 prostaglandina compromete a barreira mucosa que é composta de muco e bicarbonato e facilita a formação de lesões causadas pelas secreções gástricas (ácida e enzimática). No modelo experimental de úlceras induzidas por droga antiinflamatória não esteroide, novamente foi evidenciado a capacidade gastroprotetora do EMME (125 e 500 mg/Kg) e FAEME (100 mg/Kg), sendo que neste caso o EMBB e FABB não foram avaliados frente a este agente indutor.

V.3 – DISCUSSÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO

Os resultados inéditos e promissores obtidos com os extratos e frações de *M. elliptica* e *B. basiloba* frente aos severos agentes indutores de lesão descritos acima levaram a realização de experimentos que caracterizassem os mecanismos de ação destas plantas. Dessa maneira, foram executados experimentos que visavam verificar o envolvimento das plantas sobre: a secreção ácida gástrica (ligadura de piloro), participação do óxido nítrico (NO), envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos (SH) na gastroproteção, a motilidade intestinal e quantificação dos níveis de PGE₂ basal da mucosa gástrica.

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 em 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 intraduodenal) dos extratos. Na avaliação da atividade de EMME e EMBB (ambos na dose de 500 mg/kg), observou-se efeito gastroprotetor de ambos os extratos, tanto por efeito local como sistêmico. No entanto, a porcentagem de proteção foi mais evidente na administração intraduodenal para ambos os extratos, mostrando a participação um pouco mais importante do efeito sistêmico sobre o efeito local para estes extratos. Porém, o efeito local não pode ser ignorado visto que também foi capaz de gerar uma gastroproteção com significância estatística. A administração dos extratos pelas duas vias utilizadas não interferiram nos valores de pH e na concentração de íons

H⁺. No volume do suco gástrico, houve aumento significativo do volume pela administração oral de EMBB, porém sem resultar em aumento de acidez. Desta forma, pode se dizer que EMME e EMBB atuam na gastroproteção independente de uma atividade anti-secretória.

Estudos indicam que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera gástrica por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (Cho, 2001; Kwiecién *et al.*, 2002; Ancha *et al.*, 2003). Porém, o papel do NO na regulação e manutenção das funções da mucosa gástrica ainda não são totalmente conhecidas (Khattab *et al.*, 2001). Os resultados dos experimentos com o inibidor de NO (L-NAME) mostram que o efeito gastroprotetor de EMBB (500 mg/Kg) foi revertido com a prévia administração deste inibidor, mostrando que o EMBB atua de maneira dependente de NO. Já o efeito gastroprotetor do EMME (500 mg/Kg) se manteve independentemente da administração do L-NAME, atuando portanto de maneira independente desta via. Portanto, pode-se dizer que o mecanismo de proteção induzido pelo NO não é o mecanismo preponderante na gastroproteção de EMME, mas é importante para o EMBB.

Os grupamentos sulfidrílicos participam da proteção da mucosa pela ligação a radicais-livres (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 glutathiona, uma substância endógena que, em sua forma reduzida, tem importância na redução do estresse oxidativo, por eliminar radicais livres, reduzir peróxidos e se complexar com compostos eletrofilicos de maneira a proteger estruturas celulares protéicas, DNA e lipídeos, além de proteger a célula de outros produtos tóxicos, como o cádmio (Klaassen *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 de ação ainda não foram totalmente esclarecidos (Hiraishi *et al.*, 1999). A administração do depletor dos grupamentos sulfidrílicos (NEM) provocou um grande aumento das lesões gástricas em todos os grupos experimentais. O tratamento dos animais com EMME (500 mg/Kg) e EMBB (500 mg/Kg), promoveu 36% e 98% de proteção, respectivamente, frente a lesão induzida por etanol. Porém, o pré-tratamento com NEM promoveu reduções drásticas na gastroproteção em ambos os extratos. A carbenoxolona, controle positivo utilizado, também apresentou variação grande de proteção. Isso se deve, provavelmente, à atuação da carbenoxolona em promover proteção em modelos de indução de úlcera por etanol, devido a um aumento da síntese de muco (Nagayama *et al.*, 2001). Estes resultados indicam, portanto, a participação de grupamentos sulfidrílicos na proteção promovida por EMME e EMBB no modelo lesão gástrica induzida por etanol.

A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico. De acordo com Suzuki *et al.* (2000) a hipermotilidade gástrica é de grande importância no processo inicial de formação de lesões em modelo de úlceras por DAINÉ. Ao se determinar a ação de EMME e EMBB 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 dos extratos.

