

RAQUEL DE CÁSSIA DOS SANTOS



Avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênica e antidiarrêica dos extratos e partições obtidos a partir das folhas de *Byrsonima intermedia*

A. Juss (Malpighiaceae)

ORIENTADORA: PROF^a. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu-SP

2012

RAQUEL DE CÁSSIA DOS SANTOS

**Avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênica e antidiarrêica dos
extratos e partições obtidos a partir das folhas de *Byrsonima intermedia***

A. Juss (Malpighiaceae)

ORIENTADORA: PROF^a. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

Botucatu-SP

2012

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

Santos, Raquel de Cássia dos.

Avaliação dos mecanismos de ação antiulcerogênica e antidiarrêica dos extratos e partições obtidos a partir das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malphighiaceae) / Raquel de Cássia dos Santos. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Capes: 21006008

1. Úlcera péptica. 2. Diarréia. 3. Farmacologia. 4. Glutaciona.

Palavras-chave: Antioxidante; *Byrsonima intermedia*; Compostos sulfidrilicos; Diarréia; Glutaciona; Isquemia; Roedores; Úlcera péptica.

*“Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.*

*Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas”.*

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

Agradeço

A Deus;

A meus pais, Geralda e Sebastião, pelo apoio incondicional; aos meus irmãos e sobrinha, pela paciência e amizade;

Ao Carlos, mais que namorado, por todas as conversas, risadas e críticas construtivas, que acrescentou muito neste trabalho;

Aos sogros e cunhados, que passaram a ser uma nova família;

A professora Clélia, por ter sido mais que orientadora em todos esses anos, pela confiança e pelo apoio que vem me oferecendo em todos os percalços do caminho;

A Professora Lúcia Rocha, pelos diversos ensinamentos e por todo apoio e orientação;

Ao Hélio Kushima, pelas primeiras lições, por tudo que ensinou e ensina;

Ao Leonardo Seito, pela ajuda essencial no início deste trabalho;

Aos amigos do laboratório: Fábio Nervoso e Thiago Mingo, que tiveram papel importante na minha formação;

A Catarine, pelos momentos filosóficos, viagens, companheirismo;

Aos alunos de IC-Jr que me ajudaram muito: Geise e Maycon;

A todos os que passaram e estão presentes no laboratório, pelo trabalho em equipe sem o qual não conseguiria realizar este trabalho;

Ao professor Luiz Claudio Di Stasi e aos seus alunos pela disponibilidade de materiais e de equipamentos e auxílio nos experimentos.

Ao professor André Sampaio Pupo e ao Luiz Ricardo, por disponibilizar o laboratório, pela ajuda em várias etapas deste projeto;

As professoras Semíramis e Tereza Cristina e as alunas Thais e Érica , pela disposição e contribuição com os experimentos

A professora Alba e aos alunos do seu laboratório, que ajudaram e ajudam muito na construção deste trabalho;

A todos os amigos que sempre me apoiam;

Aos servidores do Departamento de Fisiologia;

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia pelo espaço cedido;

A Fapesp, que tornou este trabalho possível.

RESUMO

Este trabalho visou estudar os efeitos farmacológicos do extrato metanólico (BiMeOH) e partições acetato de etila (AcoEt) e aquosa (AcoAq) das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss, espécie do Cerrado brasileiro. A partir de sua indicação popular para gastrite e distúrbios do trato gastrointestinal, foram realizados ensaios *in vivo* que comprovaram seu potencial terapêutico como antiulcerogênico. Análise fitoquímica do extrato resultou na caracterização de BiMeOH que possui majoritariamente taninos condensados na partição AcoAq e flavonóides derivados de quercetina em AcoEt. A avaliação de toxicidade aguda revelou que BiMeOH causou morte de alguns camundongos fêmeas, indicando cautela em sua utilização. Embora a ação gastroprotetora de BiMeOH não envolva a participação do Óxido Nítrico (NO), as partições testadas apresentaram envolvimento dessa via, bem como de grupamento sulfidrilico (SH). Além disso, apenas a AcoAq apresentou gastroproteção frente às úlceras induzidas por DAINEs, com redução dos níveis de mieloperoxidase (MPO). Também foi mostrada a participação dos neurônios sensitivos à capsaicina tanto da BiMeOH quanto da AcoEt em sua ação gastroprotetora. O extrato e partições também foram efetivos na redução dos danos gástricos no teste de isquemia-reperfusão, com redução da atividade de MPO e aumento dos níveis de glutathiona total (GSH) apenas para AcoEt. No duodeno, BiMeOH e AcoAq apresentaram atividades protetoras frente à lesão induzida por cisteamina. Nenhum tratamento agudo (24 hs) do extrato e partições foi capaz de reduzir as lesões promovidas pela isquemia-reperfusão, após a instalação da lesão. Porém, o tratamento de 6 dias com BiMeOH e AcoEt apresentou redução das lesões, acompanhada por diminuição de MPO e interleucina 1- β (IL 1- β) e aumento de interleucina 10 (IL-10). A AcoEt apresentou, ainda, aumento de GSH e redução de fator de necrose tumoral α (TNF- α). Por outro lado, a AcoAq apenas aumentou os níveis de GSH e IL-10. Após 7 dias de tratamento com o extrato e partições, não foi observada redução de lesões gástricas induzidas por ácido acético em ratos. Porém, o tratamento por 14 dias reduziu as lesões gástricas, e apenas as partições aumentaram GSH. Na avaliação da mucosa duodenal por 7 e 14 dias de tratamento também foi observada redução das lesões pelo extrato e partições, com aumento de GSH para AcoEt nos períodos observados. BiMeOH e AcoAq foram capazes de prevenir e combater a atividade

do agente catártico (óleo de rícino) nos experimentos de diarreia induzida, observando-se diminuição de fezes aquosas, reduzindo o acúmulo de fluido intestinal sem alterar o trânsito intestinal. Além disso, esse último efeito foi revertido por naloxona, indicando o envolvimento de receptores opióides. A atividade antidiarréica desta espécie também pode estar associada à sua ação giardicida e antibacteriana frente à inibição crescimento de *Escherichia coli*. Ainda, observou-se outras atividades antimicrobianas, como inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori*. Por fim, diante da diversidade de ações farmacológicas de *B. intermedia* sobre o trato gastrointestinal, é possível estabelecer uma visão integrativa e abrangente das potencialidades terapêuticas desta espécie no tratamento das enfermidades do trato digestório.

Palavras-chave: *Byrsonima intermedia*; Úlcera péptica; Isquemia; Diarreia; Roedores; Antioxidante; Compostos sulfidrilicos; Glutathione.

ABSTRACT

This study evaluated the pharmacological effects of the methanolic extract (BiMeOH) and the ethyl acetate (AcoEt) and aqueous (AcoAq) partitions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss, a medicinal species of the Brazilian Cerrado, in rodent models of gastrointestinal diseases. Although nitric oxide (NO) did not participate in the gastroprotective action of BiMeOH, the involvement of NO as well as sulfhydryl compounds (SH) in the gastroprotection of AcoAq and AcoEt was shown in acute lesions induced by ethanol. Furthermore, only the AcoAq protected against NSAID-induced ulcers, with reduced levels of myeloperoxidase (MPO). It was also shown the involvement of capsaicin-sensitive neurons in the gastroprotection of BiMeOH and AcoEt. The gastric damage induced by ischemia-reperfusion was not affected by acute (24h) treatment with BiMeOH or partitions but the treatment for 6 days reduced the lesions and the MPO activity and increased levels of total glutathione (GSH). However, treatment with AcoEt and BiMeOH for 6 days decreased lesions accompanied by reduction in MPO and interleukin 1- β (IL 1- β) and increase in interleukin 10 (IL-10). The AcoEt also showed increased GSH and reduction of tumor necrosis factor α (TNF- α). On the other hand, AcoAq only increased levels of GSH and IL-10. Chronic treatment with BiMeOH, AcoAq or AcoEt for 14 days, but not for 7 days, reduced significantly the acetic acid-induced gastric lesions in rats with AcoAq and AcoEt increasing significantly the GSH levels in this model. In the duodenum, BiMeOH and AcoAq protected against injury induced by cysteamine administration. Mucosal lesions: the evaluation of duodenal mucosa by 7 and 14 days of treatment was also observed reduction of injuries by the extract and partitions, up to GSH in AcoEt the period observed. The BiMeOH and AcoAq prevented the diarrhea induced by the castor oil decreasing the watery stools, reducing the accumulation of intestinal fluid and this latter effect was reversed by naloxone, indicating the involvement of opioid receptors. There was no alteration in the intestinal transit. The antidiarrhoeal activity of BiMeOH may also be related to its giardicidal action and antibacterial growth inhibition of *Escherichia coli*. In addition, BiMeOH showed antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori*. Phytochemical screening of AcoAq and AcoEt partitions of BiMeOH characterized mostly condensed tannins and flavonoid derivatives of quercetin in the AcoAq and AcoEt, respectively. Acute toxicity tests showed that a high dose of BiMeOH caused the death of some female mice, suggesting caution in its use. Altogether, the present results demonstrated the antiulcerogenic, antidiarrheic and antimicrobial activity of *B. intermedia* confirming its popular indication for gastritis and gastrointestinal tract disorders. Given the diversity of

pharmacological actions of *B. intermedia* on the gastrointestinal tract, it is possible to establish a comprehensive and integrative view of the therapeutic potential of this species in the treatment of diseases of the digestive tract.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O projeto de doutorado possibilitou a formação específica na área de Farmacologia, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos as úlceras pépticas e a diarreia. Durante a execução do projeto, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional da aluna que serão descritas a seguir.

Disciplinas cursadas em Programas de Pós-Graduação em Farmacologia e Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Disciplinas	Nº de Créditos
Metodologia e Redação Científica.	4
Parâmetros de Sensibilidade a Drogas: Métodos Experimentais.	4
Tópicos de Atualização em Ciências.	4
Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático.	3
Testes Estatísticos Aplicados à Farmacologia.	2
Neurofarmacologia e Comportamento.	2
Plantas Medicinais: Abordagem de Estudo Interdisciplinar.	6
Métodos Biofísicos de Avaliação da Motilidade Gastrointestinal.	4
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Farmacologia de Plantas Medicinais com Atividade Antinociceptiva e/ou Antiinflamatória.	2
Farmacologia Avançada.	5
Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia.	6
<hr/>	
Total de créditos	42

Disciplinas cursadas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

Disciplinas	Nº de créditos
Farmacodinâmica.	4
Metodologia de identificação de plantas com atividade farmacológica.	4
<hr/>	
Total de créditos	8

1. Artigos publicados:

a. Santos, Raquel Cássia; Kushima, Hélio; Rodrigues, Clenilson Martins; Sannomiya, Miriam; Rocha, Lúcia Regina Machado; Bauab, Taís Maria; Tamashiro, Jorge; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*, **2012**.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.008>.

b. Moraes, Thiago Moraes; Kushima, Hélio; Moleiro, Fábio Cruz; Santos, Raquel Cássia; Rocha, Lúcia Regina Machado; Marques, Márcia Ortiz; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, **2009**.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.04.006>.

c. Moleiro, Fábio Cruz; Andreo, Márcio Aparecido; Santos, Raquel Cássia; Moraes, Thiago de Mello; Rodrigues, Clenilson Martins; Carli, Camila Bernardes de Andrade; Lopes, Flávia Cristine Mascia; Pellizzon, Cláudia Helena; Carlos, Iracilda Zeppone; Bauab, Tais Maria; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. *Mouriri elliptica*: Validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.040>.

d. Mazzolin, Lucilene Patrícia; Nasser, Ana Lúcia Martiniano; Moraes, Thiago Mello; Santos, Raquel Cássia; Nishijima, Catarine Massucato; Santos, Fábio Vieira; Varanda, Eliana Aparecida; Bauab, Taís Maria; da Rocha, Lúcia Regina Machado; Di Stasi, Luis Cláudio; Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. *Qualea parviflora* Mart.: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.005>.

e. Lima, Zeila Pinheiro; Santos, Raquel Cássia; Torres, Talita Uliana; Sannomiya, Miriam; Rodrigues, Clenilson Martins; Dos Santos, Lourdes Campaner; Pellizzon, Claudia; Rocha, Lucia Regina Machado; Vilegas, Wagner; Souza-Brito, Alba

Regina Monteiro; Cardoso, Cassia Regina; Varanda, Eliana Aparecida; Moraes, Helen Pimenta; Bauab, Tais Maria; Carli, Camila; Carlos, Iracilda Zeppone; Hiruma-Lima, Clélia Akiko. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.149-160, **2008**.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.047>.

2. Artigo aceito para publicação:

a. Orsi, Patricia Rodrigues; Bonamin, Flavia; Severi, Juliana; Santos, Raquel Cássia, Vilegas, Wagner; Hiruma-Lima, Clélia Akiko; Di Stasi, Luis Claudio. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A Brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models, *in press* no *Journal of Ethnopharmacology*, **2012**.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.001>.

3. Participação em eventos:

a. Nacionais

- i. VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP – 2008, realizado no período de 8 a 12 de Julho de 2008 em Araraquara, São Paulo, Brasil;
- ii. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, realizado no período de 16 a 19 de Setembro de 2008, em São Paulo, São Paulo, Brasil;
- iii. 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no período de 16 a 19 de Outubro de 2008 em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil;
- iv. XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, realizado no período de 19 a 22 de Agosto de 2009, Brasil;
- v. IX Jornada Paulista de Plantas Medicinais, realizada no período de 22 a 24 de Setembro de 2009, em São Paulo, São Paulo, Brasil;

- vi. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no período de 18 a 21 de Outubro de 2010, em Ribeirão Preto, São Paulo; Brasil.
- vii. 7th Biota Symposium e 4th Bioprospecta Program Assessment Meeting, realizado no período de 3 a 10 de Julho de 2011, em São Carlos, São Paulo, Brasil;
- viii. XVII Ciência Jovem – Feira de Ciências, como expositor com o trabalho de IC-Jr intitulado - Avaliação do efeito antidiarrêico do óleo essencial das cascas da laranja amarga (*Citrus aurantium* L.) em modelos animais, no período de 26 a 28 de outubro de 2011, em Olinda, Pernambuco, Brasil.

b. Internacionais

- i. 3rd International Symposium of Post Graduation and Research (III SINPOSPq); realizado no período de 30 a 31 de Outubro de 2008, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;
- ii. 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, realizado no período de 9 e 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal;
- iii. 3rd Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines (PharmSciFair), realizado no período de 13 a 17 de Junho de 2011, em Praga, Republica Tcheca.

4. Apresentação de resumos

a. Eventos Nacionais:

- i. Santos, R.C.; Sannomiya, M.; Pellizon, C.H.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A., “Evaluation of cicatrizing effect of aqueous portion of *Byrsonima intermedia* A. Juss.”,apresentado como **pôster** no VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, realizado no período de 8 a 12 de Julho de 2008 em Araraquara, São Paulo, Brasil;
- ii. Santos, R.C.; Sannomiya, M.; Pellizon, C.H.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A., “Evaluation of cicatrizing effect of aqueous portion of *Byrsonima intermedia* A. Juss.”,apresentado como **pôster** no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of

- Ethnopharmacology, realizado no período de 16 a 19 de Setembro de 2008 em São Paulo, São Paulo, Brasil;
- iii. Arruda, A.N.N.; Santos, R.C.; Ferrazoli, C.; Moraes, T.M.; Honda, N.K.; Coelho, R.G.; Hiruma-Lima, C.A.: "Evaluation of involvement of nerve endings sensitive to capsaicin in gastroprotective action of chloroform extract from leaves of a Brazilian Cerrado medicinal specie: *Serjania erecta*, Radlk (Sapindaceae)", apresentado como **pôster** no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, realizado no período de 16 a 19 de Setembro de 2008, em São Paulo, São Paulo, Brasil;
 - iv. Santos, R.C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.: "Avaliação da atividade antidiarrêica do extrato apolar das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss", apresentado como **pôster** no 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no período de 16 a 19 de Outubro de 2008, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil;
 - v. Santos, R.C.; Rodrigues, C.M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.: "*Byrsonima intermedia* A. Juss e os compostos fitoquímicos responsáveis por suas atividades biológicas", apresentado como **pôster** na XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, realizado no período de 19 a 22 de Agosto de 2009, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil;
 - vi. Santos, R.C.; Bonamin, F.; Nasser, A.L.M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.: "Avaliação do potencial farmacológico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) em úlceras gástricas", apresentado como **pôster** na IX Jornada Paulista de Plantas Medicinais, realizada no período de 22 a 24 de Setembro de 2009, em São Paulo, Brasil;
 - vii. Santos, R.C.; Sannomiya, M.; Rodrigues, C.M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.: "Comparative study of different portions and extract from *Byrsonima intermedia* (leaves) A. Juss against disturbances gastrointestinal in rodents" apresentado como **pôster** no 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, realizado no período de 18 a 21 de Outubro de 2010, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;

- viii. Ganev, E.; Kushima, H.; Santos, R.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Rocha, L.R.M.; “Ação antiúlcera do citral em modelos experimentais in vivo: análise do óxido nítrico e grupamentos sulfidrílicos na proteção da mucosa” apresentado como **pôster** no XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, realizado no período de 13 a 15 de Novembro de 2010, em Marília, São Paulo; Brasil;
- ix. Ganev, E.G; Santos, R.C.; Rocha, L.R; Hiruma-Lima, C.A.; “Ação antiúlcera do citral é mediado pelo aumento de muco gástrico” apresentado como **pôster** no XI Workshop da Pós-Graduação realizado no período de 3 a 5 de Maio de 2012, em Botucatu, São Paulo, Brasil.

b. Eventos internacionais:

- i. Santos, R.C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.: “Evaluation of the antiulcerogenic potential of the aqueous portion of *Byrsonima intermedia* A. Juss”, apresentado como **pôster** no 3rd International Symposium of Post Graduation and Research (III SINPOSPq); realizado no período de 30 a 31 de Outubro de 2008, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;
- ii. Nasser, A.L.M.; Silva, A.C.Z.; Tozzo, J.G.; Santos, R.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Tamashiro, J.Y.; Vilegas, W. “Phenolic compounds obtained by HSCCC from *Pouteria ramiflora* leaves na their antioxidant activity”, apresentado como **pôster** no 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), realizado no período de 6 a 9 de Setembro de 2009, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;
- iii. Nasser, A.L.M.; Lira, M.S.; Santos, R.C., Bonamin, F.; Hiruma-Lima, C.A.; Vilegas, W. “Bioactive triterpenes from *Pouteria ramiflora* leaves” apresentado como **pôster** no 2nd Brazilian Conference on Natural Products and XXCIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution Systematics and Ecology, realizado no período de 9 a 12 de Novembro de 2009, em São Pedro, São Paulo, Brasil;
- iv. Santos, R.C.; Ribeiro, C.A.S.; Ferreira, F.G.; Costa, M.; Hiruma-Lima, C.A.: “Efeito antinociceptivo do eucaliptol, composto majoritário de *Eucalyptus* sp. em camundongos” apresentado como **pôster** no 2º

- Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, realizado no período de 9 e 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal;
- v. Santos, R.C.; Ribeiro, C.A.S.; Ferreira, F.G.; Costa, M.; Hiruma-Lima, C.A.: “Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Caryophyllus aromaticus* L. e seu composto majoritário (eugenol) em camundongos” apresentado como **pôster** no 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, realizado no período de 9 e 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal;
 - vi. Santos, R.C.; Rodrigues, C.M.; Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A.: “ Atividade antidiarrêica de frações e extratos das folhas de *Byrsonima intermedia* A.Juss” apresentado como **comunicação oral** no 2º Congresso Iberoamericano de Fitoterapia, realizado no período de 9 e 10 de Outubro de 2009, em Lisboa, Portugal;
 - vii. Santos, R.C.; Sannomyia, M.; Rodrigues, C.M.; Vilegas, W.; Rocha, L.R.M.; Hiruma-Lima, C.A.: “Pharmacological properties of *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae) in peptic ulcer” apresentado como **pôster** no 3rd Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines (PharmSciFair), realizado no período de 13 a 17 de Junho de 2011, em Praga, Republica Tcheca.
 - viii. Dunder, R.J.; Luiz-Ferreira, A.; Manzo, L.P.; Almeida, A.C.A.; Santos, R.C.; Faria, F.M.; Souza-Brito, A.R.M.: “ Antinociceptive effects of índigo alkaloids from *Indigofera truxilensis* (Kunth) in classic model of pain” apresentado como **pôster** no XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Prof. Dr. Francisco de Abreu Matos” realizado no período de 19 a 22 de Setembro de 2011 em Fortaleza, Ceará, Brasil;
 - ix. Nunes, V.V.A.; Nishijima, C.M., Santos, R.C.; Rocha, L.R.M.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C.A.: “Hydroalcoholic extracts of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC and *Myrcia bella* Cambess leaves: analgesic effect and antidiarreal in mice” apresentado como **pôster** no 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), realizado no período de 21 a 24 de Agosto de 2011, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

5. Resumo publicado em revista:

- a) Santos, R. C.; Rodrigues, C.M.; Sannomiya, M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A. Atividade antidiarrêica de frações e extratos das folhas de *Byrsonima intermedia* A. Juss. Revista de Fitoterapia, v.9, p. 86, 2009.
- b) Santos, R. C ; Ribeiro, C.A.S.; Ferreira, F.G.; Costa, M.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito antinociceptivo de eucaliptol, composto majoritário de *Eucalyptus* sp. em camundongos. Revista de Fitoterapia, v.9, p. 122, 2009.
- c) Santos, R.C.; Ferreira, F.G.; Ribeiro, C.A.S.; Costa, M.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Carophyllus aromaticus* L. e seu composto majoritário (eugenol) em camundongos. Revista de Fitoterapia, v.9, p. 123, 2009.
- d) Santos, R.C.; Sannomiya, M.; Pellizzon, C.H.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C.A. Aqueous portion by *Byrsonima intermedia* A.Juss (Malthigiaceae) indication of gastroprotective and healing action of a medicinal plants from Brazilian Cerrado. Planta Medica, v.75, p. 933, 2009.

6. Co-orientações:

- a. Iniciação Científica Junior.
 - i. Projeto: Avaliação do efeito antidiarrêico do óleo essencial das cascas da laranja amarga (*Citrus aurantium* L.) em modelos animais, aluno: Maycon Tavares, período: Abril de 2011 a Março de 2012;
 - ii. Projeto: Avaliação do efeito antidiarrêico do limoneno obtido do óleo essencial das cascas da laranja amarga (*Citrus aurantium* L.) em modelos animais, aluna: Geiselene de Jesus Santos, período: Abril de 2011 a Março de 2012.

7. Mini-cursos ministrados:

- a. Curso: Potencial farmacológico de Plantas – Sistema Nervoso Central e Trato Gastrointestinal, com duração de **6** horas, no VII Workshop da Pós-Graduação, realizado no período de 23 a 25 de abril de 2009, em Botucatu, São Paulo, Brasil;
- b. Curso de Atualização: Plantas Medicinais, com duração de **7** horas e meia, no 14º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM) realizado no

período de 20 a 22 de Outubro de 2011 em Botucatu, São Paulo, Brasil.

8. Participação em cursos:

a. Curta-duração:

- i. Recentes Avanços no isolamento e detecção de produtos naturais, com carga horária de **8** horas, realizado no período de 8 a 12 de Julho de 2008 em Araraquara, São Paulo, Brasil;
- ii. Efeitos farmacológicos de plantas em modelos animais de desordens psiquiátricas e neurodegenerativas, com duração de **3** horas, realizado no período de 16 a 19 de Setembro de 2008, em São Paulo, São Paulo, Brasil;
- iii. Papéis fisiológicos apostos, de nocicepção e antinocicepção, induzido pelo mesmo agente endógeno – a bradicina, com duração de **3** horas, realizado no período de 16 e 19 de Outubro, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil;
- iv. Problemas éticos e científicos relacionados com a invalidez e a ineficiência de trabalhos com animais de laboratório, com duração de **3** horas, realizado no período de 19 a 22 de Agosto de 2009, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil;
- v. Biology of kinase proteins: exemplification with the immune system, com duração de **3** horas, realizado no período de 18 a 21 de Outubro de 2010 em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil;
- vi. Strategies for the Discovery and Development of New Drugs from Natural Products, com duração de **8** horas, realizado no período de 4 a 5 de Julho de 2011, em São Carlos, São Paulo, Brasil.

b. Longa-duração:

- i. III Curso de Biologia Molecular Genotyping e Curso prático de Marcadores Moleculares, com duração de **44** horas de atividades teórico-práticas, realizado no período de 31 de janeiro a 03 de fevereiro de 2011, em Botucatu, São Paulo, Brasil;

- ii. Curso sobre Animales de Laboratorio com duração de **80** horas de atividades teórico-práticas, realizado no período de 11 a 22 de Julho de 2012 em Buenos Aires, Argentina.

9. Outras Atividades:

- a. **Professora** voluntária no Núcleo Assistencial Joanna de Angelis, totalizando **880** horas aula de ensino de Ciências para Ensino Fundamental, no período de Fevereiro de 2008 a Julho de 2012, em Botucatu, São Paulo, Brasil.
- b. **Comissão de Apoio** do VII Workshop da Pós-Graduação, realizado no período de 24 a 26 de abril de 2008, em Botucatu, São Paulo, Brasil;
- c. **Comissão Organizadora** do VII Workshop da Pós-Graduação, realizado no período de 23 a 25 de abril de 2009 em Botucatu, São Paulo, Brasil;
- d. **Avaliadora de Trabalhos** no VIII Workshop da Pós-Graduação realizado no período de 23 a 25 de abril de 2009 em Botucatu, São Paulo, Brasil;
- e. **Organização de Livro:** LEMKE, N.; RIBEIRO, C.A.S.; SANTOS, R.C.; FERREIRA, F.G.; FONSECA FILHO, P.R. Ensaio em Biociências. Botucatu – Unesp, 109 p.
- f. **Capítulo de livro:** RIBEIRO, C.A.S.; Ferreira, F.G.; SANTOS, R.C. Potencial Farmacológico de Plantas - Sistema Nervoso Central, Trato Gastrointestinal, Analgesia e Inflamação. In: Lemke, N.; RIBEIRO, C.A.S.; SANTOS, R.C.; Ferreira, F.G.; Fonseca Filho, P.R. *Ensaio em Biociências*. Botucatu – Unesp, p. 98 – 109.
- g. **Estágio docência**, disciplina de Fisiologia; área de concentração: Metabolismo e Reprodução, ministrado para o curso de graduação em medicina, sob orientação da prof^a Dra. Lucia Regina Machado da Rocha, realizado no período de 28 outubro a 4 dezembro de 2009;
- h. **Coordenadora** do curso “Reprodução de A a Z” (carga horária de 48 horas) como parte das atividades do Programa de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP:

Interação entre Pós-Graduação e ensino Básico” realizado no período de 23 a 28 de janeiro de 2012 em Botucatu, São Paulo, Brasil.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. Úlcera péptica	27
1.2. Homeostasia da mucosa gástrica.....	29
1.3. Fatores protetores da mucosa	30
1.4. Fatores agressores da mucosa	34
1.5. Radicais livres e defesa antioxidante	37
1.6. Estratégias terapêuticas.....	38
1.7. Diarréia.....	43
1.8. <i>Byrsonima intermedia</i>	44
2. OBJETIVO.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1. Coleta e preparo do material vegetal	46
3.2. Análise fitoquímica.....	46
3.3. Animais.....	47
3.4. Toxicidade aguda e subaguda	47
3.4.1. Toxicidade aguda e <i>screening</i> hipocrático (Brito, 1994)	47
3.4.2. Avaliação da Toxicidade Subaguda.....	48
3.4.3. Lesões Ulcerosas.....	48
3.4.4. Atividade Gastroprotetora	49
a) Indução de lesão gástrica pela administração de indometacina (DAINE).....	49
b) Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na citoproteção.....	49
c) Determinação do papel do NO na citoproteção	50
d) Avaliação do papel dos nervos sensíveis a capsaicina na gastroproteção.....	50

e)	Indução de lesão gástrica por isquemia/reperfusão	51
3.4.5.	Úlceras duodenais induzidas por cisteamina	51
3.4.6.	Atividade Cicatrizante gástrica e duodenal	51
a)	Indução de lesão gástrica por isquemia/reperfusão	51
b)	Indução de lesão gástrica ou duodenal por ácido acético	52
3.4.7.	Quantificação Bioquímica	53
a)	Glutathione Total (Anderson, 1985)	53
b)	Mieloperoxidase – MPO	53
c)	Fator de necrose tumoral α (TNF- α)	53
d)	Interleucina 1 β (IL-1 β)	54
e)	Interleucina 10 (IL-10)	54
3.4.8.	Atividade Antidiarrêica	54
a)	3.8.1. Avaliação da Atividade Antidiarrêica	54
b)	Determinação da motilidade intestinal	55
c)	Determinação do acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino	55
d)	Avaliação do efeito curativo da diarreia induzida por óleo de rícino	55
3.4.9.	Ensaio <i>in vitro</i>	56
a)	Atividade sobre o crescimento em <i>Giardia</i>	56
b)	Atividade sobre o crescimento em <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Helicobacter pylori</i>	57
3.4.10.	Análise Estatística	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1.	Análise fitoquímica	58
4.2.	Toxicidade aguda e subaguda	67
4.2.1.	<i>Screening</i> hipocrático e Toxicidade Aguda	67
4.2.2.	Toxicidade Subaguda	72
4.2.3.	Discussão	74
4.3.	Atividade gastroprotetora	78
4.3.1.	Indução de lesão gástrica por DAINE (indometacina)	78
4.3.2.	Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção	79
4.3.3.	Envolvimento do NO na gastroproteção	84
4.3.4.	Participação dos neurônios sensíveis à capsaicina na gastroproteção	87
4.3.5.	Lesão gástrica induzida por isquemia-reperfusão	91

4.3.6.	Lesão duodenal induzida por cisteamina	93
4.3.7.	Discussão	95
4.4.	Atividade cicatrizante	107
4.4.1.	Isquemia-Reperfusão.....	107
4.4.2.	Úlcera gástrica	118
4.4.3.	Úlcera duodenal	119
4.4.4.	Discussão	124
4.5.	Atividade antidiarreica	133
4.5.1.	Indução de diarreia por óleo de rícino – modelo preventivo	133
4.5.2.	Avaliação da Motilidade Intestinal	136
4.5.3.	Avaliação do acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos.....	137
4.5.4.	Modelo de reversão de diarreia por óleo de rícino	139
4.5.5.	Discussão	140
4.6.	Ensaio <i>in vitro</i>	143
4.6.1.	Crescimento em <i>Giardia duodenalis</i>	143
4.6.2.	Avaliação da ação antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>H. pylori</i>	144
4.6.3.	Discussão	145
5.	CONCLUSÕES.....	149
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
7.	ANEXOS	185

1. INTRODUÇÃO

1.1. Úlcera péptica

As úlceras pépticas são lesões profundas que levam à necrose os componentes do tecido epitelial e conjuntivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos de porções do trato gastrointestinal que ficam expostas a secreção de ácido clorídrico e pepsina (Calam e Baron, 2001).

Sabe-se que uma grande parcela da sociedade sofre de distúrbios no trato gastrointestinal que podem resultar em doenças de elevada gravidade. Nos Estados Unidos, 25% da população já tiveram, em algum momento de suas vidas, sintomas de doenças gastrointestinais. Essas doenças levam ao consumo de um elevado número de medicamentos de supressão ácida para o tratamento de alguma forma de dispepsia (Majumdar, Soumerai *et al.*, 2003). Em estudo realizado no Hospital das Clínicas na cidade de São Paulo em 2005, 33.4% dos pacientes com dispepsias que foram submetidos à endoscopia foram diagnosticados positivamente para úlcera péptica, dos quais 26,5% com úlceras duodenais e 7% com úlceras gástricas (Marques, Mattar *et al.*, 2011).

A úlcera péptica abrange tanto as úlceras gástricas quanto as duodenais, e é uma doença frequente na população, com grande incidência clínica e chance de cura maior que 95% durante o primeiro tratamento. Porém, os elevados índices de reincidências que estão entre 65-80% um ano após a cura e quase 100% depois de dois anos da interrupção do medicamento, demonstram a relevância desta doença na clínica médica. O tratamento definitivo da doença, e principalmente medidas preventivas que evitem as elevadas taxas de recidivas da doença, ainda são grandes desafios no campo médico. Podem apresentar complicações severas

como hemorragias, perfuração e raramente causar penetração nos órgãos retroperitoneais causando dores severas (Malfertheiner, Chan *et al.*, 2009), mas podem causar morbidade e elevada taxa de mortalidade em seus portadores sem manifestação prévia (Fan, Feng *et al.*, 2005; Malfertheiner, Chan *et al.*, 2009).

A localização mais frequente da úlcera duodenal é na porção do bulbo (região proximal ao piloro), no qual todo o conteúdo gástrico entra em contato com o intestino delgado. No estômago, o local mais frequente para o surgimento das úlceras gástricas é na menor curvatura do estômago, a partir do piloro até a cárdia (Malfertheiner, Chan *et al.*, 2009). Ao menos uma vez na vida, 5 a 10% da população americana serão acometidas pela úlcera péptica que é duas a quatro vezes mais prevalentes que a úlcera gástrica (Sonnenberg e Everhart, 1997; Chan e Leung, 2002).

Dados epidemiológicos têm demonstrado marcantes variações de incidência geográfica, prevalência e suas complicações. O desenvolvimento da úlcera tem sido associado ao surgimento da urbanização com aumento da incidência em indivíduos nascidos a partir do século 19 (Susser e Stein, 1962; Sonnenberg, 2006). A compreensão da úlcera péptica mudou muito com a descoberta da *Helicobacter pylori* em 1982 por James Robin Warren e Barry James Marshall (Warren e Marshall, 1983; Marshall e Warren, 1984). Esta descoberta mudou o conceito da úlcera, de uma doença relacionada apenas à secreção ácida, para uma doença infecciosa e conseqüentemente propiciou a expansão dos estudos da úlcera para intensas investigações na área infecciosa. A manutenção da terapia supressiva de ácido, que foi seguida após décadas de domínio de intervenções cirúrgicas (resseções gástricas, várias formas de vagotomia) foi então substituída por um regime de curto prazo de antibióticos para eliminar a bactéria *H. pylori* (Jama, 1994; Malfertheiner, Megraud *et al.*, 2007). Este estudo, como nova forma

de promover a cura das úlceras pépticas, recebeu seu reconhecimento com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia atribuído a Warren e Marshall em 2005. No entanto, este reconhecimento ainda não concluiu o capítulo envolvido com o tratamento das úlceras pépticas (Malfertheiner, Chan *et al.*, 2009). Infelizmente, o tratamento da úlcera e suas complicações permanece como um grande desafio na medicina, principalmente em decorrência do uso frequente das DAINEs, um dos medicamentos mais consumidos pela população mundial, que em doses baixas são causas cada vez mais importantes das úlceras mesmo em pacientes *H. pylori*-negativos (Gabriel, Jaakkimainen *et al.*, 1991; Garcia Rodriguez e Barreales Tolosa, 2007). O tratamento das úlceras pépticas não somente tem sido conduzido para a redução dos fatores agressivos à mucosa gastroduodenal, mas também ao fortalecimento dos fatores defensivos do estômago e duodeno (Venkataranganna, Gopumadhavan *et al.*, 1998; Jain e Samuelson, 2006).

1.2. Homeostasia da mucosa gástrica

O trato gastrintestinal é exposto continuamente a estímulos nocivos que podem causar lesões no tecido. Esses estímulos podem ser endógenos como produção de suco gástrico e pepsina, ou exógeno, como a ingestão de álcool, tabagismo, o uso de antiinflamatórios não-esteroidais (DAINEs), fatores dietéticos, estresse, infecções pela bactéria *H.pylori*, entre outros (Belaiche, Burette *et al.*, 2002; Chan e Leung, 2002).

Em resposta a esses estímulos nocivos à mucosa gástrica, existem mecanismos protetores que incluem; fatores pré-epiteliais (muco, bicarbonato, peptídeos), barreira epitelial (superfícies das células epiteliais justapostas secretoras de muco, geradoras de bicarbonato, peptídeos, prostaglandinas-PGs),

renovação celular, fluxo sanguíneo, além de inervação sensorial, produção de PGs e óxido nítrico (NO) e também mecanismos antioxidantes (Laine, Takeuchi *et al.*, 2008).

1.3. Fatores protetores da mucosa

A barreira muco-bicarbonato é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica (Phillipson, Atuma *et al.*, 2002). O muco é secretado pelas células epiteliais da mucosa em todo o trato gastrointestinal, desde o estômago até o cólon, protegendo a mucosa contra agentes nocivos. Esta barreira apresenta em sua constituição, 95% de água e 5% de mucina (Repetto e Llesuy, 2002). O muco, juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como uma barreira contra a autodigestão provocada pelo ácido e pepsina (Allen e Flemstrom, 2005). Quando esta barreira é quebrada, uma série de mecanismos é ativada, incluindo a neutralização do ácido intracelular, reparação epitelial rápida e manutenção e fluxo sanguíneo da mucosa (Laine, Takeuchi *et al.*, 2008).

Quase todos os mecanismos de defesa da mucosa são estimulados ou facilitados pela ação das PGs, que inibem a secreção de ácido, estimulam a produção de muco e bicarbonato e secreção de fosfolípidos, aumentam o fluxo sanguíneo e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa (Szabo, 1991; Kobayashi e Arakawa, 1995; Tarnawski, Tanoue *et al.*, 1995; Atay, Tarnawski *et al.*, 2000; Halter, Tarnawski *et al.*, 2001; Peskar, 2001; Brzozowski, Konturek *et al.*, 2005; Ham e Kaunitz, 2007). A geração contínua de PG do tipo E2 (PGE₂) e também de prostaciclina do tipo 2 (PGI₂) é crucial para a manutenção da integridade e proteção da mucosa contra agentes lesivos e necrosantes (Szabo, 1991; Kobayashi e Arakawa, 1995; Tarnawski, Tanoue *et al.*, 1995; Peskar, 2001;

Brzozowski, Konturek *et al.*, 2005; Ham e Kaunitz, 2007). A atividade protetora das PGs na mucosa é mediada principalmente via receptores EP-1, que também aumentam a secreção de bicarbonato e fluxo sanguíneo da mucosa, em caso de dano, além de diminuir a motilidade gástrica (Takeuchi, Ukawa *et al.*, 1999; Araki, Ukawa *et al.*, 2000; Takeuchi, Ogawa *et al.*, 2002). A ativação de receptores EP-2 levam a diminuição do tônus muscular do trato gastrintestinal, enquanto os receptores do tipo EP-3 e 4 afetam a secreção ácida e de muco, respectivamente (Takahashi, Takeuchi *et al.*, 1999; Kato, Aihara *et al.*, 2005).

Outro agente importante na proteção e manutenção da integridade gástrica é o NO. Este é produzido por três isoformas enzimáticas (NO-sintases): nNOS (neuronal), eNOS (endotelial), e a iNOS induzida (ou inflamatória) que tem sido frequentemente caracterizada no trato gastrintestinal. A ativação da iNOS provoca danos celulares e conseqüentemente a sua inibição pode trazer efeitos benéficos a atividade célula (Kristjansson, Hogman *et al.*, 2005). Estímulos diversos, como a presença de úlcera gástrica gera aumento na atividade da iNOS em contrapartida a ativação das nNOS constitutivas que são capazes de mantêm a barreira mucosa intacta (Kubes e Mccafferty, 2000).

Estudos realizados por Cho (2001) e Ancha (2003) indicam o envolvimento de NO na preservação da mucosa, em modelos experimentais de úlcera gástricas, ao favorecer a ação vasodilatadora, redução da peroxidação lipídica e também a atuação do NO como agente antiinflamatório nos tecidos. O NO é também um importante regulador da secreção de muco no estômago (Wallace e Miller, 2000; Chandranath, Bastaki *et al.*, 2002) e seus efeitos são produzidos pela estimulação da guanilato ciclase nas células epiteliais. O NO também é responsável por inibir a migração de neutrófilos (Banick, Chen *et al.*, 1997) e auxiliar no processo de cicatrização da úlcera gástrica (Jadeski e Lala, 1999). Nessa última, a ação do NO

produz aumento da deposição de colágeno pelos fibroblastos além de estimular a angiogênese (Wallace e Miller, 2000). Entretanto, o NO também pode contribuir com a formação das injúrias teciduais em algumas doenças do trato digestório e alterar a motilidade gástrica (Wallace, Del Soldato *et al.*, 1999; Cho, 2001), além de iniciar respostas inflamatórias quando combinado com outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cho, 2001).

Outro fator que também contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de compostos sulfidrílicos (SH) que tem como função o fortalecimento das ligações das pontes de dissulfeto e a proteção celular ao reduzir a ação das EROs (Konturek, Brzozowski *et al.*, 1990; Matsuda, Li *et al.*, 1999). Os efeitos gastroprotetores dos compostos SH incluem também a proteção celular frente ao estresse oxidativo induzidos por diversos agentes e circunstâncias, como aqueles que ocorrem com as exposições tóxicas como o etanol, DAINEs e estresse (Takeuchi, Okada *et al.*, 1989; Konturek, Brzozowski *et al.*, 1990; Hernandez-Munoz, Montiel-Ruiz *et al.*, 2000; Bayir, Odabasoglu *et al.*, 2006). No processo inflamatório, são gerados os EROs que iniciam uma reação em cadeia que resulta na peroxidação lipídica e morte celular (Tariq, Elfaki *et al.*, 2006). A redução dos níveis normais de SH tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa, facilitando a formação de lesões gástricas (Glavin e Szabo, 1992; Ko e Cho, 1995). Em contrapartida, o aumento significativo desses grupamentos na mucosa favorece a gastroproteção e o fortalecimento da barreira mucosa (Sener-Muratoglu, Paskaloglu *et al.*, 2001). Além dos SH, a microcirculação local tem papel fundamental na manutenção da integridade da mucosa, pois a mesma é essencial para suprir a necessidade de oxigênio e nutrientes, favorecer a produção de muco, a secreção de bicarbonato, além de remover substâncias tóxicas deste tecido

(Laine, Takeuchi *et al.*, 2008). A microcirculação da mucosa gástrica é alterada pelos mediadores secretados pelos nervos sensoriais aferentes e mediadores como NO, PGs e bradicinina (Wallace e Ma, 2001). O NO e PGI₂ protegem a mucosa gástrica contra lesões e combatem a ação prejudicial de vasoconstritores como leucotrienos C₄, tromboxano A₂ e endotelina (Guth, 1992). Quando a mucosa gástrica é exposta a um agente irritante, ocorre uma hiperemia local, caracterizado por um aumento rápido e acentuado do fluxo sanguíneo. Essa resposta hiperêmica é mediada por nervos sensoriais aferentes que permite a remoção e/ou diluição do ácido ou agentes nocivos. Tal resposta parece ser essencial para a defesa da mucosa visto que sua supressão através da restrição mecânica do fluxo sanguíneo leva à intensa necrose hemorrágica (Laine, Takeuchi *et al.*, 2008).