O interesse em caracterizar a expressão de COX₂ através de ensaios, reside no fato desta isoforma produzir prostanóides como a prostaglandina E₂ (PGE₂), que desempenha ações gástricas importantes no processo de cicatrização por induzir angiogênese e proliferação celular. Além disso, a PGE₂ apresenta efeito citoprotetor

relacionado principalmente com a produção de muco e bicarbonato (Brozowisk *et al.*, 2005). Frente à importância das prostaglandinas na gastroproteção, os níveis de PGE₂ foram determinados na mucosa gástrica de ratos. O uso da indometacina promove inibição das ciclooxigenases 1 e 2 (Meade *et al.*, 1993) e o seu emprego neste experimento serviu como parâmetro para avaliar a atividade da FAEME (100 mg/Kg) e da FABB (200 mg/Kg) na produção de prostaglandinas, de maneira a relacionar a existência de uma dependência dessa ação via indução da COX.

O resultado da quantificação de PGE₂ apontou um aumento evidente na proporção de PGE₂ no raspado de mucosa gástrica dos animais que receberam FAEME (107,4 pg / mg de raspado) e FABB (103,5 pg / mg de raspado) em comparação à média dos animais tratados com salina (70,8 pg / mg de raspado) e grupo sham (testemunha) (74,7 pg / mg de raspado). No entanto, apesar deste aumento evidente de PGE₂ para ambas as frações, não ocorreu significância estatística devido talvez ao desvio elevado nos valores encontrados. Já o comportamento frente à indometacina foi diferente entre as frações: a FAEME manteve a proporção de PGE₂ elevada mesmo na presença de indometacina, enquanto que para a FABB a presença de indometacina inibiu fortemente a expressão de PGE₂. Como conclusão, pode-se dizer que a FAEME e a FABB favorece a expressão de PGE₂ na mucosa gástrica, sendo que para a FABB este estímulo é completamente revertido com a inibição da COX-1 por uma DAINE.

V.4 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DE CICATRIZAÇÃO, ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS

Como parte dos objetivos propostos neste trabalho, a atividade cicatrizante de *M. elliptica* e *B. basiloba* também foi avaliada, para complementar os dados referentes à gastroproteção e mecanismos de ação já discutidos.

No modelo de indução de úlcera por ácido acético, a administração durante 14 dias de EMME ou EMBB não reduziu significativamente a área da região lesada na análise macroscópica, quando comparados aos animais tratados com salina. Para a análise microscópica, a análise morfométrica realizada para os cortes corados com H&E também não indicou alterações (dados não apresentados). Ainda para o EMBB, observa-se que a conformação das glândulas mucosas na região de regeneração encontra-se melhor estruturada quando comparadas à salina, provocando o alongamento e enfileiramento das mesmas. A estruturação normal das glândulas estomacais é tubulosa reta (Junqueira & Carneiro, 1999), secretando em direção à superfície da mucosa gástrica. Assim, a reorganização da região de regeneração pelo EMBB facilita a passagem do muco e de outras substâncias em direção à superfície da mucosa gástrica. De acordo com Wallace & Whittle (1986) o muco apresenta importante relação com o processo de cura em casos de injúrias agudas, pela formação de uma capa mucóide que permite a re-epitelização do local lesionado.

A análise histoquímica por PCNA mostrou, para o EMME, um estímulo da proliferação celular na região de regeneração, principalmente na base das glândulas mucosas. Este fato pode ser claramente evidenciado pelo aumento da intensidade da coloração no campo em questão, quando comparado ao padrão de salina. Para o EMBB, observam-se células esparsas e distribuídas ao longo das regiões mucosa e submucosa, porém sem diferenciação do padrão salina.

O interesse em caracterizar a participação de COX₂ já foi discutido anteriormente, sendo que o EMME aumentou a quantidade de células marcadas, evidenciando um estímulo desta enzima. Este achado pode estar relacionado ao aumento da expressão de PGE₂ pela FAEME, visto que a FAEME é derivada do EMME e que a PGE₂ é um dos mediadores endógenos sintetizados pela COX. Assim, o estímulo do

conjunto COX-PGE₂ pela *Mouriri elliptica* explica pelo menos de maneira parcial suas ações farmacológicas. Já a imunohistoquímica de COX₂ para o EMBB não alterou a expressão desta enzima de maneira significativa.

A participação da SOD (superóxido dismutase) no mecanismo de ação do EMME também foi avaliada, devido à sua importância como antioxidante e eliminadora de radicais livres das células (Fan *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005). Sua atividade gastroprotetora é reconhecida, tendo como um dos possíveis mecanismos o aumento do nível de prostaglandinas (Ogino *et al.*, 1987; Iwasaki *et al.*, 2004). Os resultados deste estudo geraram células marcadas para o grupo salina e cimetidina, não marcando porém o grupo tratado com EMME. Este fato pode ser facilmente observado pela ausência total de cor neste grupo (ou seja, ausência de células SOD positivas). Uma possível explicação para a inibição da SOD endógena nas células frente ao uso de EMME reside na própria capacidade antioxidante deste extrato, ou seja, a manutenção antioxidativa local gerada pela administração diária de EMME (14 dias) pode ter causado um feedback negativo na expressão desta enzima. Para o EMBB, este parâmetro não foi avaliado.

O CXCR4 é um marcador de vasos sanguíneos, sendo portanto importante para a análise da microcirculação local (angiogênese). A diminuição da quantidade de vasos é um fator predisponente ao aparecimento de úlceras (Szabo & Vincze, 2000), pois acarreta em hipóxia e anóxia tecidual. Assim, extratos e frações que conferem aumento na densidade dos vasos possuem um papel importante na manutenção e/ou regeneração da mucosa gástrica.

No entanto, devido ao fato deste anticorpo (CXCR4) atuar de maneira inespecífica, marcando tanto vasos antigos como novos vasos, deve-se levar em conta a

densidade da distribuição destes. No caso dos extratos avaliados, o aumento da densidade de vasos ficou bastante evidente para o EMBB, mas não para o EMME.

Como conclusão dos estudos de histologia e histoquímica realizados, para o EMBB temos como fatores relevantes a organização das glândulas em sentido alongado (facilitando a passagem de muco) e o estímulo na formação e manutenção de vasos. Para o EMME, destaca-se o estímulo na proliferação celular (observado na análise do PCNA) e também o aumento de células COX₂ positivas.

V.5 – CORRELAÇÃO DOS DADOS FITOQUÍMICOS AOS RESULTADOS ENCONTRADOS

A caracterização fitoquímica dos extratos e frações foi realizada pela equipe do Laboratório de Química Orgânica do Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Instituto de Química da UNESP / Araraquara - SP.

No caso de *Mouriri elliptica*, foi observado que o extrato metanólico é constituído principalmente por taninos, saponinas, flavonóides e flavonóides glicosilados. Na seqüência, durante as etapas de fracionamento deste extrato, ficou constatado que os flavonóides permaneciam majoritariamente solubilizados na fase acetato de etila, enquanto que os derivados catequínicos e taninos precipitaram após o processo de centrifugação. Uma alíquota da FAEME foi então submetida à análise de cromatografia de camada delgada (CCD), onde os principais componentes encontrados foram 3 derivados glicosilados de quercetina (Quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, Quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo e Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo), 2 derivados glicosilados de miricetina (Miricetina-3O- α -L-rhamnopiranosídeo e Miricetina-3O- β -D-galactopiranosídeo) (Figura 32) e traços de kaempferol, quercetina e miricetina na forma não conjugada (Figura 31).

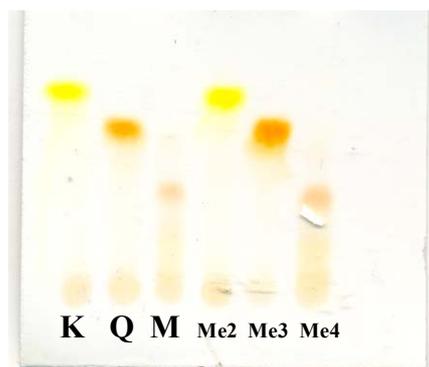


Figura 31: Comparação por CCD das amostras **Me2**, **Me3** e **Me4** com os padrões Kaempferol (K), quercetina (Q) e miricetina (M). FM= CHCl₃/MeOH/H₂O 80:18:2 v/v/v, Revelador=NP/PEG.