A mucosa gástrica e vasos submucosos são inervados por neurônios aferentes sensoriais primários e os nervos formam um plexo denso na base da mucosa (Stroff, Plate *et al.*, 1995; Holzer, 2007). As fibras nervosas deste plexo entram na lâmina própria (que acompanham vasos capilares) logo abaixo das células da superfície epitelial. Essas terminações nervosas são sensíveis ao conteúdo luminal e/ou a entrada de ácido da mucosa através de canais de sensoriamento. A ativação destes nervos afeta diretamente as arteríolas submucosas, que regulam o fluxo sanguíneo (Guth, 1992). A estimulação de nervos sensoriais gástricos conduz à liberação de neurotransmissores, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) nos terminais nervosos localizados dentro ou/em estreita proximidade com os grandes vasos submucosos (Stroff, Plate *et al.*, 1995; Holzer, 2006; 2007). A CGRP exerce uma atividade protetora da mucosa, provavelmente através de vasodilatação da submucosa mediada por produção de NO. Uma interferência em qualquer aspecto da

inervação sensitiva, como a ablação dos nervos sensoriais aferentes de forma crônica, com elevada dose de capsaicina, por exemplo; diminui a resposta hiperêmica e assim, diminui a resistência da mucosa gástrica às lesões (Peskar, 2001; Holzer, 2006; 2007).

1.4. Fatores agressores da mucosa

Como já citado, uma variedade de fatores endógenos e exógenos podem produzir danos à mucosa gástrica. Como exemplo, a ocorrência de eventos sistêmicos como o estresse térmico ou aplicação de substâncias irritantes na mucosa (Brzozowski, Konturek *et al.*, 1997; Brzozowski, Konturek *et al.*, 2000; Kwiecien, Brzozowski *et al.*, 2002). O consumo de álcool pode produzir erosões gástricas hemorrágicas e a sua ingestão excessiva pode resultar em gastrite caracterizada por edema na mucosa, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular, infiltração de células inflamatórias e necrose (Szabo, Trier *et al.*, 1985; Guslandi, 1987; Ko, Cho *et al.*, 2004). O etanol ainda reduz os SH e glutathiona, aumenta à formação das ERO que possui comprovada ação ulcerogênica (Szabo, Trier *et al.*, 1981; Ajaikumar, Asheef *et al.*, 2005). O etanol ainda induz a liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de PGs e como consequência, redução da produção de muco, além de provocar danos no endotélio vascular da mucosa, desordem da microcirculação e isquemia, o que resulta também na formação de ERO adicionais (Pan, He *et al.*, 2008).

O uso de DAINÉ também está associado à ocorrência de erosões na mucosa gástrica, úlceras, hemorragias e perfuração bem como aumento do risco de complicações graves pela pré-existência de úlceras (Wallace, 2001).

No mundo todo, estima-se que 35 milhões pessoas consomem DAINE diariamente e cerca de 30% desses usuários podem desenvolver toxicidade no trato gastrointestinal decorrente desse uso. Um terço do custo do tratamento de pacientes com artrite é referente a efeitos secundários à DAINE. Em geral, pelo menos 10 a 20% dos pacientes apresentam dispepsia, no entanto, na presença de DAINE a prevalência pode chegar até 50%. Dentro de um período de seis meses de tratamento, a desistência do tratamento medicamentoso de artrite, pela dispepsia como efeito colateral da DAINE, oscila entre 5-15% dos pacientes. A incidência de novas úlceras nestes pacientes artríticos varia entre 10-40% para as gástricas e 5 a 15% para as úlceras duodenais. Porém muitos pacientes são assintomáticos (Dhikav, 2003).

Acredita-se que os efeitos nocivos da DAINE no trato gastrintestinal ocorram principalmente pela inibição da COX-1, resultantes da diminuição da secreção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo e comprometimento da mucosa em reparar defeitos no tecido (Wallace, 1997). O uso de DAINE pode induzir lesão na mucosa do trato gastrintestinal por efeitos tóxicos diretos e reduzir as PGs das mucosas, que desempenham um papel crucial nos mecanismos de defesa e processos de reparação tecidual (Graham e Lu, 2006). A COX está presente em duas isoformas, a isoforma constitutiva COX-1, responsável pela manutenção da integridade da mucosa gástrica e agregação plaquetária e COX-2, isoforma induzível, que é um regulador importante para gerar PGs que medeiam à inflamação e dor (Graham e Lu, 2006; Musumba, Pritchard *et al.*, 2009).

Fatores de risco para o surgimento ou complicações das úlceras gástricas incluem: histórico anterior, idade avançada, uso de DAINE, uso concomitante de DAINE, corticosteróides ou anticoagulantes (Huang, Sridhar *et al.*, 2002; Ashworth, Peloso *et al.*, 2004). A toxicidade produzida pelo DAINE no intestino apresenta

algumas características específicas. O enfraquecimento do esfíncter pilórico leva o desenvolvimento de úlceras, tanto gástricas como duodenais, uma vez que a mucosa gástrica resiste bastante ao ácido, mas não a bile, e vice-versa em relação ao duodeno. A bile e as enterobactérias podem potencializar os danos intestinais em associação com a DAIINE que aumenta a permeabilidade intestinal (Lanas, Panes *et al.*, 2003). A resposta inflamatória que se segue a esse evento está associada com a indução de iNOS e aumento da produção de NO no intestino (Boughton-Smith, Evans *et al.*, 1993; Whittle, 1995; Takeuchi, Yokota *et al.*, 2006).

A infecção por *Helicobacter pylori* é também um fator de risco para o surgimento de lesões gástricas e duodenais (Suerbaum e Michetti, 2002). A infecção por *H. pylori* é responsável pela maioria das úlceras duodenais (90-95%) e gástricas (60-70%) (Shiotani e Graham, 2002), além de estar associada também com as gastrites e com o surgimento do adenocarcinoma gástrico (Jain, Shah *et al.*, 2007). A infecção por *H. pylori* é adquirida geralmente na infância e a sua descoberta ocorre após um longo período de latência durante o qual ocorre progressivo dano gastroduodenal (Graham e Lu, 2006), que inclui uma resposta inflamatória caracterizada por infiltração, tanto aguda quanto crônica, de células inflamatórias, que tendem a prejudicar a integridade da mucosa, levando à formação de úlceras e (Graham e Osato, 2000). A *H. pylori* provoca uma resposta inflamatória na mucosa gástrica com a indução de citocinas no epitélio, predominantemente interleucinas 8 e 1 β (Crabtree, Peichl *et al.*, 1993; Crowe, Alvarez *et al.*, 1995). O influxo de neutrófilos na mucosa com liberação de enzimas lisossomais, leucotrienos e ERO, prejudica a defesa da mucosa e impulsiona o processo imunopatogênico da úlcera. Os linfócitos T e B ativados por citocinas pró-inflamatórias e antígenos regulam uma resposta imune local e sistêmica, com

liberação de citocinas adicionais (IL 1, 2, 6, 10 e TNF- α) e anticorpos (Karttunen, 1991; Dixon, 2000).

Quando os níveis de defesa da mucosa falham ou são invadidos por uma lesão luminal, o próximo nível de defesa é a resposta inflamatória aguda (Wallace e Ma, 2001). A interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são as principais citocinas pró-inflamatórias, que desempenham importante papel na inflamação aguda que é acompanhada por infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica (Konturek, Duda *et al.*, 2000).

1.5. Radicais livres e defesa antioxidante

Geralmente, os estímulos lesivos sobre a mucosa, responsáveis pelo desenvolvimento de úlceras pépticas, são acompanhados por danos microvasculares locais, com consequente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres e necrose tecidual. (Tarnawski, 2005). Os radicais livres estão envolvidos na patofisiologia de inúmeras doenças do trato gastrintestinal, como as úlceras e inflamações e em doenças hepáticas (Arthur, 1988; Rozga, 1989; Yoshida, Yoshikawa *et al.*, 1995). Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados.

As EROs podem ser formadas pela ativação de células inflamatórias, durante o metabolismo de xenobióticos ou a partir da xantina oxidase durante lesões formadas por isquemia-reperfusão (Blake, Allen *et al.*, 1987; Grisham e Granger, 1988). Sequestradores de EROs são utilizados para proteger a mucosa gástrica de danos oxidativos e acelerar o processo de cicatrização das úlceras. O desequilíbrio entre a formação e a remoção de radicais livres no organismo como

resultado da diminuição de antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas e estruturas celulares, podendo resultar na morte celular (Halliweel e Gutridge, 2005).

Assim, para a defesa contra ataques de radicais livres, as células desenvolveram diferentes sistemas antioxidantes para manter a homeostase celular (Cnubben, Rietjens *et al.*, 2001). De acordo com Augusto (2006) essas defesas podem ser enzimáticas (superóxido dismutase, catalases, glutathionas redutase e peroxidase, peroxirredoxinas, tioredoxinas); não enzimáticas endógenas (glutathiona, ácido urico e albumina) e aquelas presentes na dieta (vitamina E, beta-caroteno, polifenóis, flavonoides, entre outros).

1.6. Estratégias terapêuticas

Por muitos anos, as úlceras pépticas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade (Gustafson e Welling, 2010). O tratamento resumia-se em neutralizar a acidez gástrica com a utilização de antiácidos, tais como carbonatos, bismuto e potássio. Desde então, estes antiácidos ainda são amplamente utilizados, principalmente para o alívio rápido sintomático da doença (Kromer, Postius *et al.*, 2000). Hidróxidos de alumínio e de magnésio são os constituintes mais comuns em preparações antiácidas. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos, além de apresentar potencial quelante, podendo formar complexos insolúveis que atravessam o trato gastrointestinal sem serem absorvidos. Adicionalmente o uso destes antiácidos causa comumente alcalose, arrotos,

náuseas, distensão abdominal, flatulência, diarreia ou constipação (Brunton, 2001; Yuan, Cao *et al.*, 2006).

A secreção ácida e de pepsinogênio na mucosa gástrica são estimulados através de receptores muscarínicos pela acetilcolina. Assim, o bloqueio destes receptores poderia ser uma terapia eficaz para o tratamento das úlceras (Pfeiffer, Kromer *et al.*, 1995). Com base em sua elevada afinidade para bloquear receptores muscarínicos em gânglios da parede do estômago, a pirenzepina foi desenvolvida como um medicamento de ação anti-secretória, seguida do desenvolvimento da telenzepina, um derivado mais potente com melhor resultados na cicatrização (Dammann, Dreyer *et al.*, 1989). Entretanto, vários efeitos colaterais foram relatados pelo uso destes medicamentos como: boca seca, visão turva e constipação, que juntamente com a inibição incompleta da secreção de ácido gástrico, limitaram a sua utilização na clínica.

O tratamento da úlcera péptica passou por diversos protótipos importantes. Nos anos 70, com a introdução no mercado dos antagonistas de receptores H₂, do tipo cimetidina e ranitidina, houve uma mudança significativa no panorama do tratamento das úlceras pépticas (Kurata, 1983). Os antagonistas de receptor H₂ inibem completamente a interação da histamina com seus receptores, reduzindo assim o volume e a concentração de íons H⁺ no suco gástrico (Jain, Shah *et al.*, 2007). Estes medicamentos são seletivos e têm pouco efeito sobre os receptores H₁ e também inibem a secreção ácida pela gastrina, agonistas muscarínicos, alimentos, distensão fúndica bem como outros agentes farmacológicos além de inibir a secreção ácida basal noturna, o que contribuiu de forma decisiva para a sua eficácia clínica (Brunton, 2001). Porém, o uso frequente deste medicamento durante o tratamento crônico da doença aumenta significativamente os riscos de câncer gástrico (La Vecchia e Tavani, 2002). Posteriormente, as drogas

citoprotetoras, como o misoprostol, um análogo da PGE₁, foram introduzidas no mercado, atuando na inibição da secreção ácida e estimulando os fatores de proteção da mucosa gástrica (Monk e Clissold, 1987). Mas, os efeitos colaterais decorrentes de seu uso, como a diarreia, e a sua utilização como abortivos (Collins, 1990), resultou em sua completa retirada do mercado nacional pela vigilância sanitária.

Desde que Karl Swarcz's em 1910 afirmou "sem ácido, sem úlcera", o desenvolvimento de terapias médicas tem como alvo a secreção gástrica de ácido e o mecanismo de defesa da mucosa (Malfertheiner, Chan *et al.*, 2009). Vários tratamentos surgiram, mas foram gradualmente substituídos, principalmente após a surgimento da classe mais potente de drogas inibidoras da secreção ácida: os inibidores de bomba de prótons (IBP), disponível a partir de 1989. Os IBP bloqueiam seletivamente a H⁺K⁺/ATPase da célula parietal. Com base no pressuposto de que a velocidade da cicatrização da úlcera está associada com o grau de supressão ácida, os IBP tornaram-se relevantes na terapia da úlcera (Gustafson e Welling, 2010). Os IBP são pró-fármacos, que necessitam de ambiente ácido para sua ativação. Estes medicamentos penetram nas células parietais a partir do sangue e devido à sua natureza básica fraca, acumulam-se em canalículos secretores da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons, resultando na formação de sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico (Jain, Shah *et al.*, 2007). Esta forma ativada, reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H⁺K⁺/ATPase, que resulta numa inativação irreversível da bomba. A retomada da secreção do ácido após o tratamento com os IBP só se reinicia após a inserção de novas moléculas de bomba na membrana luminal (Brunton, 2001). Alguns dos efeitos adversos dos IBP incluem náusea, diarreia, tontura (Claessens, Heerdink *et*

al., 2002), hipergastrinemia (Robinson, 1999) e infecções entéricas. A extrema supressão ácida por longos períodos (em doses do IBP recomendadas na terapêutica) podem resultar em acloridia, que por sua vez, podem levar às infecções entéricas como febre tifoide, cólera e disenteria (Jain, Shah *et al.*, 2007). Interações dos IBP com outras drogas podem levar à diminuição da absorção de drogas como griseofulvina, cetoconazol, vitamina B12, sais de ferro, entre outros. Existem relatos de variação individual em resposta aos IBP que podem causar hipergastrinemia, pólipos gástricos e carcinomas além de dores abdominais, diarreia, náusea e dor de cabeça (Mullin, Gabello *et al.*, 2009).

Alguns estudos relatam os efeitos nocivos dos IBP associados à infecção por *H. pylori*, os quais podem agravar o quadro de gastrite, levando às sérias complicações do trato gastrointestinal (Stolte, Meining *et al.*, 1998; Suzuki, Suzuki *et al.*, 2002; Uemura, Okamoto *et al.*, 2002). Estes autores também relatam que pacientes *H. pylori* positivo em tratamento com IBP como omeprazol e lansoprazol ou com antagonistas de receptor H₂ como a ranitidina apresentam mudanças no padrão de gastrite, com consequente ativação de neutrófilos no corpo gástrico. Estudos indicam um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer gástrico após o uso prolongado dos IBP (Sousa *et al.*, 2002; Marcolin *et al.*, 2004). Somado a isso várias reações adversas já foram descritas para os IBP dos quais destacam-se: Zlabek e Anderson (2002) descrevem a presença de reações adversas graves, como trombocitopenia; Ra e Tobe (2004) citam a nefrite intersticial aguda; Fisher Le Couteur (2001) a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade; reações anafiláticas (Gonzalez, Soriano *et al.*, 2002) e a presença de ginecomastia e impotência em usuários de IBP (Sabesin, 1993). A supressão gástrica extrema causada por drogas antissecretórias induz interações leucocitárias no endotélio via liberação de gastrina, que é um estimulante da secreção ácida gástrica e é considerado um

agente pró-inflamatório, contribuindo para a inflamação causada pela *H. pylori* (Alvarez, Ibiza *et al.*, 2006; Alvarez, Ibiza *et al.*, 2007).

Além dos efeitos colaterais dos medicamentos antiulcerogênicos disponíveis no mercado, outro fator importante é o fato do mercado farmacêutico brasileiro ser composto predominantemente por empresas multinacionais que vendem predominantemente produtos originados a partir de pesquisas desenvolvidas em seus países, elevando os custos dos medicamentos e dificultando o seu acesso pela população com baixa renda. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 65 a 80% da população, principalmente dos países em desenvolvimento, usam como medicamentos extratos ou porções oriundas de plantas, devido à falta de recurso e/ou difícil acesso à medicina moderna (Calixto, Kassuya *et al.*, 2005; Gurib-Fakim, 2006).

Desse modo, o tratamento das úlceras pépticas constitui ainda um grande desafio e torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de custo mais acessível. Segundo Schmeda-Hirschmann (2005), dentre as diversas fontes de novas moléculas farmacologicamente ativas, as originárias de produtos naturais são consideradas fontes importantes de novas moléculas para o tratamento da úlcera péptica. Aliado a isso, estudos têm demonstrado que substâncias de origem vegetal, apresentam atividade antiúlcera bastante significativa (Borrelli e Izzo, 2000; Rodriguez *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2006).

1.7. Diarréia

Além das úlceras gástricas, outra doença que acomete a população de países em desenvolvimento é a **diarréia**.

Apesar do avanço na compreensão das causas, do tratamento e da prevenção da diarréia, aproximadamente 4.6 milhões de pessoas, incluindo 2.5 milhões de crianças morrem anualmente em decorrência da diarréia (Kosek, Bern *et al.*, 2003; Thapar e Sanderson, 2004) principalmente em países em desenvolvimento. Segundo Oliveira (2010) no período de 1995 a 2005, ocorreram 39.421 mortes por diarreia e 1.505.800 internações associadas a esta doença em crianças menores de um ano de idade no Brasil.

É uma das mais prevalentes desordens humanas e compreensivelmente sua cura ocupa um lugar especial nos anais de medicina (Massee e McGahey, 2001). A OMS define como diarréia a ocorrência de fezes em estágios aquosos durante o período de 24 horas (Allen, Okoko *et al.*, 2004). A maior causa de mortes por diarréia é decorrente da desidratação, que resulta da perda de eletrólitos nas fezes (Brijesh, Daswani *et al.*, 2006). A diarréia e disenteria estão associadas à condições precárias de higiene e falta de conhecimento sobre suas causas e danos. Os sintomas incluem febre, vômito, dor abdominal além de perda de sangue pelas fezes (Otshudi, Foriers *et al.*, 2000). A diarréia apresenta-se como potencial causa de morbidade e mortalidade, especialmente em crianças e jovens de países em desenvolvimento. Plantas medicinais são promissoras fontes de drogas antidiarrêicas (Maikere-Faniyo, Van Puyvelde *et al.*, 1989; Almeida, Karnikowski *et al.*, 1995); Por esta razão, organizações internacionais como a OMS têm encorajado estudos para o tratamento e prevenção da diarréia dependendo de tradicional prática medicinal (Lutterodt, 1989).

1.8. *Byrsonima intermedia*

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo. Toda essa biodiversidade está distribuída em grandes biomas, como o Cerrado, Floresta Amazônica, Caatinga, entre outros. Nas áreas de Cerrado, muitas plantas têm sido utilizadas como medicamentos por habitantes da região.

A espécie *Byrsonima intermedia*, aparece no cenário de plantas utilizadas como medicinais, sendo conhecida como murici-pequeno. Este arbusto do Cerrado é considerado medicinal por sua propriedade antiúlcera e adstringente nas diarreias e disenterias. Estudos conduzidos por Alves *et al.* (2000) revelaram que o extrato metanólico obtido a partir das folhas de *B. intermedia* destacou-se como um candidato promissor ao combate da esquistossomose por sua atividade molusquicida. Estudos recentes (Moreira, Vilela *et al.*, 2011; Orlandi, Vilela *et al.*, 2011) demonstraram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de folhas e cascas de *Byrsonima intermedia* em modelos experimentais *in vivo*. As folhas são tradicionalmente utilizadas para o tratamento da febre, tuberculose, infecções fúngicas e bacterianas, bem como doenças dérmicas e gastrointestinal (Nogueira, Paiva, *et al.*, 2007; Agra, Silva *et al.*, 2008).