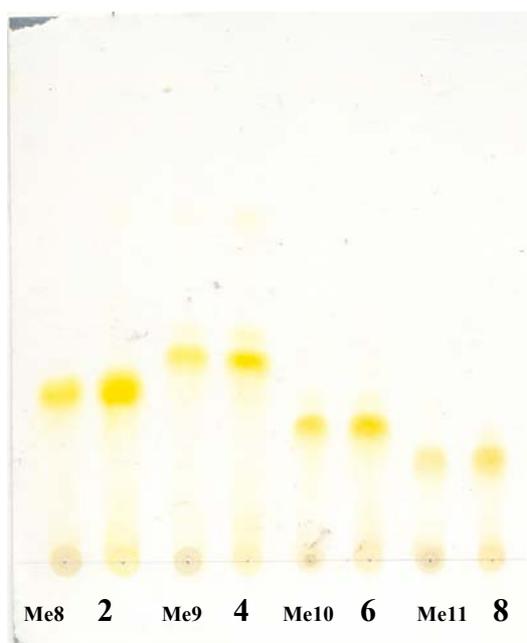


Figura 32: Comparação por CCD das amostras **Me8**, **Me9**, **Me10** e **Me11** com os padrões isolados de *Mouriri pusa*: Quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo **2**, Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo **4**, Miricetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo **6** e Miricetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo **8**. FM= CHCl₃/MeOH/H₂O 43:37:20 v/v/v (FI), Revelador=NP/PEG.

Desta forma, com os resultados fitoquímicos apresentados pode se concluir que a FAEME é constituída essencialmente por flavonóides, e que estes também fazem parte (em menor porcentagem) da composição do EMME. Levando-se em conta os

resultados obtidos (onde se obteve uma dose gastroprotetora efetiva 5 vezes menor para FAEME em relação ao EMME), somadas às informações já discutidas no item I.3.3 deste trabalho (A Química de Produtos Naturais e a Úlcera Gástrica), pode se concluir que os flavonóides citados são os principais responsáveis pela atividade gastroprotetora conferida tanto pelo EMME quanto pela FAEME.

Para o extrato metanólico de *Byrsonima basiloba*, foi caracterizada a presença de proantocianidinas, flavonóides derivados da quercetina e do biflavonóide amentoflavona. Porém a interpretação fitoquímica se limita ao EMBB, já que até o momento a investigação mais detalhada da composição das frações derivadas do EMBB não foi realizada. O fracionamento do EMBB resultou em 2 frações principais - a fração aquosa (FABB) e a fração acetato de etila (FAEBB) (ver Figura 4). Ambas foram testadas no modelo de indução de úlceras por etanol absoluto nas doses de 50, 100 ou 200 mg/Kg. Porém, para a FAEBB não foi observado gastroproteção em nenhuma destas doses avaliadas (resultado não apresentado). Somente a FABB, na dose de 200 mg/Kg apresentou gastroproteção significativa (Figura 29). Portanto, o efeito gastroprotetor de EMBB se deve a alguma destas substâncias citadas ou à somatória de suas ações.

VI – CONCLUSÃO

1) A análise dos resultados nos permite concluir que os extratos metanólicos de *M. elliptica* e *Byrsonima basiloba*, assim como as frações derivadas destes apresentaram atividade gastroprotetora frente aos agentes indutores de lesões gástricas mais comuns ao homem, tais como o etanol e as drogas antiinflamatórias não esteroidais, confirmando assim a informação etnofarmacológica e a base quimiotaxonômica utilizada para a seleção das espécies testadas.

2) Ambos os extratos não apresentaram efeito tóxico agudo e subagudo aparente, frente todas as análises realizadas (comportamental, evolução do peso corporal, peso dos órgãos e análise de parâmetros bioquímicos como glicemia, AST, ALT, Gama-GT, uréia e creatinina). A única alteração observada foi em relação à diminuição nos níveis de creatinina sanguíneo nos animais tratados com EMME durante 14 dias, porém esta alteração não tem importância clínica significativa, já que a insuficiência renal (indicativo de toxicidade) se traduz por aumento nos níveis deste parâmetro em questão.

3) Ambos os extratos apresentaram atividade gastroprotetora relacionada com os grupamentos sulfidrílicos, sendo que o EMBB exerce proteção dependente da ação do óxido nítrico. A atividade gastroprotetora dos extratos agiu de maneira independente do efeito anti-secretório ácido e não causou alterações na velocidade do trânsito intestinal. Na análise imunohistoquímica, o EMME estimula a proliferação celular na região de regeneração e melhora a expressão de COX₂, enquanto que o EMBB estimula a angiogênese e organiza (alinha) as glândulas na área de regeneração.