2. OBJETIVO

Encontrar extratos vegetais farmacologicamente ativos com potencial terapêutico para o combate e/ou prevenção das úlceras pépticas e a diarreia e oferecer novas opções terapêuticas que possuam um melhor efeito terapêutico e promovam a ausência ou atenuação dos efeitos adversos. Com este intuito, neste projeto foi realizada a investigação farmacológica dos mecanismos de ação do extrato metanólico e partições de *Byrsonima intermedia* frente à úlcera péptica e diarreia experimental.

Para tanto, são objetivos específicos do projeto:

- a) Investigar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiulcerogênica (gástrica e duodenal) do extrato e das partições de *B. intermedia* em modelos animais que simulam a ação dos principais fatores ulcerogênicos endógenos e exógenos;
- b) Caracterizar os mecanismos envolvidos na atividade antidiarrêica do extrato e partições de *B. intermedia* em modelos animais;
- c) Caracterizar o envolvimento das porções aquosas e acetato obtidos da partição acetato de etila de *B. intermedia* nas ações antiulcerogênicas e antidiarrêicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e preparo do material vegetal

O material vegetal foi coletado em julho de 2007 na cidade de Pratânia, São Paulo. O material vegetal fértil foi identificado pelo Professor Jorge Tamashiro, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e o *voucher* (ref. Nº 24164) foi depositado no Herbário do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Após a coleta do material fresco, foi realizada a separação das folhas de *Byrsonima intermedia*, que foram devidamente secas e trituradas em moinho de faca. O material vegetal foi colocado em contato com o solvente metanol (P.A.) e após sete dias de extração com o solvente, foi realizada a filtração do conteúdo obtido em filtro a vácuo. Em seguida, o extrato foi concentrado através de evaporação em rotaevaporador a 60 °C e resultou no extrato metanólico das folhas de *B. intermedia*. (BiMeOH) A extração da partição acetato de etila foi realizada a partir do extrato metanólico, submetido à extração por partição com uma mistura de acetato de etila e água, na proporção 1:1 (v:v). As diferentes fases foram separadas em Partição Acetato de Etila porção Acetato (AcoEt) e Partição Acetato de Etila porção Aquosa (AcoAq).

3.2. Análise fitoquímica

As quantificações fitoquímicas foram realizadas no Instituto de Química, da UNESP, Campus de Araraquara-SP, em parceria com a Profa. Dra. Miriam Sanomiya e com o Prof. Dr. Clenilson M. Rodrigues, supervisionados pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas.

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco[®]) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco[®]). Em modo analítico, foi utilizado coluna de fase reversa RP18, modelo Synergi Hydro (Phenomenex[®]) de 250 x 4,6 mm, com partículas de tamanho médio de 4 µm, com coluna de

guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm. Amostras e padrões foram injetados através de um injetor Rheodyne 7125 (Rheodyne[®]) com um loop variável de capacidade máxima de 100 µl. Uma balança analítica FA2104N, de capacidade para 200 g e precisão de 0.001 g (Bioprecisa[®]), foi usada na pesagem dos extratos.

Amostras foram preparadas pesando-se 10 mg de cada extrato, estas foram solubilizadas em 1 mL de uma mistura composta por MeOH/H₂O (3:7, v:v). Depois de solubilizadas, as amostras foram filtradas em membrana de nylon com porosidade de 0.22 µm e o filtrado adicionado em balão volumétrico de 2 mL. O volume final do balão foi completado com a mistura de MeOH/H₂O (3:7, v:v) e a solução resultante armazenada em vial de 2 mL para posterior análise por HPLC.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar (150 a 200g) e camundongos albinos Swiss, machos e fêmeas (25-35g), provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura de 23 ± 2°C e ciclo controlado de 12 horas de claro-escuro. Os animais foram alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais submetidos à Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu (CEEA 18/05).

3.4. Toxicidade aguda e subaguda

3.4.1. Toxicidade aguda e *screening* hipocrático (Brito, 1994)

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas Swiss (n=10), divididos em grupos: um grupo tratado com o veículo (salina) ou tratados com uma única dose aguda de 5.000 mg/kg do BiMeOH. Os tratamentos foram realizados oralmente e os parâmetros comportamentais, descritos por Brito (1994) e presentes

no anexo 1, foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 min. após a administração do extrato. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias, após o início do experimento, bem como o número de mortes dos animais durante todo o período. No décimo quarto dia, todos os animais foram mortos (câmara de CO₂) e foram pesados órgãos como: coração, fígado, pulmão, baço, rins, testículos, ovários e úteros. Esta pesagem foi realizada para a determinação analítica e comparativa entre os diferentes grupos submetidos ao tratamento com o veículo e o extrato.

3.4.2. Avaliação da Toxicidade Subaguda

O experimento de toxicidade subaguda é uma estimativa das propriedades tóxicas *in vivo* da substância teste na sua dose efetiva. Esta avaliação foi realizada juntamente com análise do efeito cicatrizante do extrato e partições. Ratos machos Wistar foram separados em diferentes grupos, a saber: controle negativo (tratado com o veículo salina), BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg). Os tratamentos foram realizados diariamente durante 14 dias pela via oral (v.o.). O peso dos animais foi registrado durante os 14 dias de tratamento. No 15º dia os diferentes grupos foram mortos e os órgãos (coração, fígado, rins, pulmões, baço e testículos) foram removidos para pesagem, o sangue foi coletado para análise bioquímica de parâmetros como: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e Gama glutamil transpeptidase (Gama-GT).

3.4.3. Lesões Ulcerosas

Nos testes de avaliação da atividade antiulcerogênica do BiMeOH, AcoAq ou AcoEt, as drogas-padrão; cimetidina, carbenoxolona ou lansoprazol foram usadas como controles positivos e indicadas em cada modelo de lesão gástrica ou duodenal. Todos os tratamentos foram realizados oralmente em dose-volume de 10 mL/kg. Em cada experimento foi utilizado ainda um grupo controle negativo que recebeu um volume equivalente de uma solução salina 0,9%, veículo no qual foi solubilizada a amostra vegetal ou as drogas-padrão. Em determinados modelos

experimentais ainda, foi acrescentado um grupo denominado de *Sham* (grupo de animais submetido às mesmas condições experimentais dos demais grupos, porém sem nenhum tratamento). Ratos ou camundongos foram mantidos em gaiola especial (com tela no assoalho para evitar coprofagia) sem maravalha e submetidos a jejum de ao menos 12 horas, dependendo do modelo. Para a quantificação das lesões, os estômagos ou duodenos foram colocados entre placa de vidro, os quais foram escaneadas para realização da quantificação, através do aplicativo AVSoft® (mm²).

3.4.4. Atividade Gastroprotetora

a) Indução de lesão gástrica pela administração de indometacina (DAINE).

Ratos Wistar machos foram separados em grupos (n=7), submetidos a jejum de alimento de 12h e com água *ad libitum*. Em seguida os ratos foram submetidos aos diferentes tratamentos com: salina (veículo), cimetidina (100 mg/kg), AcoEt ou AcoAq (100 mg/kg). Transcorridos 30 minutos do pré-tratamento, o agente lesivo indometacina (50 mg/kg solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5%) foi administrado oralmente para todos os grupos. Após 6 horas, todos os animais foram mortos e os estômagos retirados para leitura das lesões gástricas. Tiras do estômago foram retiradas e pesadas para posteriores procedimentos bioquímicos (Djahanguiri, 1969; Guidobono, Pagani *et al.*, 1997).

b) Determinação do papel dos grupamentos sulfidrílicos na citoproteção.

Após o jejum, os ratos Wistar foram divididos em dois grupos: 1 – recebeu a administração intraperitoneal (i.p.) de salina e 2 – administração i.p. de NEM (N-etilmaleimida -10 mg/kg), um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas. Após 30 minutos, todos os grupos de animais receberam os respectivos tratamentos orais: salina (veículo), carbenoxolona (100 mg/kg), BiMeOH (500 mg/kg) ou AcoEt ou AcoAq (100 mg/kg). Após uma hora, os animais receberam a administração oral de 1 mL de etanol por animal (Morimoto, Shimohara *et al.*, 1991) e após 1h da administração do agente lesivo, todos os animais foram mortos, seus estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura, colocados em placas de

vidro e escaneadas para avaliação da área de lesão. Tiras dos estômagos foram retiradas e pesadas para posterior procedimento de dosagem bioquímica (Matsuda, Li *et al.*, 1999).

c) Determinação do papel do NO na citoproteção

Ratos Wistar machos submetidos a jejum foram divididos em grupos de acordo com os respectivos tratamentos. Ratos machos Wistar (n=7) foram divididos em 10 grupos, no qual 5 grupos foram pré-tratados pela via i.p. com 70 mg/Kg de L-NAME (inibidor da NO-sintase L-NG-Nitroarginine Methyl Ester) e os outros 5 com salina. Trinta minutos após este procedimento inicial, os grupos receberam por via oral os respectivos tratamentos (veículo, carbenoxolona, extrato BiMeOH na dose 500 mg/kg ou com as partições AcoEt ou AcoAq-100 mg/kg). Após uma hora, os animais foram submetidos à administração oral com etanol (1 mL/animal) e decorrido 1h do tratamento com o etanol os animais foram mortos, seus estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura, colocados em placas de vidro e escaneadas para posterior avaliação macroscópica das lesões. Tiras dos estômagos foram retiradas e pesadas para posteriores procedimentos de dosagens bioquímicas (Morimoto *et al.*, 1991; Matsuda, Li *et al.*, 1999).

d) Avaliação do papel dos nervos sensíveis a capsaicina na gastroproteção

Para avaliar o envolvimento dos receptores vanilóides (VR-1) no efeito gastroprotetor de *Byrsonima intermedia*, os animais foram pré-tratados pela via s.c. com o bloqueador não-seletivo do receptor vanilóide Ruthenium Red (RR) na dose de 6.0 mg/kg. Ratos machos Wistar (n=5-7) foram divididos em 10 grupos, no qual 5 grupos foram pré-tratados com RR e os outros 5 com salina. Trinta minutos após o pré-tratamento, os animais receberam por via oral com veículo (salina), capsaicina (4 mg/kg), BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg). Decorridos 60 min. do pré-tratamento, todos os grupos foram tratados com 1 mL de etanol absoluto, via oral, para a indução de úlceras gástricas (Morimoto, Shimohara *et al.*, 1991). Uma hora após a administração do etanol os animais foram mortos para a caracterização da área de lesão gástrica e tiras do tecido foram pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas (Pongpiriyadacha, Matsuda *et al.*, 2003, com modificações).

e) **Indução de lesão gástrica por isquemia/reperfusão**

Ratos Wistar (n=8-10) foram separados em diferentes grupos: controle negativo (veículo), controle positivo (lansoprazol 30 mg/kg) e os tratamentos BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg). Trinta minutos após os tratamentos orais descritos anteriormente, os animais já anestesiados com Xilasina e Ketamina (0.4 e 0.8 mg/kg, respectivamente - administradas via intramuscular) e sem seguida cada animal teve o seu abdômen aberto para exposição da artéria celíaca. Após a identificação da artéria celíaca, a mesma foi isolada e um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria, para a interrupção do fluxo sanguíneo gástrico por trinta minutos. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido (para permitir a reperfusão) e permaneceu aberto durante os 60 minutos subsequentes. Ao final, os animais foram mortos, os estômagos foram removidos para caracterização da área de lesão gástrica e tiras do tecido foram pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas (Ueda, Yoshikawa *et al.*, (1989).

3.4.5.Úlceras duodenais induzidas por cisteamina

A úlcera duodenal em ratos foi induzida por administração oral de cisteamina hidrocloreídrica (300 mg/kg de peso corporal) em 19% de solução aquosa em intervalos de 4 horas, em 2 administrações (dose final de cisteamina: 600 mg/kg). Os ratos, após jejum de 2 horas, foram pré-tratados com lansoprazol (30 mg/kg – controle positivo), com o veículo salina (controle negativo), BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg) trinta minutos antes da primeira administração da cisteamina. Decorridas 24h do início do jejum, os animais foram mortos, os duodenos foram retirados e abertos para classificação e análise das lesões. Tiras do duodeno foram retiradas, pesadas e armazenadas para os procedimentos bioquímicos (Szabo e Pihan, 1987).

3.4.6.Atividade Cicatrizante gástrica e duodenal

a) **Indução de lesão gástrica por isquemia/reperfusão**

Ratos Wistar foram anestesiados com Xilasina e Ketamina (administrados via intramuscular na dose de 0.4 e 0.8 mg/kg, respectivamente) e tiveram o

abdômen aberto para exposição da artéria celíaca. Após a identificação, a artéria celíaca foi isolada, submetida a um processo de limpeza e eliminação de aderências e eventual tecido adiposo. Um *clamp* microvascular foi colocado nessa artéria, interrompendo o fluxo sanguíneo gástrico por trinta minutos. Após este período de isquemia, o *clamp* foi removido (para permitir a reperfusão), a incisão foi suturada e os animais retornaram ao biotério para a recuperação pós-cirúrgico. Decorridas 24 horas da cirurgia, os animais foram separados em diferentes grupos: controle negativo (veículo), controle positivo (lansoprazol 30 mg/kg) e os tratamentos BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg). Os tratamentos foram realizados por administração única (24 horas após a cirurgia) ou por um período de 6 dias consecutivos, após a cirurgia. Ao final, os animais foram mortos, os estômagos foram removidos para caracterização da área de lesão gástrica e tiras do tecido foram pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas (Ueda, Yoshikawa *et al.*, 1989 ; Konturek, Brzozowski *et al.*, 2006).

b) Indução de lesão gástrica ou duodenal por ácido acético

Ratos Wistar foram anestesiados e tiveram o abdômen aberto para exposição do estômago ou duodeno. Um tubo plástico de 4,2 mm de diâmetro interno foi firmemente aplicado à superfície serosa da parede do estômago ou duodeno (5 mm aproximadamente distante do piloro). O volume de 70µl de ácido acético à 80% foi aplicado por 20 segundos na superfície gástrica ou 10 segundos na superfície serosa do duodeno. O ácido acético foi então removido completamente e a superfície do tecido foi lavada com solução salina. O animal foi suturado e mantido em observação durante 24 horas após a cirurgia. Após a determinação do estado do animal pós-cirúrgico, os mesmos receberam tratamento oral: veículo, lansoprazol (30 mg/kg), BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg) durante 7 ou 14 dias para ambos os procedimentos (lesão gástrica ou duodenal). No final do período de tratamento, os animais foram mortos e o estômago ou duodeno foi removido para análise macroscópica da lesão e tiras do tecido foram pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas (Okabe, Roth *et al.*, 1971 ; modificado por Konturek *et al.* (1988).

3.4.7. Quantificação Bioquímica

Para a realização das determinações bioquímicas, foi adicionado ao experimento um grupo denominado de Branco que não passou por intervenção cirúrgica ou administração de agentes lesivos.

a) Glutathiona Total (Anderson, 1985)

As tiras de estômago ou intestino retiradas nos procedimentos experimentais descritos anteriormente, foram pesadas e armazenadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA). O conteúdo de glutathiona total do estômago foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB). A reação enzimática é constituída de 200 µl da amostra contendo 2 mg/mL de proteína, 0,2 M de tampão fosfato pH 8,0; 0,5 mM DTNB (2 mg em 10 mL de citrato de sódio 1%) em um volume final de 2 mL. A absorvância foi determinada em 412 nm utilizando um espectrofotômetro e a concentração de glutathiona total foi expressa utilizando o coeficiente de extinção de 13,6 mM.

b) Mieloperoxidase – MPO

As tiras de tecidos (estômago ou duodeno) armazenadas foram pesadas e congeladas à -80°C até o momento da quantificação. Foi utilizado o tampão de reação HTAB (a 0,5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6,0) que atua como detergente quebrando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, que então foi liberada. A atividade enzimática foi determinada seguindo a cinética da reação da enzima com água oxigenada do tampão de reação, sendo que 1 unidade de MPO determinada é capaz de degradar 1 nmol/min de água oxigenada a 25°C. A atividade da MPO é proporcional ao número de neutrófilos infiltrados na mucosa. A absorvância foi determinada em 450 nm utilizando um espectrofotômetro (Krawisz, Sharon *et al.*, 1984).

c) Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

Para a quantificação de TNF α , as amostras do estômago foram acondicionadas em tubos com tampão PBS pH 7.4 (1/20 v/v). Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram congelados a

-80°C até o ensaio. O TNF- α (DY510) foi quantificado pela técnica imunoenzimática (ELISA) detectável em absorvância de 450 nm, seguindo orientações técnicas do fabricante (Camuesco *et al.*, 2004).

d) Interleucina 1 β (IL-1 β)

Tiras de estômagos submetidos ao procedimento de isquemia-reperusão foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato, seguida por centrifugação das amostras. A dosagem de IL 1- β (DY501) foi determinada pela técnica imunoenzimática (ELISA) detectável em absorvância de 450 nm seguindo orientações técnicas do fabricante (Smith, Krohn *et al.*, 1985).

e) Interleucina 10 (IL-10)

Tiras de estômagos de ratos submetidos ao modelo de indução de lesão por isquemia-reperusão e tratados por 6 dias com BiMeOH (500 mg/kg), AcoAq ou AcoEt (100 mg/kg) foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M (pH=7.4), seguida por centrifugação a 12.000 rpm das amostras. A concentração de IL-10 foi caracterizada pela técnica de ELISA com auxílio do Kit da empresa R&D systems e a leitura da absorvância foi realizada a 450 nm (Smith, Krohn *et al.*, 1985).

3.4.8. Atividade Antidiarrêica

a) 3.8.1. Avaliação da Atividade Antidiarrêica

Camundongos *Swiss* machos (n=7-8) foram divididos aleatoriamente em grupos controle (negativo tratados com veículo) e controle positivo (loperamida 3 mg/kg) e tratamentos (BiMeOH, AcoEt ou AcoAq). Cada animal foi colocado em gaiola individual, sem contato com as fezes, cujo assoalho foi recoberto por papel filtro (mata-borrão). O extrato BiMeOH foi avaliado na dose de 500 mg/kg enquanto AcoAq e AcoEt foram avaliadas em diferentes doses: AcoAq – 100, 180, 250 e 353.35 mg/kg e AcoEt 100 e 146.65 mg/kg. Após 30 min., cada animal recebeu 0,2 mL de óleo de rícino (v.o.) que é o agente catártico indutor das diarreias. Os parâmetros foram analisados por um período de 4 horas após a administração do agente catártico. Foram avaliados os tempos de início das fezes aquosas

(evacuações) e as excreções foram classificadas seguindo um score numérico baseado na consistência de evacuação (stool) atribuída como segue: stool=1 – normal, stool=2 – semi-sólido e stool=3 aquoso (Awouters, Niemegeers *et al.*, 1978; Mukherjee, Saha *et al.*, 1998).

b) Determinação da motilidade intestinal

Camundongos *Swiss* machos (n=7), em jejum foram divididos em grupos, que receberam seus respectivos tratamentos orais: salina (controle negativo), atropina 5 mg/kg (i.p., controle positivo), AcoEt ou AcoAq (100 mg/kg). Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% (p.o.) em volume de 10 mL/kg. Meia hora após a administração do carvão, todos os animais foram mortos. O passo seguinte foi à remoção de todo intestino delgado juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, para a obtenção da relação entre a distância percorrida e comprimento total do intestino (Stickney e Northup, 1959) com modificações).

c) Determinação do acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino

Camundongos *Swiss* machos (n=7), em jejum foram divididos em grupos, que receberam os tratamentos orais: salina (controle negativo), morfina 10 mg/kg (s.c. como controle positivo), BiMeOH (500 mg/kg), AcoEt (100 mg/kg) ou AcoAq (100, 250 ou 353.35 mg/kg). Após 60 min., todos os animais receberam óleo de rícino (0,2 mL/animal) e meia hora após a administração do agente catártico, os animais foram mortos e foi retirado o intestino delgado a partir do piloro até o entroncamento ileocecal. Foram realizadas pesagens do: intestino cheio, conteúdo intestinal e intestino vazio (Robert, Nezamis *et al.*, 1976; Di Carlo, Autore *et al.*, 1993). Para avaliar a participação da via opióide nesta atividade, naloxona (30 mg/kg, i.p.) foi administrada 15 min. antes dos pré-tratamentos.

d) Avaliação do efeito curativo da diarreia induzida por óleo de rícino

Camundongos *Swiss* receberam 0,2 mL/animal de óleo de rícino e foram tratados com BiMeOH (500 mg/kg) ou AcoAq (265 mg/kg) quinze minutos após a administração do agente catártico. Os parâmetros foram analisados por um período de 4 horas após a administração dos tratamentos. Foram avaliados o tempo de início

das fezes aquosas (evacuações) e as excreções foram classificadas seguindo um score numérico baseado na consistência de evacuação (stool) atribuída como segue: stool=1 – normal, stool=2 – semi-sólido e stool=3 aquoso (Awouters, Niemegeers *et al.*, 1978; Mukherjee, Saha *et al.*, 1998).

3.4.9. Ensaio *in vitro*

a) Atividade sobre o crescimento em *Giardia*

Foram empregados trofozoítos de *Giardia duodenalis* pertencentes à cepa Portland 1 (P-1), isolada e axenizada nos Estados Unidos, a partir de aspirado duodenal de paciente do sexo feminino com giardíase crônica e mantidas no Laboratório de Giardíase do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências/Unesp/Botucatu/SP; empregada como amostra referência. Os cultivos de trofozoítos de *Giardia* foram mantidos em tubos Vacutainer® (5 mL) contendo meio TYI-S-33 suplementado com bile bovina, em estufa a 37°C. Para a manutenção dos cultivos, os repiques foram feitos a cada 72-96 horas, retirando-se do meio exaurido uma suspensão de trofozoítos (aproximadamente 104 trofozoítos/0.01 mL) e transferindo-a para um tubo contendo meio novo.

Para o ensaio de inibição, 10⁵ trofozoítos na fase log de crescimento e as diferentes concentrações do BiMeOH (125, 250 ou 500 µg/ml) foram incubados em meio TYI-S-33 a 37°C por 24, 48 e 72 horas. Controles foram incluídos em todos os experimentos (controle negativo: culturas contendo apenas os parasitas; controle positivo: culturas tratadas com metronidazol a 40 µg/ mL). Após os períodos de incubação, os tubos foram mantidos em banho de gelo por 10 min., centrifugados a 1300 rpm (10 min.) e os trofozoítos obtidos foram contados em câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em triplicata e o efeito dos extratos sobre o crescimento de *G. duodenalis* foi avaliado comparando-se o número de organismos recuperados nas culturas tratadas com o número de trofozoítos presentes nas culturas controle.

b) Atividade sobre o crescimento em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*

BiMeOH foi avaliada nas seguintes concentrações: 125, 250, 500 ou 1000 µg/ mL na presença de *H. pylori* (ATCC 43504 isolado de pacientes com úlcera duodenal). O extrato foi avaliado também na presença de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). As bactérias foram mantidas, durante a realização dos ensaios, em meio de cultura nutriente-ágar, sendo repicadas periodicamente. Foi utilizado claritromicina e ampicilina como controles, respectivamente. As placas foram examinadas visualmente e espectrofotometricamente, determinando-se a concentração inibitória mínima (MIC) de BiMeOH. Os resultados só foram considerados válidos quando o MIC dos controles apresentou valores dentro daqueles estabelecidos pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos (NCCLS).

3.4.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelos testes de Dunnett para comparações múltiplas. O teste T de Student foi utilizado para a análise estatística de diferenças existentes entre dois grupos de tratamento. Para modelos nos quais foi empregada classificação por score, foi utilizado teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn. Foram considerados como nível de significância mínima $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise fitoquímica

A partir da coleta e secagem do material vegetal, foi possível avaliar o rendimento dos extratos e partições, como demonstrado no fluxograma da **figura 1**.

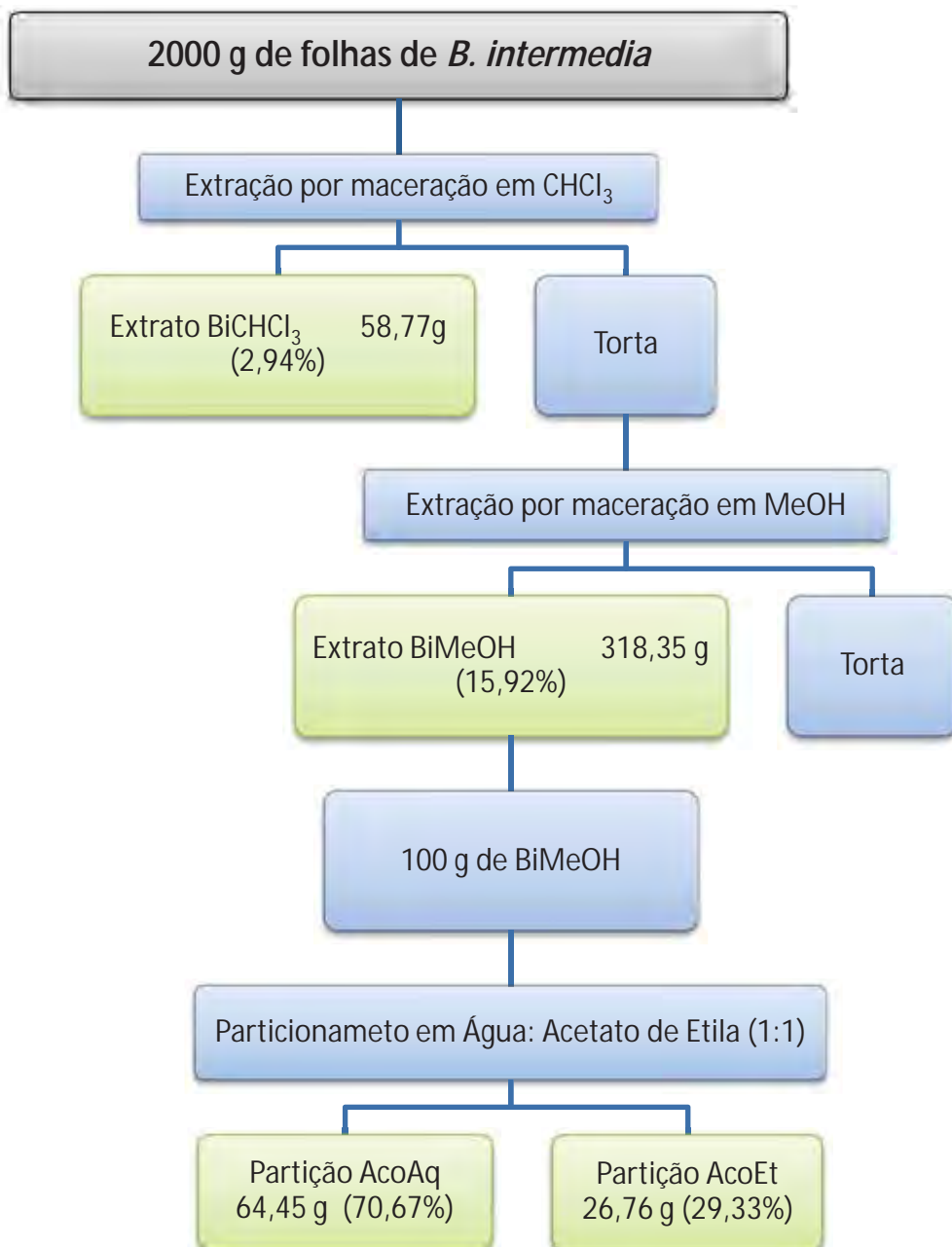


Figura 1: O Fluxograma com a sequência de obtenção e respectivo rendimento dos extratos e partições das folhas *B. intermedia*.

A avaliação da composição química do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia*, bem como das partições acetato de etila (AcoEt) e aquosa (AcoAq), foi realizada usando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-PAD). Cada amostra injetada foi processada em diversos comprimentos de onda. Os espectros individuais foram adquiridos e relacionados com a classe de metabólito secundário, na região do ultravioleta.

Espécies do gênero *Byrsonima* são reconhecidas por apresentarem na sua composição química a presença de flavonóides derivados da quercetina, biflavonóides, derivados de ácidos fenólicos e taninos condensados (Sannomiya, Rodrigues *et al.*, 2004; Sannomiya, Fonseca *et al.*, 2005; Sannomiya, Dos Santos *et al.*, 2007). Os derivados de ácidos fenólicos e flavonóides são facilmente reconhecidos devido às suas características espectrais. Derivados de ácidos fenólicos apresentam uma única banda de absorção referente ao sistema benzílico com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm, **Figura 2-A** (Sticher, 2008).

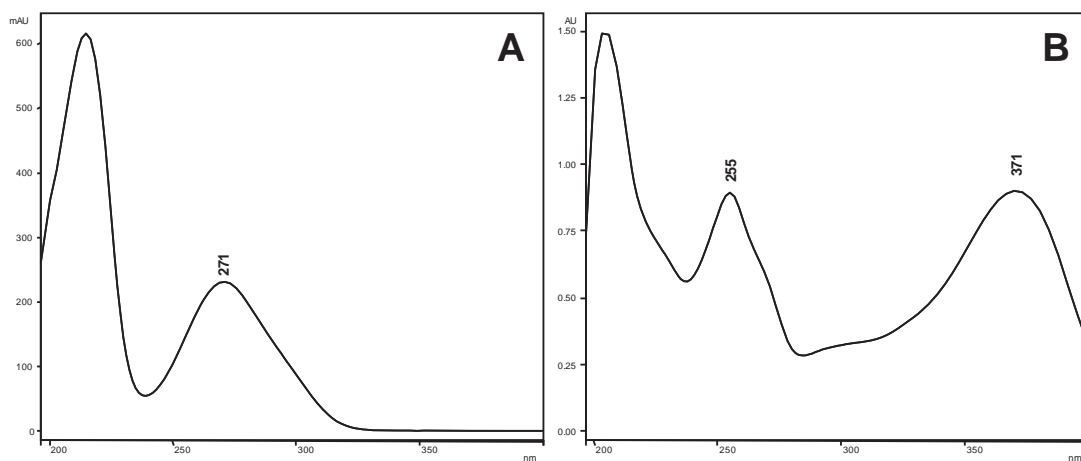


Figura 2. Espectros na região do UV para padrões de: A) ácido gálico, B) quercetina.

Os flavonóides, por sua vez, são reconhecidos por apresentarem, no geral, duas bandas de absorção referentes aos dois sistemas aromáticos encontrados em agliconas; a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e a Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuído ao anel B, **Figura 2-A** (Merken e Beecher, 2000). A Banda I é associada à absorção do Anel B, que possui o sistema cinamoil com maior extensão da conjugação eletrônica. A Banda II é atribuída ao Anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil de menor conjugação (**Figura 3**).

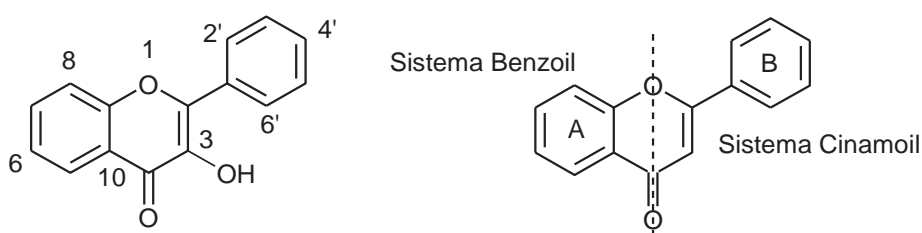


Figura 3. Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.

A **Figura 4-A** ilustra o perfil cromatográfico do BiMeOH processado em 270 nm. Nele é possível verificar a presença de diversos picos cromatográficos

distribuídos ao longo da análise, os quais incluem substâncias bem polares, aquelas compreendidas no início do cromatograma e outras substâncias de média polaridade, representadas pelos picos com alto valor de tempo de retenção (t_r).

No cromatograma da **Figura 4-A**, a confirmação dos taninos condensados pode ser atribuída pela formação de uma larga banda cromatográfica entre $t_r = 35-60$ min. Quando processado em 360 nm (comprimento de onda seletivo aos flavonóides) pode-se verificar que os flavonóides estão compreendidos no final do cromatograma (**Figura 4-B**).

O cromatograma da AcoAq, obtida após etapa de extração líquido-líquido, evidencia pré-concentração das substâncias mais polares do extrato, bem como maior concentração de taninos condensados, visualizados pelo aumento da intensidade de sua banda cromatográfica (100 mV, **Figura 5-A**), quando comparada a intensidade observada para o cromatograma da **Figura 4-A** (30 mV). Além do mais, verifica-se maior seletividade na remoção dos picos em $t_r = 38,7$ min. e 40,9 min., os quais aparentemente são as substâncias majoritárias na porção aquosa.

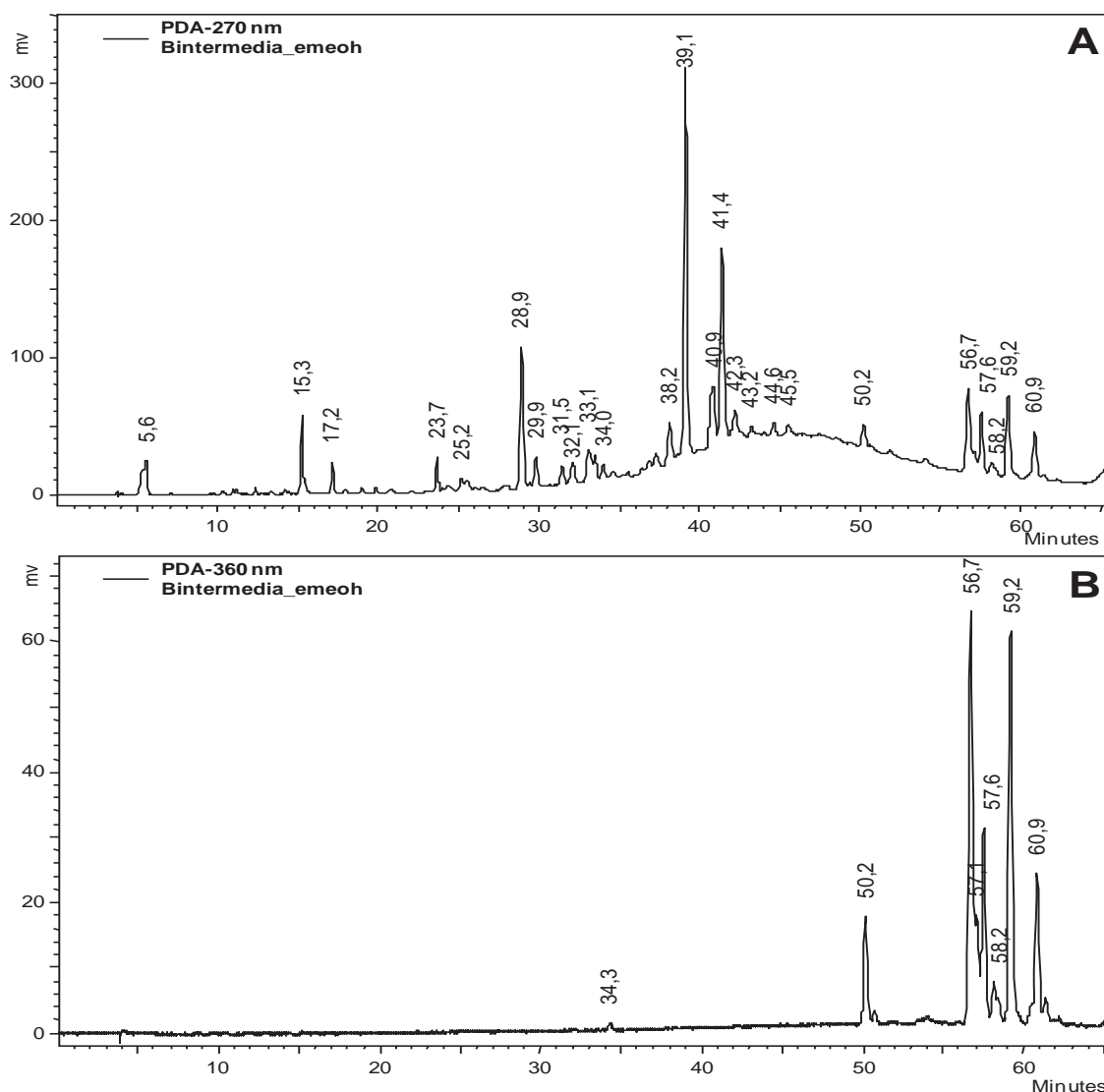


Figura 4: Cromatogramas de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes no extrato MeOH das folhas de *B. intermedia*. Fase móvel: MeOH + TFA 0,1% (b) e H₂O + TFA 0,1% (a). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, (A) λ = 270 nm, (B) λ = 360 nm. Sistema de eluição gradiente: 0-20% b (20 min), 20% b (isocrático, 3 min), 20-50% b (37 min), 50-100% b (5 min), perfazendo uma análise de 65 min.

Quando processado em 360 nm (**Figura 5-B**), o cromatograma da porção aquosa revela que a concentração de flavonóides é bem inferior àquela encontrada no extrato MeOH (**Figura 2-B**). O cromatograma da porção AcoEt evidencia ausência de alguns picos que representam as substâncias mais polares do extrato, como o pico em $t_r = 5,6$ min. (**Figura 5-A**). Da mesma forma, observa-se menor ocorrência dos taninos condensados, mas por outro lado, nota-se que nesta

porção, as substâncias de média polaridade estão distribuídas uniformemente ao longo do cromatograma.

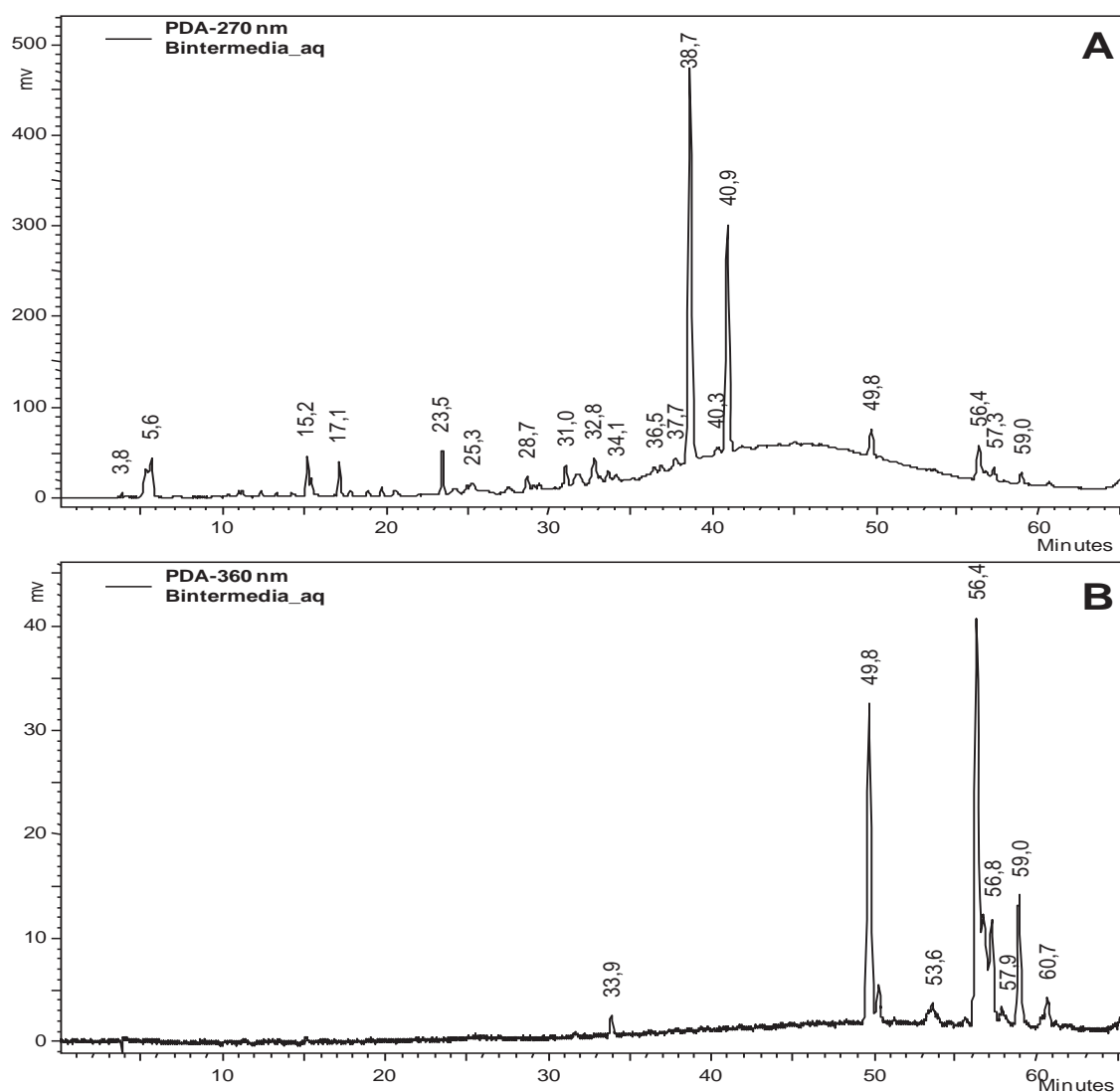


Figura 5: Cromatogramas de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes na porção aquosa (AcoAq) do extrato MeOH das folhas de *B. intermedia*. Cromatogramas de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes na porção aquosa do extrato MeOH das folhas de *B. intermedia* obtida após extração líquido-líquido. Fase móvel: MeOH + TFA 0,1% (b) e H₂O + TFA 0,1% (a). Coluna Phenomenex[®] Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL min⁻¹, (A) λ = 270 nm, (B) λ = 360 nm. Sistema de eluição gradiente: 0-20% b (20 min), 20% b (isocrático, 3 min), 20-50% b (37 min), 50-100% b (5 min), perfazendo uma análise de 65 min.

Quando processado em 360 nm, o cromatograma da **Figura 5-B** evidenciou que a concentração dos flavonóides é maior nesta porção do que aquela encontrada no extrato bruto e na porção aquosa.

A **Tabela 1** mostra um comparativo entre os três perfis cromatográficos do extrato e porções de *B. intermedia*. Com base nas informações obtidas com os espectros de UV extraídos para cada um dos picos analisados foi possível atribuir à classe de substâncias a que eles pertencem.