4) Além de possuírem atividade gastroprotetora confirmada neste trabalho, as frações derivadas destes extratos também foram capazes de melhorar a expressão de PGE₂ na mucosa gástrica (no entanto sem significância estatística), sendo este um importante mediador da secreção alcalina e produção de muco. Porém, a expressão de PGE₂ foi revertida, no caso da FABB, pela prévia administração de uma DAINE, mas se manteve elevada no caso de FAEME.

5) A informação fitoquímica dos extratos e frações estudadas apontou o predomínio de substâncias polifenólicas, principalmente flavonóides e seus derivados. Levando em conta a extensa literatura que relaciona os flavonóides à atividade gastroprotetora, pode-se afirmar que as substâncias majoritárias citadas neste trabalho são as grandes responsáveis pelas atividades farmacológicas encontradas.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aihara, T.; Nakamura, E.; Amagase, K.; Tomita, K.; Fujishita, T.; Furutani, K.; Okabe, S. *Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future*. *Pharmacology & Therapeutics*, 98, 109-127, 2003.
- Alanko, J.; Ruitta, A.; Holm, P.; Mucha, I.; Vapatalo, H.; Metsa-Ketela, T. *Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant / prooxidant properties*. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 193-201, 1999.
- 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.
- Amorozzo, M. C. M. *A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais*. In: Di Stasi, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da UNESP, 46-68, 1996.
- 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.
- Apecechea, M.R.; Larionova, M.; Salazar, S.; Abin, G. *Evaluación de la actividad antiulcerosa del 2“-O-ramnosil-4”-O-metil-vitexina de las hojas de *Piper ossanum**. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29, 114–117, 2000.
- 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.

- Astudillo, L.; Rodríguez, J. A.; Schmeda-Hirschmann, G. *Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 54, 583–588. 2002
- Atay, S.; Tarnawski, A. S.; Dubois, A. *Eicosanoids and the stomach*. Prostaglandins & other Lipids Mediators, 61, 105-124, 2000.
- Avila, J.R.; Lastra, A.D.L.; Martín, M.J.; Motilva, V.; Luque, I.; Delgado, D.; Esteban, J.; Herrerias, J. *Role of endogenous sulphhydryls 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.
- Bauer, H.; Mark-Hermann, E. *Therapy with nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Orthopade, 32 (12), 1088-1099, 2003.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. EDART, Editora da Universidade de São Paulo, 241, 1976.
- Black, J. W.; Duncan, W. A.; Durant, C. J.; Ganellin, C. R.; Parsons, E. M. *Definition and antagonism of histamine H₂-receptors*. Nature, 236, 385-390, 1972.

- Brimblecombe, R. W.; Duncan, W. A. M.; Durant, D. J.; Ganellin, C. R.; Parsons, E. M. *Cimetidine, a non-thiourea H₂-receptors*. J. Int. Med. Res., 3, 86-92, 1975.
- Brzozowski, T.; Konturek, P. C.; Konturek, S. J.; Brzozowska, I.; Pawlik, T. *Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation*. Journal of Physiology and Pharmacology, 56 (5), 33-55, 2005.
- Calderon, A. I., Angehofer, C.K., Pezzuto, J.M., Farnsworth, N.R., Foster, R., Condit, R., Gupta, M.P., Soejarto, D.D. *Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in tropical forest of Parana*. Economic Botany, 54, 278-294, 2000.
- 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, 95, 253-256, 2001.
- Cnubben, N. H. P.; Rietjens, I. M. C. M.; Wortelboer, H.; Van Zanden, J.; Van Bladeren, P. J. *The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 10, 141-152, 2001.
- Corrêa M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Editora Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, vol. V, 538-541, 1984.
- Corrêa, A. D.; Batista, R. S.; Quintas, L. E. M. *Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica*. 4. ed. Petrópolis: Vozes, 164-165, 2001.
- Crawford, J. M. *O trato gastrintestinal*. In: Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 697-758, 2000.
- Cury, M. C.; Guimarães, M. P.; Lima, W. S.; Caldeira, M. C. M. ; Couto, T. R.; Murta, K.; Carvalho, M. G.; Baptista, J. M. B. *Biochemical serum profiles in dogs*

experimentally infested with Angiostrongylus vasorum. Veterinary Parasitology, 128, 121-127, 2005.

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.

Cury, M. C.; Guimarães, M. P.; Lima, W. S.; Caldeira, M. C. M. ; Couto, T. R.; Murta, K.; Carvalho, M. G.; Baptista, J. M. B. *Biochemical serum profiles in dogs experimentally infested with Angiostrongylus vasorum*. Veterinary Parasitology, 128, 121-127, 2005.

Devlin, T. M. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 5. edição, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo, 2002.

Eisig, J. N.; Laudanna, A. A. *Úlcera péptica*. Programa de saúde da família, 2001.
Disponível em: http://ids-saude.uol.com.br/psf/medicina/tema5/texto81_definicao.asp
Acesso em: 25/01/2007

Fan, Y.; Hua, J.; Li, J.; Yang, Z.; Xina, X.; Wang, J.; Ding, J.; Geng, M. *Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms*. Neuroscience Letter, 374, 222-226, 2005.

Farnsworth, N.R.; Morris, R.W. *Higher plants – the sleeping giant of drug development*. Am. J. Pharm. Educ., 148, 46-52, 1976.

Fellenius, E.; Berglindh, T.; Sachs, G.; Olbe, L.; Elander, B.; Sjostrand, S. E.; Wallmark, B. *Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H⁺-K⁺) ATPase*. Nature, 290, 159-161, 1981.

Firenzuoli, F.; Gori, I.; Neri, D. *Clinical phytotherapy: opportunities and problematics*. Ann Ist. Super Sanita. 41 (1), 27-33, 2005.

- Frankel, S.; Berenbaum, M. *Effects of light on antioxidant content of foliage in a tropical forest community*. *Biotropica*, 31, 422-429, 1999.
- Gharzouli, K.; Khennouf, S.; Amira, S.; Gharzouli, A. *Effects of aqueous extracts from Quercus ilex L. root bark, Punica granatum L. fruit peel and Artemisia herba-alba Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats*. *Phytother Res.*, 13 (1), 42-45, 1999.
- Giordano, O. S.; Guerreiro, E.; Pestchanker, M. J.; Guzman, J.; Pastor, D.; Guardiã, T. *The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones*. *J. Nat. Prod.*, 53, 803-809, 1990.
- Go, M. F. *What are the host factors that place an individual at risk for Helicobacter pylori-associated disease?* *Gastroenterology*, 113 (6), 15-20, 1997.
- Goel, R. K.; Sairam, K. *Anti-ulcer drugs from indigenous sources with emphasis on Musa sapientum, Tamrabhasma, Asparagus racemosus and Zingiber officinale*. *Indian Journal of Pharmacology*, 34, 100-110, 2002.
- Gurib-Fakim, A. *Medicinal plants: traditions of yesterday*. *Molecular Aspect of Medicine*, 27, 1-93, 2006.
- Halter, F.; Tarnawski, A.S., Schmassmann, A.; Peskar, B.M. *Cyclooxygenase-2, implications on maintenance of gastric mucosal integrity an ulcer healing: controversial issues and perspectives*. *Gut*, 49, 443-59, 2001.
- Harborne, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*. New York: Chapman & Hall, 1996.
- Hawkins, C.; Hanks, G. W. *The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature*. *Journal of Pain and Symptom Management*, 20 (2), 140-151, 2000.

Hayes, J.D.; McLellan, L.I. *Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately 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*. 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), 111-114, 1998.

Hiruma-Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Toma, W.; Almeida, A. B.; Paula, A. C.; Brasil, D. S.; Muller, A. H.; Souza Brito, A. R. M. *Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from Aparisthmium cordatum, on experimental gastric ulcer models in rats and mice*. Phytomedicine 8, 94–100, 2001.

Hiruma-Lima, C. A.; Toma, W.; Gracioso, J. S.; de Almeida, A. B. A.; Batista, L. M.; Magri, L.; de Paula, A. C. B.; Soares, F. R.; Nunes, D. S.; Souza Brito, A. R. M., *Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of Croton cajucara Benth*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 25, 452–456, 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.

Hoogerwerf, W.A.; Pasricha, P.J. *Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico*. In: Hardman, J. G. e Limbird, L. E. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

- Ishihara, M.; Ito, M. *Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole*. *European Journal of Pharmacology*, 444, 209-215, 2002.
- Iwasaki, Y.; Matsui, T.; Arakawa, Y. *The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in wistar rats*. *Journal of Gastroenterology*, 39, 831-837, 2004.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia básica*. 9. edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- Kadota, S.; Basnet, P.; Ishii, E.; Tamura, T.; Namba, T. *Antibacterial activity of trichorabdal A from Rabdosia trichocarpa against Helicobacter pylori*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 286, 63–67, 1997.
- Khattab, M.M.; Gad, M.Z.; Abdalla, D. *Protective role of nitric oxide in indomethacin induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric secretion*. *Pharmacological Research*, 43, 463-467, 2001.
- 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.
- Kitajima, T.; Okuhira, M.; Tani, K.; Nakano, T.; Hiramatsu, A.; Mizuno, T.; Inoue, K. *Cell proliferation kinetics in acetic acid-induced gastric ulcer evaluated by immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 17, 116-120, 1995.