Tabela 1. Atribuição da classe dos constituintes químicos encontrados no extrato BiMeOH e porções AcoAq e AcoEt de *B. intermedia*.

BiMeOH		AcoAq		AcoEt	
Tempo de retenção (min)	Classe de substância	Tempo de retenção (min)	Classe de substância	Tempo de retenção (min)	Classe de substância
5,6	AF	5,6	AF	-	-
15,3	Ac. gálico	15,3	Ac. Gálico	15,2	Ac. Gálico
17,2	AF	17,2	AF	17,2	AF
23,7	AF	23,3	AF	24,0	AF
25,2	C	25,2	C	25,2	C
28,9	AF	28,9	AF	28,9	AF
29,9	C	29,9	C	29,7	C
31,5	AF	31,5	AF	31,3	AF
32,1	C	32,1	C	32,9	C
33,1	C	33,1	C	33,4	C
34,0	C	34,0	C	33,9	AF
38,2	C	38,2	C	38,0	C
39,1	AF	39,1	AF	39,0	AF
40,9	AF	40,9	AF	40,7	AF
41,4	AF	41,4	AF	41,2	AF
42,3	C	42,3	C	42,1	C
43,2	C	43,2	C	43,1	C
44,6	C	44,6	C	44,4	C
45,5	C	45,5	C	45,4	C
50,2	F	50,2	F	-	-
56,7	F	56,7	F	56,6	F
57,1	F	57,1	F	57,0	F
57,6	F	57,6	F	57,5	F
58,2	F	58,2	F	58,1	F
59,2	F	59,2	F	59,2	F
60,9	F	60,9	F	60,9	F

*AF = ácidos fenólicos derivados do ácido gálico e ácido galoil quínico (SANNOMIYA *et al.*, 2005; 2007). **C = derivados de catequinas monoméricas e proantocianidinas poliméricas (SANNOMIYA *et al.*, 2005).***F = flavonóides derivados da quercetina (SANNOMIYA *et al.*, 2004)

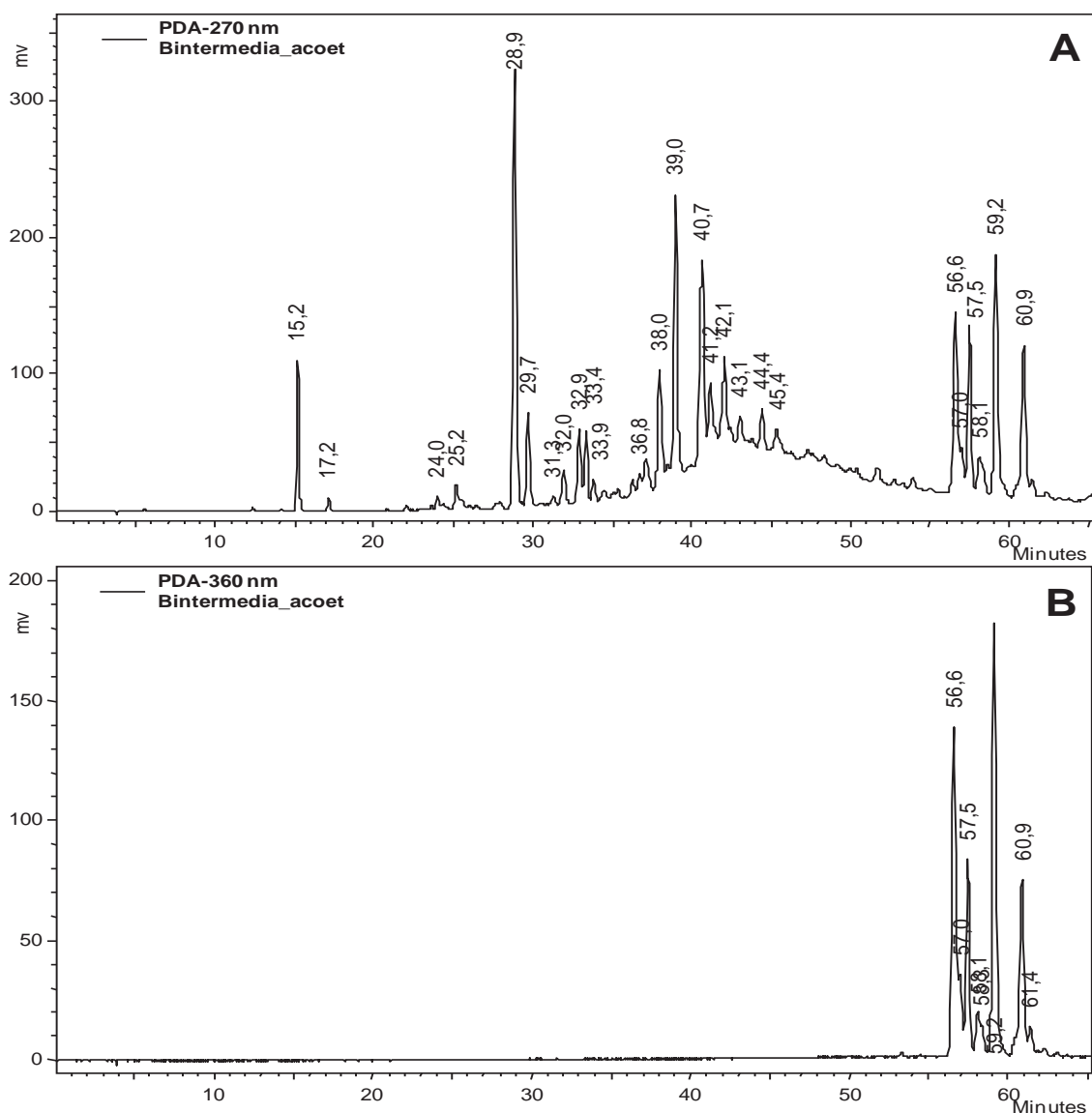


Figura 6: Cromatogramas de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes na porção AcoEt do extrato MeOH das folhas de *B. intermedia*. Cromatogramas de separação por HPLC-PDA dos constituintes químicos presentes na porção AcoEt do extrato MeOH das folhas de *B. intermedia* obtida após extração líquido-líquido. Fase móvel: MeOH + TFA 0,1% (b) e H₂O + TFA 0,1% (a). Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP18 (250 x 4.6 mm i.d.; 4 µm), HPLC (Jasco®), fluxo 1,0 mL min⁻¹, (A) λ = 270 nm, (B) λ = 360 nm. Sistema de eluição gradiente: 0-20% b (20 min), 20% b (isocrático, 3 min), 20-50% b (37 min), 50-100% b (5 min), perfazendo uma análise de 65 min.

A análise fotoquímica do extrato clorofórmico (BiCHCl₃) de *B. intermedia* resultou no fracionamento da fração hexânica (FH) em coluna de sílica gel (13 cm x 1,5 cm d.i.) empregando-se como fase móvel o hexano puro obtiveram-se 102 frações. Após a análise cromatográfica em placa destas frações, pode-se reuni-las em grupos de frações (**Tabela 2**). O fracionamento da FH (1,0 g) em coluna de

sílica gel, empregando-se como eluente hexano, resultou na mistura de hidrocarbonetos de cadeia linear C₃₀ e C₃₂ majoritariamente. Após o re-fracionamento da fração diclorometânica -FD (2,64g) em coluna de sílica gel, resultou no isolamento de grande quantidade da mistura de α -amirina e β -amirina (350 mg). E o fracionamento da metanólica (FM) de *B. intermedia*, no isolamento da mistura dos ácidos oleanólico e ursólico (102 mg) (**Figura 7**).

Tabela 2: Quantidade obtida das frações oriundas do extrato clorofórmico (BiCHCl₃) de *B. intermedia*

BiCHCl ₃	FH	FD	FM
(g)	(g)	(g)	(g)
30	1,96	4,37	14,21

FH: fração hexânica, FD: fração diclorometânica e FM: fração metanólica

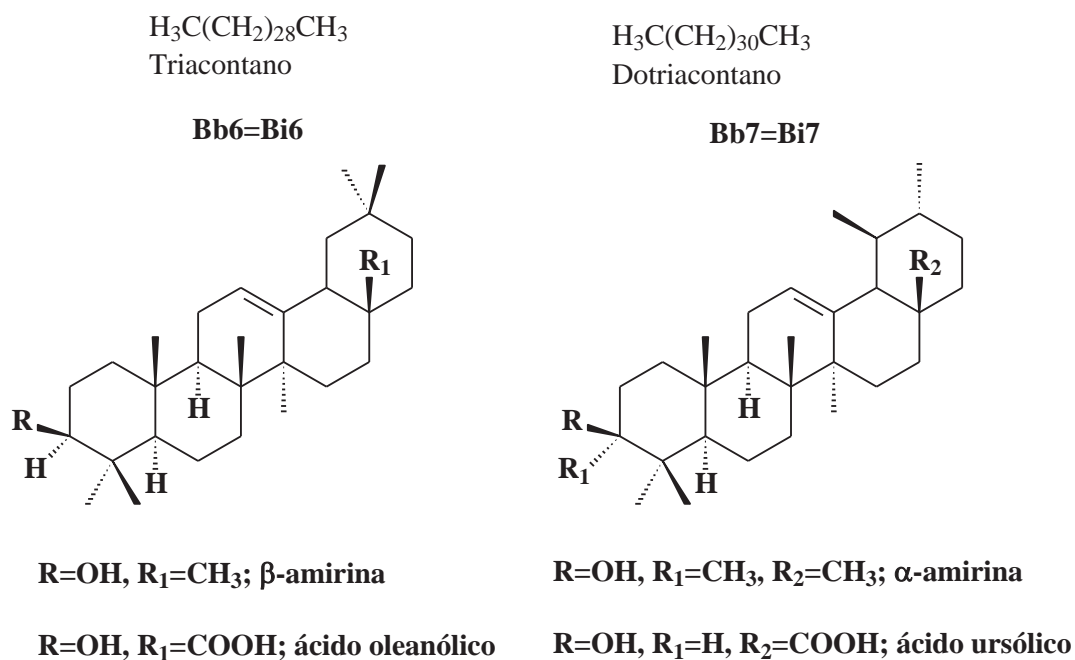


Figura 7: Constituintes isolados no E-CHCl₃ das folhas de *B. intermedia*

O estudo químico das frações oriundas do BiCHCl_3 permitiu o isolamento e/ou identificação da mistura de hidrocarbonetos $\text{C}_{30}\text{-C}_{32}$ na FH, mistura de, majoritariamente triterpenos α -amirina e β -amirina e finalmente da FM, resultou no isolamento e identificação da mistura dos ácidos oleanólico e ursólico.

4.2. Toxicidade aguda e subaguda

4.2.1. *Screening* hipocrático e Toxicidade Aguda

A administração de BiMeOH na dose de 5.000 mg/kg não provocou alterações nos parâmetros comportamentais, das fêmeas e machos, quando comparados ao grupo tratado com o veículo. O monitoramento diário dos pesos corporais das fêmeas não indicou nenhuma variação significativa em relação ao grupo controle (**Figura 8**). No entanto, mortes de fêmeas ocorridas durante o período de observação, entre os dias 1, 3 e 5 após a administração de BiMeOH chamaram atenção, uma vez que a taxa de mortalidade de 30% registrada ao longo do experimento, pode ser considerada relevante neste experimento (**Tabela 3**). Na **figura 9** está demonstrada a evolução do peso corpóreo de camundongos machos, que não apresentou diferença entre o grupo tratado com BiMeOH ou veículo.

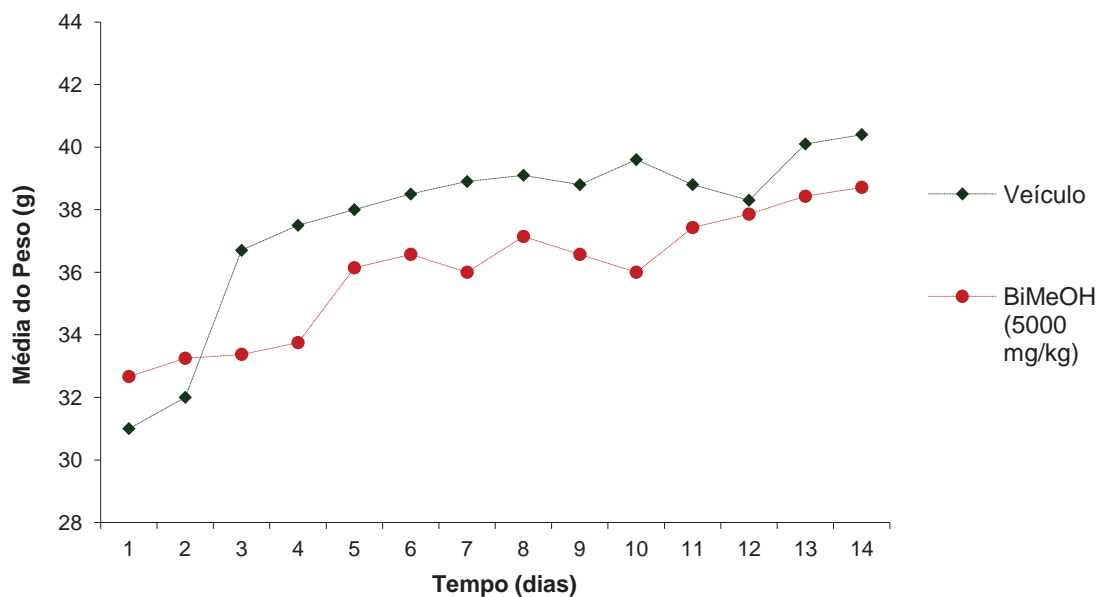


Figura 8: Evolução do peso corporal de camundongos (fêmeas) tratados com extrato metanólico de *B. intermedia* (5000 mg/Kg). Os dados estão mostrados em média do peso dos animais monitorados durante 14 dias.

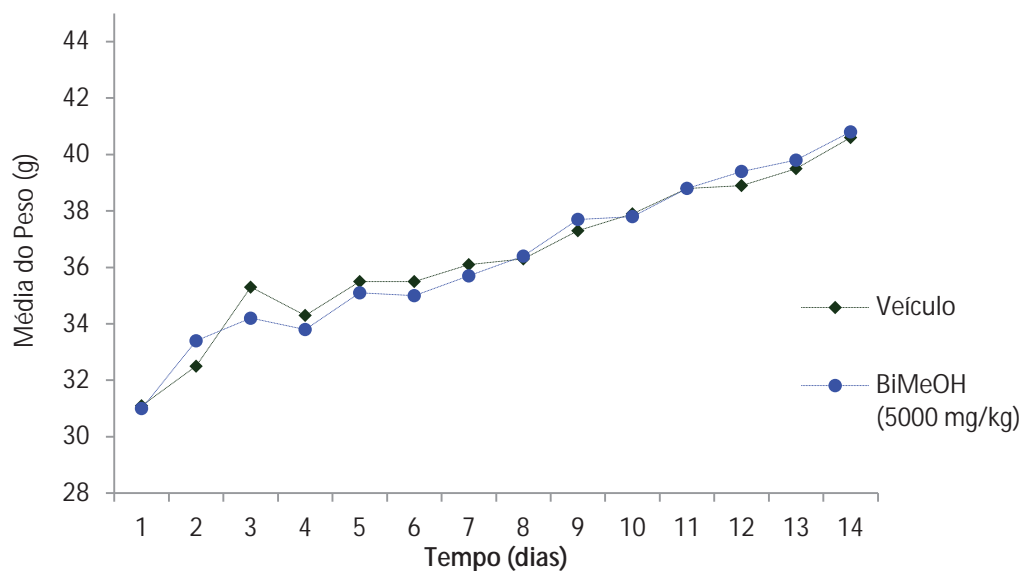


Figura 9. Evolução do peso corporal de camundongos (machos) tratados com extrato metanólico de *B. intermedia* (5000 mg/Kg). Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação.

Outro parâmetro analisado neste experimento foi o peso relativo dos órgãos, obtidos pela razão entre o peso do órgão e peso total do animal transformado em arcoseno para adequação estatística. Não ocorreu diferença significativa ($p>0.05$) entre os grupos tratados com o extrato e com o veículo (**Tabela 3**), tanto para fêmeas quanto para machos. Na **Tabela 4** estão representadas as médias dos pesos dos órgãos reprodutores dos animais tratados com o extrato. Neste parâmetro, também não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com BiMeOH e veículo.

Tabela 3. Efeito do tratamento agudo com o extrato metanólico de *B. intermedia* (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos (g).

Tratamentos		N	Morte	Coração	Baço	Pulmão	Fígado	Rins
♀	Salina	10	0	3,58±0,1	3,83 ± 0,1	4,49 ± 0,1	12,30 ± 0,2	5,08 ± 0,0
	BiMeOH	10	3	3,56 ± 0,1	3,82 ± 0,2	4,41 ± 0,2	12,62 ± 0,4	5,08 ± 0,1
♂	Salina	10	0	3,83 ± 0,1	3,44 ± 0,1	4,63 ± 0,2	13,33 ± 0,2	6,30 ± 0,2
	BiMeOH	10	0	3,98 ± 0,1	3,67 ± 0,1	4,36 ± 0,1	13,11 ± 0,2	6,40 ± 0,2

Para fêmeas: ANOVA: $F_{(1;15)}= 1,11$ para peso do Coração, $F_{(1;15)}= 3,83$ para peso do Baço, $F_{(1;15)}=1,17$ para peso do Pulmão, $F_{(1;15)}= 2,57$ para peso do Fígado e $F_{(1;15)}= 2,20$ para peso do Rins. Para machos: ANOVA: $F_{(1;18)}= 1,73$ para peso do Coração, $F_{(1;18)}= 1,13$ para peso do Baço, $F_{(1;18)}=3,55$ para peso do Pulmão, $F_{(1;18)}= 1,67$ para peso do Fígado e $F_{(1;18)}= 1,12$ para peso do Rins. Os números representam média ± e.p.m. Teste de Dunnett.

Tabela 4. Peso dos órgãos reprodutores dos camundongos tratados com extrato metanólico de *B. intermedia* (5000 mg/kg).

Tratamentos	Testículos	Útero	Ovários [#]
Salina	4,37 ± 0,1	2,38 ± 0,3	10,48 ± 0,5
BiMeOH	4,22 ± 0,1	1,96 ± 0,4	10,01 ± 0,9

ANOVA: $F_{(1;18)}= 2,56$ para peso do Testículos. $F_{(1;15)}= 1,23$ para peso do Útero, $F_{(1;15)}= 2,85$ para peso do Ovários. Os números representam média ± e.p.m. # Os valores reais foram multiplicados por 100 para que fosse viável a realização da conversão dos dados em arcoseno e posterior análise estatística. Teste de Dunnett.

Uma vez que ocorreu elevada taxa de mortalidade (30%) de fêmeas tratadas com BiMeOH (**Tabela 3**) e sabendo que as mesmas encontravam-se em fase de maturação sexual durante o período de tratamento (6 semanas), levantou-se a hipótese de uma interferência hormonal (devido a variações estrais das fêmeas) associado com o tratamento do extrato. Para testar esta hipótese foi realizada a castração de um grupo de fêmeas e posteriormente foi realizada a administração de BiMeOH (5000 mg/kg) e observadas durante 14 dias. Na **Figura 10** esta representada a evolução do peso corporal das fêmeas castradas e não castradas que receberam BiMeOH ou veículo (salina).

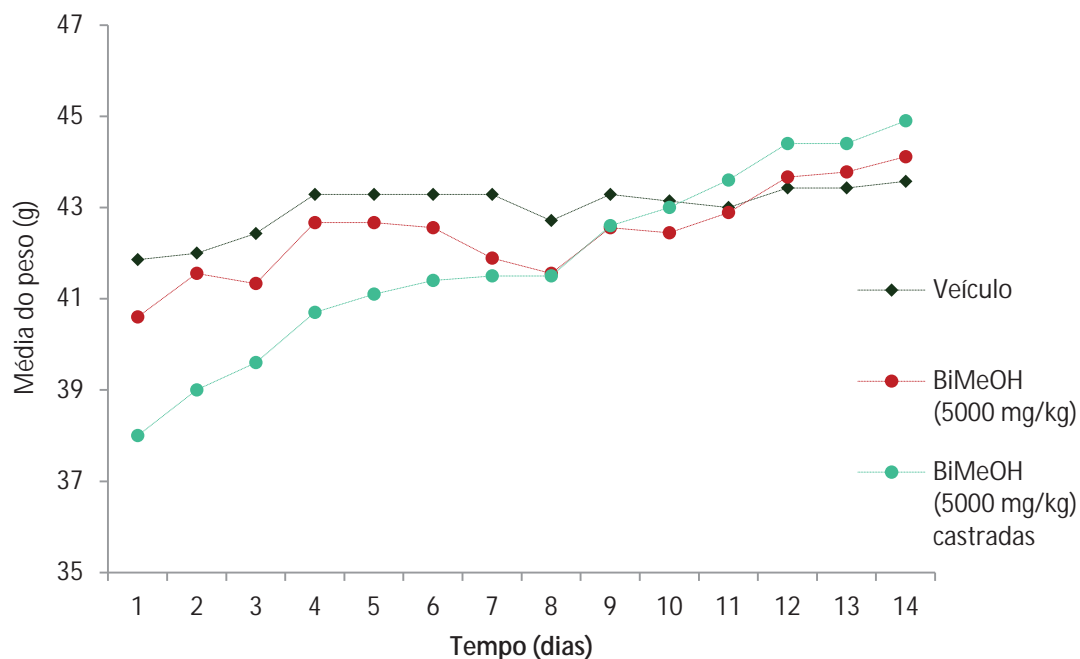


Figura 10. Evolução do peso corpóreo (g) de fêmeas castradas e não-castradas e submetidas ao tratamento com o extrato metanólico de *B. intermedia* (5000 mg/kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação.