- 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 (5), 806-15, 1985.
- 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.
- Langmead, L.; Rampton, D. S. *Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease – benefits and dangers*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 15, 1239-1252, 2001.
- Lapa, A. J.; Souccar, C.; Lima-Landman, M. T. R.; Godinho, R. O.; Lima, T. C. M. *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 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.
- Lewis, D. A.; Hanson, D. *Anti-ulcer drugs of plant origin*. In: Ellis, G. P.; West, G. B. *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier Science Publishers B. V., 28, 201-231, 1991.
- Li, Y.; Ohizumi, Y. *Search for constituents with neurotrophic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand*. *Yakugaku Zasshi*, 124 (7), 417-424, 2004.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, vol. 1, 2. ed., pág. 232, 1998.

- Mahady, G. B. *Global harmonization of herbal health claims*. J. Nutr., 131, 1120S-1123S, 2001.
- 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, 320-322, 1962.
- Matsuda, H.; Li, Y.; Murakami, T.; Yamahara, J.; Yoshikawa, M. *Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol or indomethacin induced gastric mucosal lesions in rats*. Life Sciences, 63, 245-250, 1998.
- Matsuda, H.; Li, Y.; Yoshikawa, M. *Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesion in rats*. Life Sciences, 65, 27-32, 1999.
- Matsuda, H.; Pongpiriyadacha, Y.; Morikawa, T.; Kashima, Y.; Nakano, K.; Yoshikawa, M. *Protective effects of polygodial and related compounds on ethanol-induced mucosal lesions in rat: structural requirements and mode of action*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 12, 477-482, 2002.
- McQuaid, K. R.; *Fármacos utilizados no tratamento das doenças gastrintestinais*. In: Katzung, B. G. *Farmacologia básica & clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 867-891, 2005.
- Meade, E. A.; Smith, W. L.; DeWitts, D. L. *Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. The Journal of Biological Chemistry, 268 (9), 6610-6614, 1993.

- Milani, S.; Calabrò, A. *Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing*. *Microscopy Research and Technique*, 53, 360-371, 2001.
- 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.
- 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.
- Nagayama, S.; Jono, H.; Suzaki, H.; Sakai, K.; Tsuruya, E.; Yamatsu, I.; Isohama, Y.; Miyata, T.; Kai, H. *Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70*. *Life Sciences*, 69, 2867-2873, 2001.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*. *Journal of Natural Product*, 66, 1022-1037, 2003.
- Ogino, K.; Oka, S.; Matsuura, S. *Superoxide dismutase and rat gastric mucosal injury – indomethacin-induced ulcer*. *Jpn J Gastroenterol*, 84, 1389-1393, 1987.
- Okabe, S.; Agamase, K. *An Overview of Acetic Acid Ulcer Models - The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research*. *Biol. Pharm. Bull*, 28 (8), 1321-1341, 2005.
- Oliveira, F. A.; Vieira-Junior, G. M.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R.; Santos, K. A.; Martins, F. S.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. *Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from Protium heptaphyllum: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons*. *Planta Medica* 70, 780–782, 2004a.

- Oliveira, F. A.; Vieira-Junior, G. M.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R.; Florencio, M. G.; Lima Jr., R. C.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. *Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from Protium heptaphyllum in mice and rats*. Pharmacological Research, 49, 105–111, 2004b.
- Pachaly, J. R.; Werner, P. R.; Schimanski, J. C.; Ciffoni, E. M. G. *Estresse por captura e contenção em animais selvagens*. A Hora Veterinária, 74, 47-52, 1993.
- Peura, D. A. *Prevention of nonsteroidal 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 proton-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.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- Rastogi, L.; Patnaik, G. K.; Dikshit, M. *Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats*. Pharmacological Research, 38 (2), 125-132, 1998.
- Rates, S. M. K. *Plants as source of drugs*. Toxicol, 39, 603-613, 2001.
- Repetto, M. G.; Llesuy, S. F. *Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 35, 523-534, 2002.

- Rodríguez, J. A.; Astudillo, L.; Schmeda-Hirschmann, G. *Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats*. *Pharmacological Research*, 48, 291–294, 2003.
- Sannomiya, M.; Fonseca, V. B.; da Silva, M. A.; Rocha, L. R.; dos Santos, L. C.; Hiruma-Lima, C. A.; Souza Brito, A. R. M.; Vilegas, W. *Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts*. *J. Ethnopharmacol*, 97, 1-6, 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*. *Gastroenterology* 5, 43–61, 1945.
- Siegmund, S. *Animal models in gastrointestinal alcohol research - a short appraisal of the different models and their results*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (4), 519-542, 2003.
- Silva, E.M., Hiruma-Lima, C.A., Lólis, S.F. *Etnobotânica no município de Porto Nacional*. *Symposium of Brazilian Medicinal Plants, Cuiabá, Abstract*, 106, 2000.
- Sonnenberg, A. *Geographic and temporal variations in the occurrence of peptic ulcer disease*. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 110, 11-24, 1985.
- Sontaj, S. J. *Guilty as charged: bugs and drugs in gastric ulcer*. *American Journal of Gastroenterology*, 92 (8), 1255-1261, 1997.
- Souza Brito, A. R. M. *Manual de ensaios toxicológicos “in vivo”*. *Ciências médicas*. Campinas: Editora da Unicamp, 15-22, 1994.

- Souza Brito, A. R. M. *How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries*. J. Ethnopharmacol., 54, 131-138, 1996.
- Souza Brito, A. R. M.; Rodríguez, J. A.; Hiruma-Lima, C.; Haun, M.; Nunes, D. *Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from Croton cajucara*. Planta Medica, 64, 126–129, 1998.
- Spirit, M. J. *Stress-related mucosal disease: risk factors and prophylactic therapy*. Clinical Therapeutics, 26 (2), 197-213, 2004.
- Stickney, J. C; Northup, D. W. *Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat*. Exp. Biol. Med., 101, 582, 1959.
- Suzuki, K.; Araki, H.; Komoike, Y.; Takeuchi, K. *Permissive role of neutrophils in pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats*. Med. Sci. Monit., 6(5), 908-914, 2000.
- Szabo, S.; Vincze, Á. *Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies*. Journal of Physiology, 94, 77-81, 2000.
- Szelenyi, I., Thiemer, K. *Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects*. Archives of Toxicology 41, 99–105, 1978.
- Toma, W.; Trigo, J. R.; de Paula, A. C. B.; Souza-Brito, A. R. *Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from Senecio brasiliensis (Asteraceae) on gastric and duodenal ulcer on mice and rats*. J. Ethnopharmacol., 95, 345-351, 2004.
- Vacca, L.L. *Laboratory Manual of Histochemistry*. Raven Press, New York, 578, 1985.
- Wallace, J. L.; Whittle, B. J. *Role of mucus in the repair of gastric epithelial damage in the rat. Inhibition of epithelial recovery by mucolytic agents*. Gastroenterology, 91, 603-611, 1986.

- Wallace, J. L.; Granger, D. N. *The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense*. FASEB Journal, 10, 731-740, 1996.
- Wallace, J. L. *Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 15 (5), 691-703, 2001.
- Wang, S.; Wang, L.; Zhang, K.; Shen, J.; Zhou, H.; Qiu, X. *Effect of superoxide dismutase and malondialdehyde metabolic changes on carcinogenesis of gastric carcinoma*. World J. Gastroenterology, 11 (28), 4305-4310, 2005.
- Watanabe, T.; Chiba, T. *Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly*. Nippon Rinsho, 60 (8), 1515-1520, 2002.
- Yamamoto, K.; Kakegawa, H.; Ueda, H.; Matsumoto, H.; Sudo, T.; Miki, T.; Satoh, T. *Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats*. Planta Medica, 58, 389–393, 1992.
- Zayachkivska, O. S.; Konturek, S. J.; Drozdowicz, D.; Brzozowski, T.; Gzhegotsky, M. R. *Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair*. Fiziol Zh., 50, 118-127, 2004.
- Zayachkivska, O. S.; Konturek, S. J.; Drozdowicz, D.; Konturek, P. C.; Brzozowski, T.; Gzhegotsky, M. R. *Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts*. J. Phys. and Pharmacol., 56 (1), 219-231, 2005.

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						
Frênilo 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

.....

... E desta maneira, dois anos se passaram muito rapidamente. Em relação ao menino pára-quedista, este jamais poderia imaginar que um simples salto de avião fosse proporcionar tantas aventuras, amizades e amadurecimento pessoal”.

Fim