Novamente foram registrados mortes nos grupo tratados com BiMeOH, tanto de fêmeas castrados como de não castrados (**Tabela 5**). A partir da avaliação do peso dos órgãos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, foi possível

observar que houve significativo aumento de peso do baço e do pulmão dos animais fêmeas submetidas à prévia castração. Não foi observada diferença estatística com relação aos órgãos reprodutores dos animais do grupo controle (salina) e BiMeOH (**Tabela 6**).

Tabela 5 - Efeito do tratamento agudo com o extrato metanólico de *B. intermedia* (5.000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos (g).

Tratamentos	N	Morte	Coração	Baço	Pulmão	Fígado	Rins
Salina	7	0	3,60 ± 0,1	3,34 ± 0,2	4,09 ± 0,1	11,92 ± 0,2	5,67 ± 0,1
BiMeOH	10	1	3,72 ± 0,1	3,56 ± 0,1	4,45 ± 0,1	12,00 ± 0,1	5,74 ± 0,1
Castração + BiMeOH	11	1	3,51 ± 0,1	4,02 ± 0,2*	4,51 ± 0,1*	12,20 ± 0,2	5,70 ± 0,1

ANOVA: $F_{(2,23)} = 1,37$ para peso do Coração, $F_{(2,23)} = 3,96$ para peso do Baço, $F_{(2,23)} = 3,74$ para peso do Pulmão, $F_{(2,23)} = 0,52$ para peso do Fígado e $F_{(2,23)} = 0,11$ para peso dos Rins. Os números representam média ± e.p.m. Teste de Dunnett.

Tabela 6 - Efeito do tratamento agudo com o extrato metanólico de *B. intermedia* (5.000 mg/kg) sobre os órgãos reprodutores de camundongos (g).

Tratamentos	Útero	Ovários [#]
Salina	2,71 ± 0,2	9,77 ± 0,6
BiMeOH	2,89 ± 0,3	8,96 ± 4,1

ANOVA: $F_{(1,19)} = 0,43$ para peso do Útero, $F_{(1,19)} = 1,79$ para peso do Ovários para peso do Ovários. Os números representam média ± e.p.m. # Os valores reais foram multiplicados por 100 para que fosse viável a realização da conversão dos dados em arco seno e posterior análise estatística. Teste de Dunnett.

4.2.2.Toxicidade Subaguda

A partir do tratamento subagudo (14 dias consecutivos) com BiMeOH (500 mg/kg), AcoEt ou AcoAq (100 mg/kg) a avaliação de parâmetros como evolução do peso corporal, mortalidade, peso dos órgãos vitais e parâmetros bioquímicos do sangue foram determinados. Na **Figura 11** são apresentadas as evoluções dos pesos corporais dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos diários durante os 14 dias. Não foram observadas variações no peso dos animais tratados com BiMeOH, AcoEt ou AcoAq, assim como não ocorreram alterações nos pesos dos órgãos (**tabela 7**).

Na **Tabela 8** estão representados os resultados das análises bioquímicas realizadas a partir do soro dos animais, tratados com BiMeOH que foram capazes de reduzir, de modo significativo, os níveis de Gama-GT, AST e ALT ($p < 0.05$) Já animais tratados com AcoEt apresentaram reduções para Gama-GT e tanto animais tratados com AcoEt quanto aqueles tratados com AcoAq diminuíram significativamente os níveis de ALT ao final de 14 dias de tratamento consecutivo.

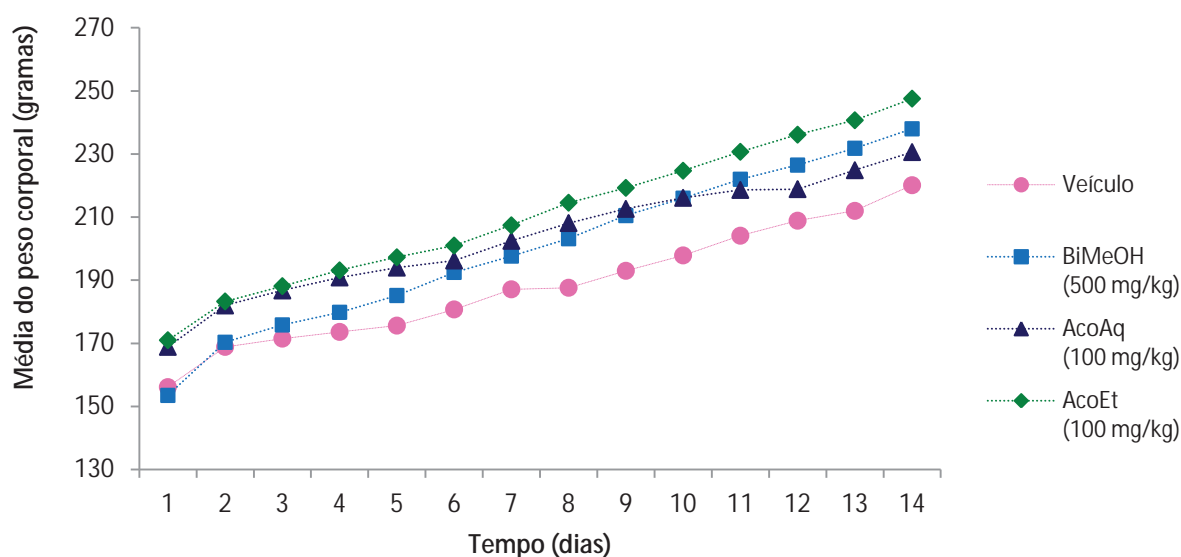


Figura 11. Evolução do peso corpóreo (média) dos ratos submetidos ao tratamento com o extrato metanólico BiMeOH e as partições Acetato de Etila Porções Acetato (AcoEt) e Aquosa (AcoAq) de

B. intermedia durante 14 dias consecutivos. Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação.

Tabela 7. Efeito do tratamento subagudo com extrato metanólico (BiMeOH) e as partições Acetato de Etila Porção Acetato (AcoEt) a Aquosa (AcoAq) de *B. intermedia* sobre os órgãos vitais dos ratos.

Tratamentos	N	Mort	Coração	Baço	Pulmão	Fígado	Rins
Salina	8	0	3,89±0,1	3,14 ± 0,1	4,89 ± 0,2	10,26 ± 0,1	5,08 ± 0,0
BiMeOH (500 mg/kg)	6	2	3,79 ± 0,1	3,28 ± 0,1	4,53 ± 0,1	11,10 ± 0,8	5,20 ± 0,1
AcoEt (100 mg/kg)	7	1	3,84 ± 0,1	3,07 ± 0,1	4,69 ± 0,3	10,20 ± 0,1	5,08 ± 0,1
AcoAq (100 mg/kg)	8	0	3,78± 0,1	3,30 ± 0,1	5,08 ± 0,2	10,28 ± 0,1	5,17 ± 0,1

ANOVA: $F_{(4,31)} = 0,25$ para peso do Coração, $F_{(4,31)} = 1,04$ para peso do Baço, $F_{(4,31)} = 0,86$ para peso do Pulmão, $F_{(4,31)} = 1,07$ para peso do Fígado e $F_{(4,31)} = 0,76$ para peso dos Rins. Os números representam média ± e.p.m. $p > 0,05$. Teste de Dunnett.

Tabela 8. Quantificação bioquímica do soro dos ratos tratados com extrato metanólico (BiMeOH) e as partições Acetato de Etila Porção Acetato (AcoEt) a Aquosa (AcoAq) de *B. intermedia*.

Tratamentos	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Gama-GT (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Glicose (U/L)
Salina	44,63 ± 1,0	0,45 ± 0,1	7,10 ± 1,3	36,65 ± 2,7	251,13 ± 6,1	43,9 ± 1,7
BiMeOH (500 mg/kg)	43,15 ± 1,6	0,44 ± 0,0	2,99 ± 0,7**	18,33 ± 1,1**	162,7 ± 43,9**	44,63 ± 2,5
AcoEt (100 mg/kg)	39,25 ± 1,8	0,40 ± 0,0	2,20 ± 0,2**	25,43 ± 1,6**	190,57 ± 9,7	42,7 ± 3,0
AcoAq (100 mg/kg)	40,41 ± 2,2	0,44 ± 0,1	2,14 ± 0,3 **	30,25 ± 2,1	195,5 ± 20,3	45,6 ± 2,7

ANOVA $F_{(4,31)} = 1,92$ para Uréia; $F_{(4,31)} = 2,07$ para Creatinina; $F_{(4,29)} = 11,06$ para Gama-GT; $F_{(4,30)} = 11,62$ para ALT; $F_{(4,31)} = 6,30$ para AST; $F_{(4,31)} = 0,51$ para Glicose. Teste de Dunnett ** $p < 0,01$

4.2.3. Discussão

No teste de toxicidade, em camundongos machos e fêmeas, os resultados mostram que o tratamento agudo com BiMeOH não apresentou sinais de toxicidade nos camundongos machos. No entanto, em fêmeas, a taxa de mortalidade (30%) indicou indícios de toxicidade importante. Ao se analisar os dados inicialmente obtidos, verificou-se que a administração da dose de 5000 mg/kg de BiMeOH assim como o período de observação dessas fêmeas coincidiram com o início da maturação sexual, que acontece por volta de 42 dias de idade (Chorilli *et al.*, 2007). Nessa fase do desenvolvimento destes animais os níveis plasmáticos dos hormônios sexuais são instáveis, portanto levantou-se a hipótese de que os mesmos poderiam interferir com a ação do extrato. Ao proceder a ovariectomia das fêmeas adultas e submetê-las novamente ao procedimento experimental com o BiMeOH, observou-se que houve diferenças significativas no peso de baço e do pulmão destas fêmeas castradas. O baço é o principal responsável pela fagocitose e pela depuração de partículas, bactérias, vírus, fungos e parasitas da corrente sanguínea (Traub, Giebink *et al.*, 1987; Marques, Petronianu *et al.*, 2002). O aumento do peso do baço pode estar correlacionado à existência de leucócitos em diversos estados de maturação. Tem-se pesquisado uma outra função do baço, que seria sua participação na regulação do metabolismo lipídico (Fatouros, Bourantas *et al.*, 1995; Jamel, Refinetti, *et al.*, 2002). Assim, outra hipótese para esta alteração do baço seria que o extrato poderia alterar o perfil lipídico destes animais.

Os pulmões são locais de captação, acúmulo e metabolismo de numerosas substâncias químicas (endógenas e exógenas) e sítios frequentes de reações adversas às drogas (Boyd, 1980; Bend, Serabjit-Singh *et al.*, 1985). As ações sobre

os sistemas oxidante-antioxidante, imunológico, proteolítico e de reparo da matriz têm sido revisadas, embora a patogenia exata da maioria dessas reações seja desconhecida. Entre as síndromes clínicas de apresentação de reação adversa a drogas estão: edema, hipertensão e hemorragia pulmonar, doença intersticial crônica, infiltrado pulmonar agudo, síndrome da angústia respiratória do adulto, bronquiolite obstrutiva, derrame pleural e bronco espasmo (Kay, 1996). Uma congestão vênulo-capilar pode estar associado ao aumento do peso do pulmão (Vasconcelos, Modesto-Filho, *et al.*, 2007) ou ainda, um processo inflamatório, causando erosão de mucosa bronquiolar, associado à exsudação linfocitária e neutrocitária, pode ser o responsável por essa alteração (Mariz; Araújo; *et al.*, 2008). Neste trabalho, somente o grupo de camundongos fêmeas que foram ovariectomizadas apresentaram aumento significativo do peso do pulmão e baço. Portanto, novos estudos histopatológicos serão necessários para caracterizar este efeito do extrato. Entretanto, fêmeas adultas não ovariectomizadas tratadas com BiMeOH não apresentaram alterações nos pesos dos órgãos. Todavia, ocorreram novamente mortes nos dois grupos experimentais de fêmeas (BiMeOH castradas e não castradas) e não de machos.

Estudos fitoquímicos de *B. intermedia* apontam para a presença de quercetinas, flavonóides e taninos, entre outros compostos. Em publicação recente (Sannomiya, Cardoso *et al.*, 2007) verifica-se atividade mutagênica *in vitro* por parte do extrato metanólico de *B. intermedia*. Porém a mesma ação não se repetiu em ensaios *in vivo*. Os nossos dados obtidos, então, corroboram com esses achados indicando cautela de uso desta espécie, no entanto, não explica a razão dessa toxicidade estar presente apenas em camundongos fêmeas.

Outro resultado importante neste trabalho foi a caracterização dos possíveis efeitos tóxicos da administração em doses repetitivas das partições e do extrato. As

doses que foram selecionadas para a administração do extrato e partições se basearam na menor dose efetiva para a ação farmacológica estudada. Não foram registrados alteração do peso corporal, alterações dos pesos dos órgãos vitais, tanto pela administração de AcoEt, como de AcoAq nos 14 dias de tratamento diário. O acompanhamento do peso corpóreo do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (Jahn e Gunzel, 1997).

Embora tenha ocorrido mortes nos grupos tratados com BiMeOH e AcoEt, a análise realizada a partir do sangue dos animais submetidos aos diferentes tratamentos demonstraram que a administração do extrato foi capaz de reduzir os níveis de Gama-GT), ALT e AST. Os animais tratados com AcoEt durante 14 dias só não alteraram os níveis de AST. Essas transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominantemente AST, no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A atividade plasmática desta enzima é controlada por um mecanismo de liberação enzimática localizada na membrana do hepatócito. Essas enzimas são consideradas indicadores sensíveis de perturbações hepatobiliares e elevações nas atividades sérico-enzimáticas se devem a alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, indução de enzimas microssomais ou lesões estruturais associadas à necrose, colestase ou isquemia hepatocelular. A atividade da Gama-GT pode ser elevada em casos de hiperplasia no ducto biliar em ratos (Leonard, Neptun *et al.*, 1984). Diversos processos patológicos no fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, devido à variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático (Sharon e Center, 1995). A diminuição no nível dessas enzimas por parte dos animais tratados com BiMeOH indica uma hepatoproteção por parte do extrato.

Estes resultados parecem contraditórios se comparados aos obtidos na avaliação de toxicidade aguda. No entanto, sabe-se que um dos compostos em maior concentração em *B. intermedia* são os taninos condensados. Efeitos tóxicos do ácido tânico e compostos relacionados já foram relatados no plasma humano, no entanto, taninos em altas concentrações usualmente, inibem atividade enzimática, mas, em baixas concentrações, muitas vezes estimulam atividade enzimática (Al-Shafi, 2002). De acordo com Loomis e Hayes (1996), a toxicidade é relativa e deve ser descrita como uma relação dose-efeito entre compostos, ou seja, qualquer substância pode ser tóxica se a dose ou a exposição se tornar suficientemente altas (Sipes e Dart, 1997; Diniz, 2000).

O conjunto desses resultados com a análise dos órgãos vitais desses animais tratados com BiMeOH e partições, sugerem que o uso de *B. intermedia*, principalmente em fêmeas, requer atenção e cautela em sua utilização.

4.3. Atividade gastroprotetora

4.3.1. Indução de lesão gástrica por DAINE (indometacina)

Neste modelo experimental, verificou-se que AcoAq foi capaz de inibir a formação de lesões gástricas induzidas por indometacina diminuindo em 56.6% a formação de lesões gástricas, quando comparado ao grupo tratado com veículo (**figura 12**). A partição AcoEt não foi capaz de apresentar atividade gastroprotetora frente a este agente lesivo. Ao proceder com a quantificação de glutathione total do tecido gástrico, não se verificou alterações nas concentrações em nenhum dos tratamentos quando comparado ao grupo tratado com o veículo. No entanto, a prévia administração de AcoAq foi capaz de manter os níveis de MPO próximos ao grupo Branco, que não foram submetidos a nenhum agente lesivo. Resultados anteriores (Santos, Kushima *et al.*, 2012) demonstraram que BiMeOH foi capaz exercer ação protetora sobre a mucosa gástrica mesmo na presença da indometacina. Estes resultados em conjunto indicam portanto que compostos presentes no extrato BiMeOH foram mantidos durante o particionamento para AcoAq e que mantiveram as propriedades gastroprotetoras contra a DAINEs.

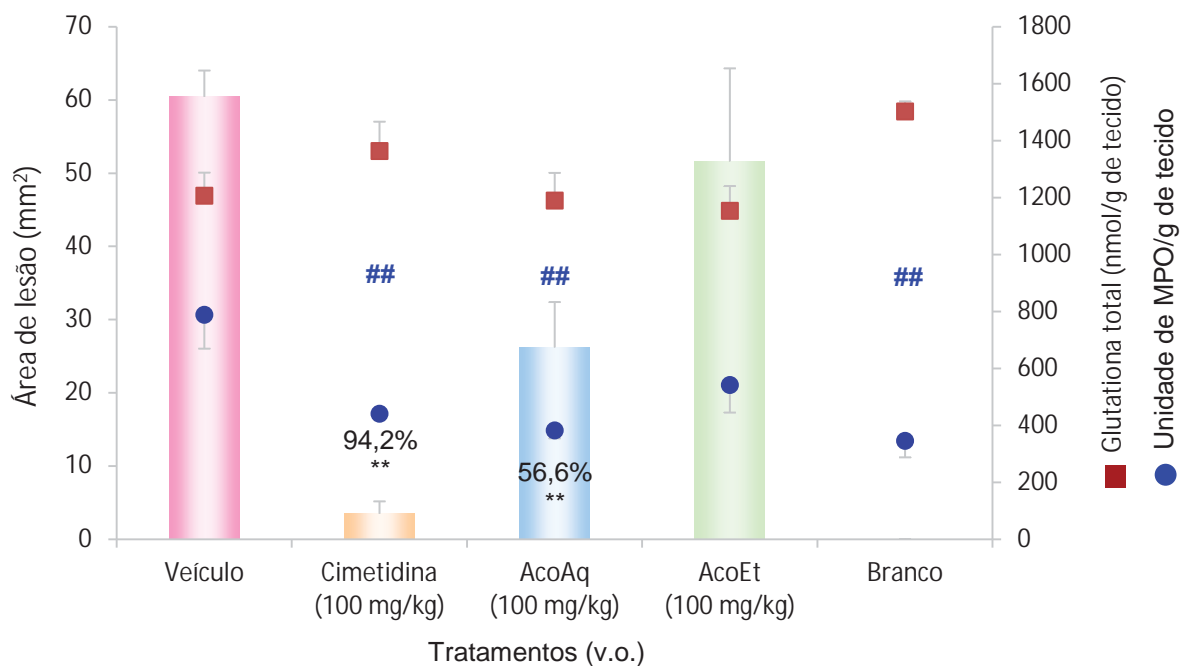


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com as porções Acetato (AcoEt) e Aquosa (AcoAq) de *B. intermedia* no modelo de indução gástrica por indometacina em ratos. As barras representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao veículo. ANOVA $F_{(3,24)}=11,51$ para área de lesão ** $p<0.01$ em relação ao veículo; ANOVA $F_{(4,28)}=2,25$ para glutaciona total; ANOVA $F_{(4,28)}=4,55$ para MPO ### $p<0.01$ em reação ao veículo. Teste de Dunnett.

4.3.2. Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção

A administração prévia de NEM (bloqueador da formação dos grupos sulfidrílicos) e posterior tratamento oral com o veículo salina, carbenoxolona ou BiMeOH provocaram aumento expressivo das lesões gástricas induzidas por etanol em todos os grupos experimentais. Quando se compara os pré-tratados com NEM com aqueles tratados com salina (**figura 13**) verifica-se diferença entre os grupos. Observou-se ainda uma significativa proteção gástrica nos animais tratados com BiMeOH com redução de 97.9% das lesões gástricas no pré-tratamento com salina. Ao se avaliar os animais pré-tratados com salina e BiMeOH em comparação aos animais pré-tratados com NEM e extrato, é possível constatar que houve um

aumento significativo na formação de lesões gástricas quando o bloqueador da formação dos grupamentos sulfidrílicos foi administrado. Estes resultados indicam que o efeito gastroprotetor de BiMeOH tem intensa participação dos grupamentos sulfidrílicos ao fortalecem a barreira mucosa gástrica destes animais.

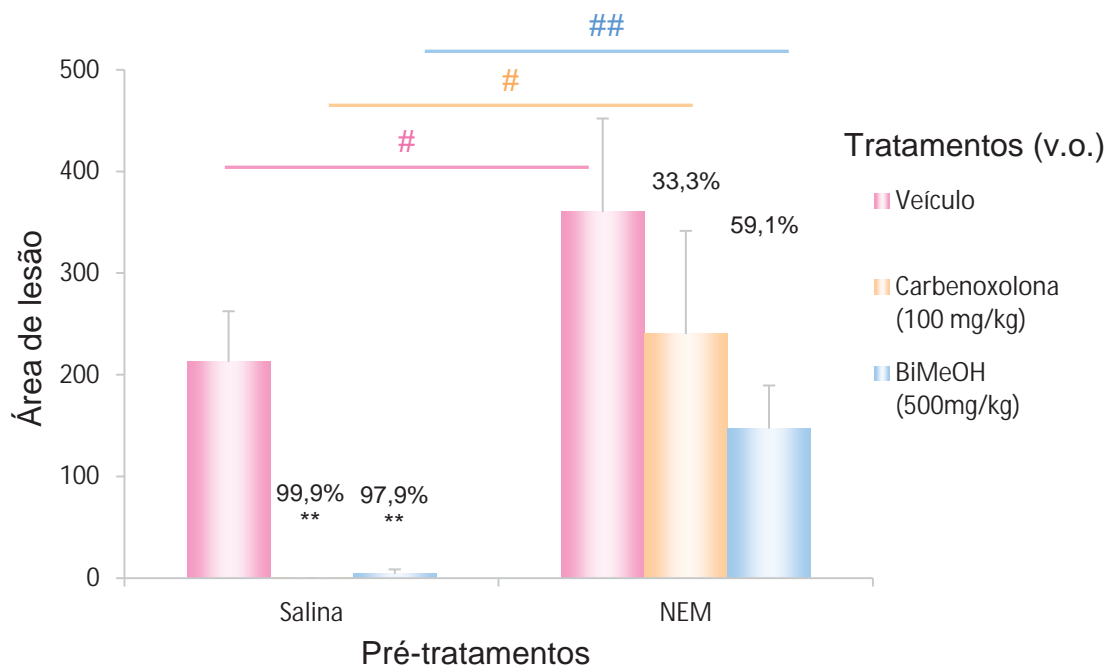


Figura 13. Efeito do extrato metanólico de *B. intermedia* (BiMeOH) frente ao inibidor dos grupamentos sulfídrico endógeno (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto em ratos; ANOVA $F_{(2,17)}=21,09$ para Salina $**p<0.01$ e $F_{(2,17)}= 1,84$ para NEM $p>0.05$; Teste de Dunnet. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controles (veículo+salina ou NEM+salina). As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e as diferenças significantes ($\#p<0.05$, $\#\#\#p<0.01$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e NEM+tratamento). Os números em porcentagem indicam a proteção e relação ao grupo veículo ou veículo + NEM, respectivamente.

Neste mesmo modelo experimental (**figura 14**), pode-se observar que a prévia administração do bloqueador de grupamentos sulfidrílicos diminuiu os níveis de glutathiona total do tecido. Os níveis de glutathiona no grupo tratado com BiMeOH foi semelhante aos dos animais do grupo Branco e se apresentou aumentado nos animais tratados com extrato quando comparados aos tratados com veículo.

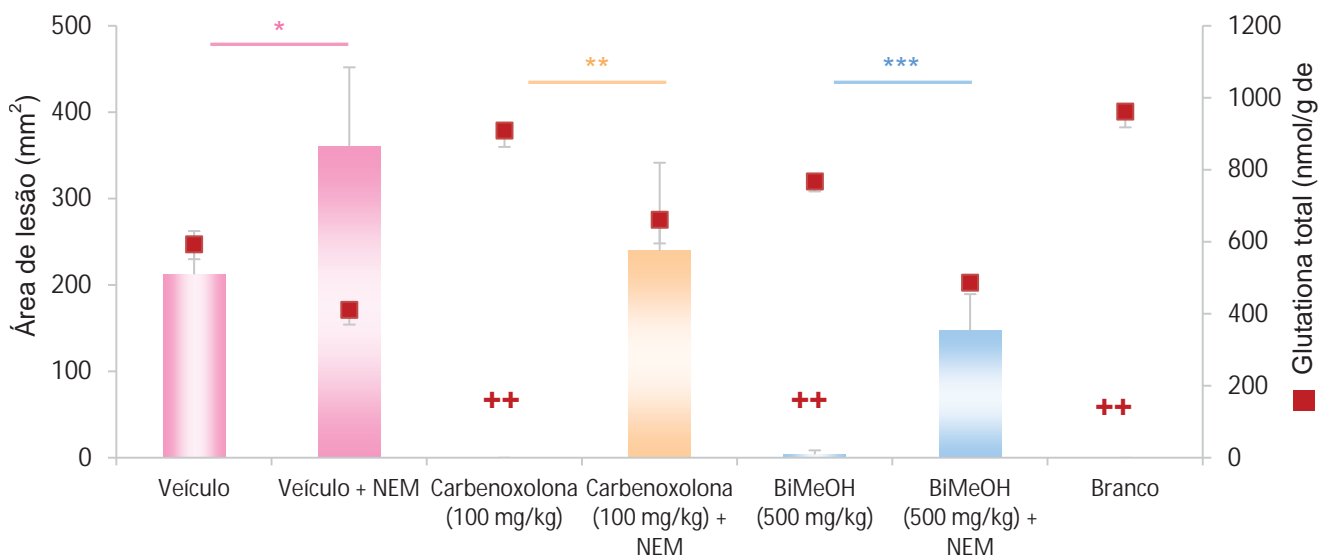


Figura 14. Efeito do extrato metanólico de *B. intermedia* (BiMeOH) nos níveis de glutatona total frente ao inibidor dos grupamentos sulfídrico endógeno (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto em ratos. ANOVA, $F_{(6,40)}=22,19$. As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo); * $p<0.05$; ** $p<0.01$. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e NEM+tratamento); * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Teste de Dunnett.

Ao avaliar o efeito da inibição dos grupamentos sulfidrilicos sobre as ações das partições AcoAq e AcoEt, verificou-se a reversão da inibição das lesões em ambas as partições. A análise da área das lesões (**figura 15**) demonstrou que a inibição dos grupamentos sulfidrilicos resultou em redução da gastroproteção de modo mais pronunciado nos animais tratados com AcoAq (81.4% para 10.3%) do que AcoEt (84% para 35.2%). Os resultados demonstram que ambas as partições são dependentes do grupamento sulfidrico, assim como BiMeOH.

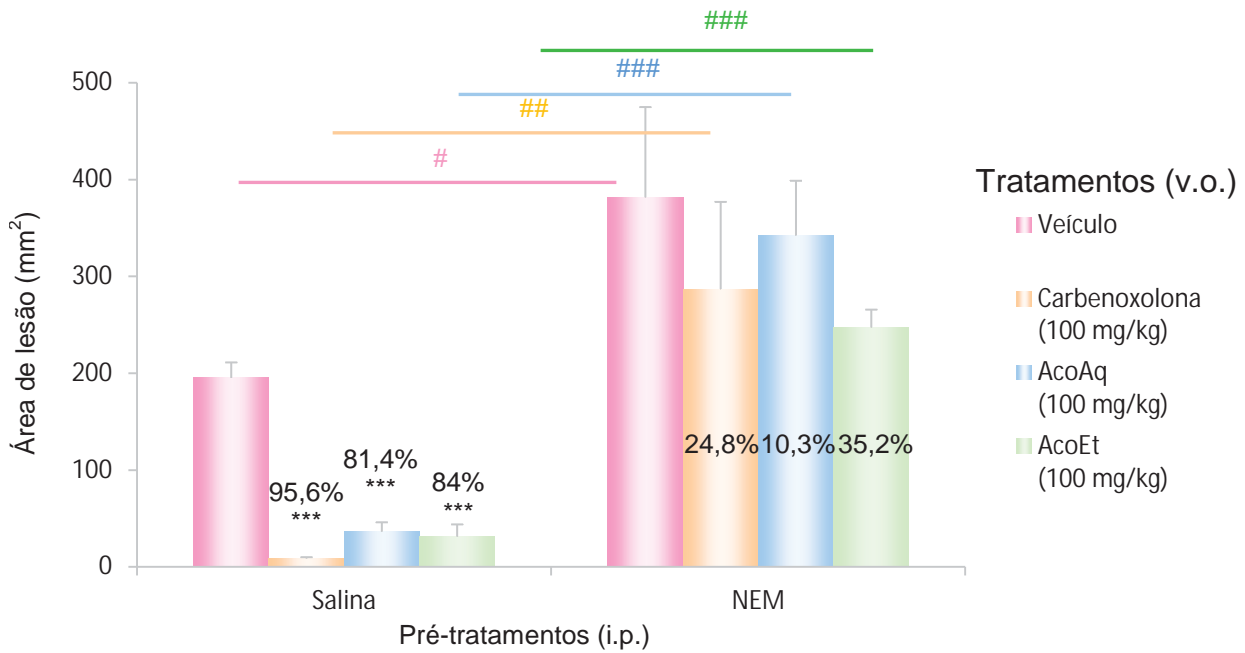


Figura 15. Efeito das partições AcoAq e AcoEt de *B. intermedia* frente ao inibidor dos grupamentos sulfídricos endógeno (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto em ratos. ANOVA $F_{(3,24)}=14,59$ para Salina $***p<0.001$ e $F_{(3,22)}= 0,21$ para NEM $p>0.05$; Teste de Dunnett. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controles (Salina+ Veículo ou NEM+Veículo). As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e as diferenças significantes (## $p<0.01$, ### $p<0.001$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e NEM+tratamento). Os números em porcentagem indicam a proteção e relação ao grupo veículo ou veículo + NEM , respectivamente.

Ao quantificar os níveis de glutatona total no tecido gástrico desses animais (**figura 16**), verificou-se que houve uma diminuição, de modo significativo nos níveis de glutatona para AcoEt e AcoAq pré-tratados com salina ou pré-tratados com NEM ($p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente).

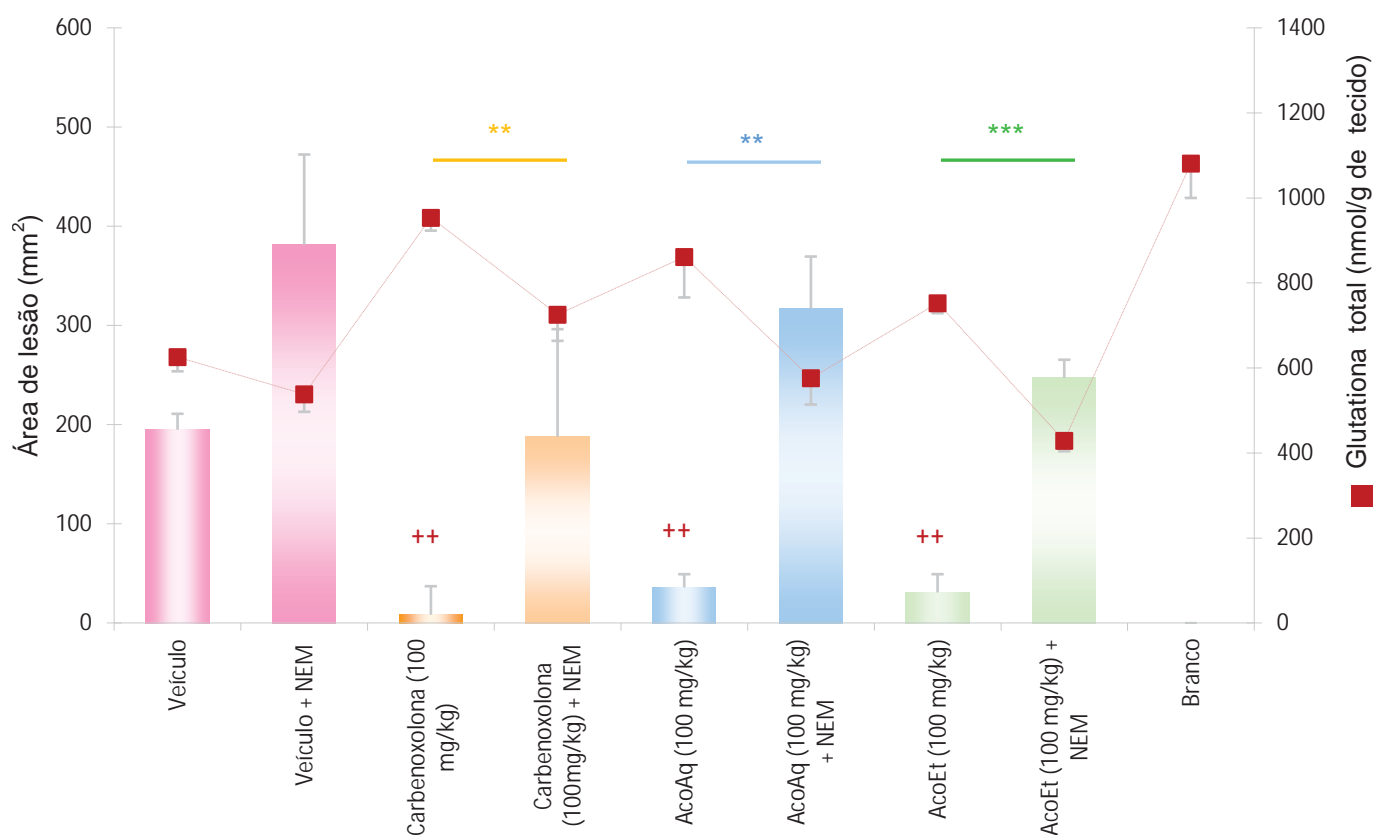


Figura 16. Efeito das partições AcoAq e AcoEt de *B. intermedia* (BiMeOH) nos níveis de glutatona total frente ao inibidor dos grupamentos sulfidrilicos endógenos (NEM) em modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto em ratos ANOVA, $F_{(8,53)}=14,42$. As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e NEM+tratamento); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Teste de Dunnet.

4.3.3. Envolvimento do NO na gastroproteção

A droga L-NAME (70 mg/kg - inibidora da NO-sintase) foi capaz de aumentar significativamente a área de lesão gástrica nos animais dos grupos controle positivo e negativo em relação aos mesmos grupos pré-tratados com salina. Este resultado indica a importância do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção dos animais submetidos à administração do etanol. Neste modelo, foi possível verificar que a gastroproteção exibida por BiMeOH foi mantida, mesmo após a administração do L-NAME (figura 17), no qual os animais pré-tratados com salina e tratados com BiOH apresentou 98,2% de inibição da formação das lesões quando comparado com o grupo pré-tratado com L-NAME e tratado com o extrato

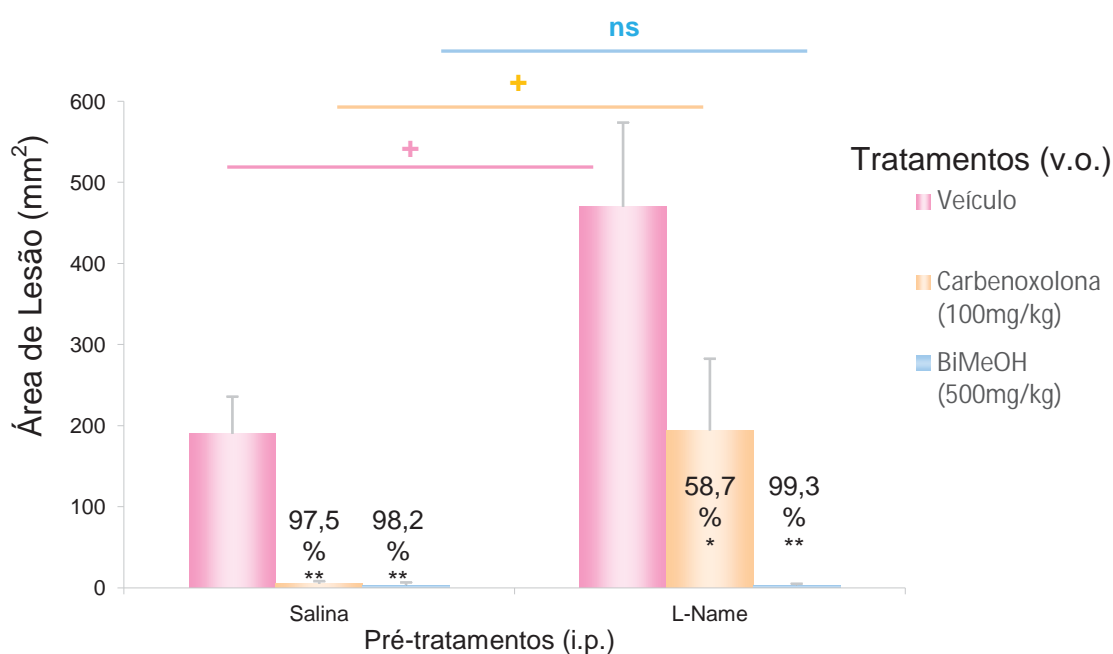


Figura 17. Efeito do extrato metanólico de *B. intermedia* ao inibidor de NO (L-NAME) em modelo de úlcera gástrica induzida por Etanol absoluto em ratos.

Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo ou veículo + L-NAME, respectivamente. $F_{(2,18)} = 16,08$ para Salina $p < 0,01$. ANOVA $F_{(2,19)} = 11,80$ para L-NAME $p < 0,05$ e $^{##} p < 0,01$. Teste de Dunnett. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+veículo ou L-NAME + veículo). As barras transversais representam os valores de média e e.p.m. e as diferenças significantes ($+p < 0,05$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina+tratamento e L-NAME +tratamento); ns: diferença não significativa.

(99.3% de inibição).

Ao proceder com a quantificação de glutathiona total no tecido, observou-se (figura 18) que a administração de L-NAME foi capaz de reduzir de modo significativo os níveis de glutathiona total nos animais tratados com BiMeOH e expostos ao inibidor de Óxido Nítrico.

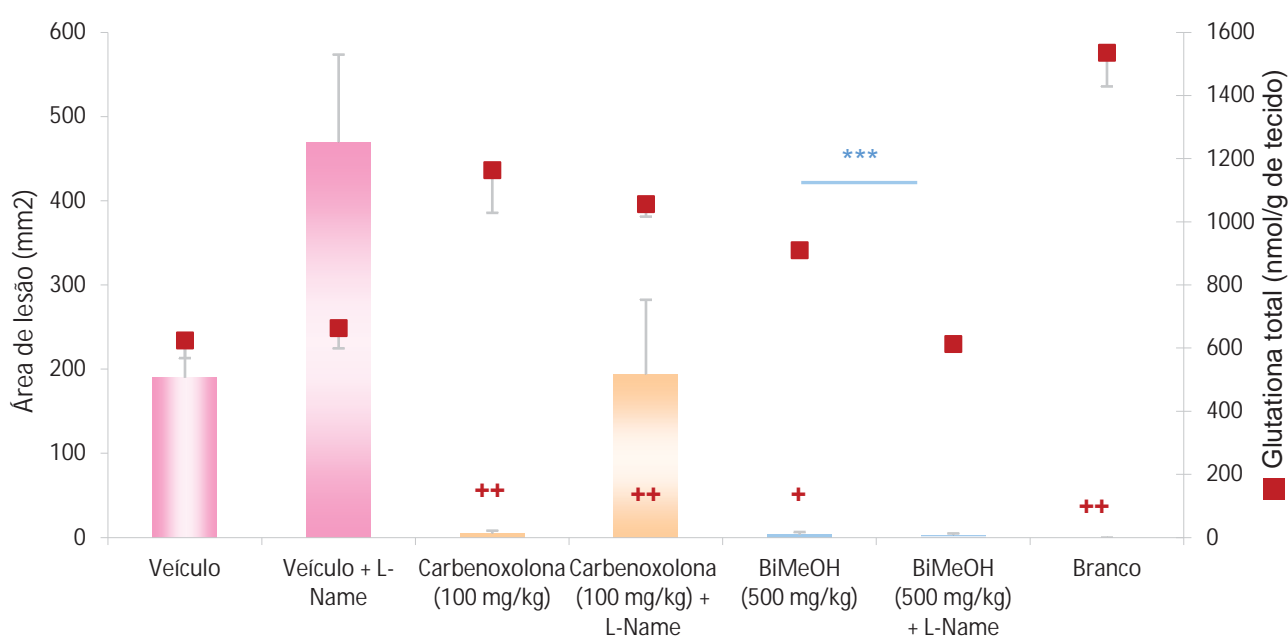


Figura 18. Efeito do extrato metanólico de *B. intermedia* (BiMeOH) nos níveis de glutathiona total frente ao inibidor de NO em modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto em ratos. ANOVA, $F_{(6,37)}=18,09$. As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo); + $p<0.05$; ++ $p<0.01$. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e L-NAME+tratamento); *** $p<0.001$. Teste de Dunnet.

A prévia administração do inibidor de NO foi capaz de diminuir a gastroproteção exercida pelas partições. Entretanto as lesões foram maiores para AcoEt que reverteu sua proteção de 89.9% para 18.9% na presença do L-Name. AcoAq apresentou diferença entre os tratamentos, no entanto, na presença do L-

NAME, AcoAq manteve uma diferença significativa ($p < 0.01$) na área de lesão quando comparado com o veículo, reduzindo em 68.9% as lesões induzidas pelo etanol (figura 19).

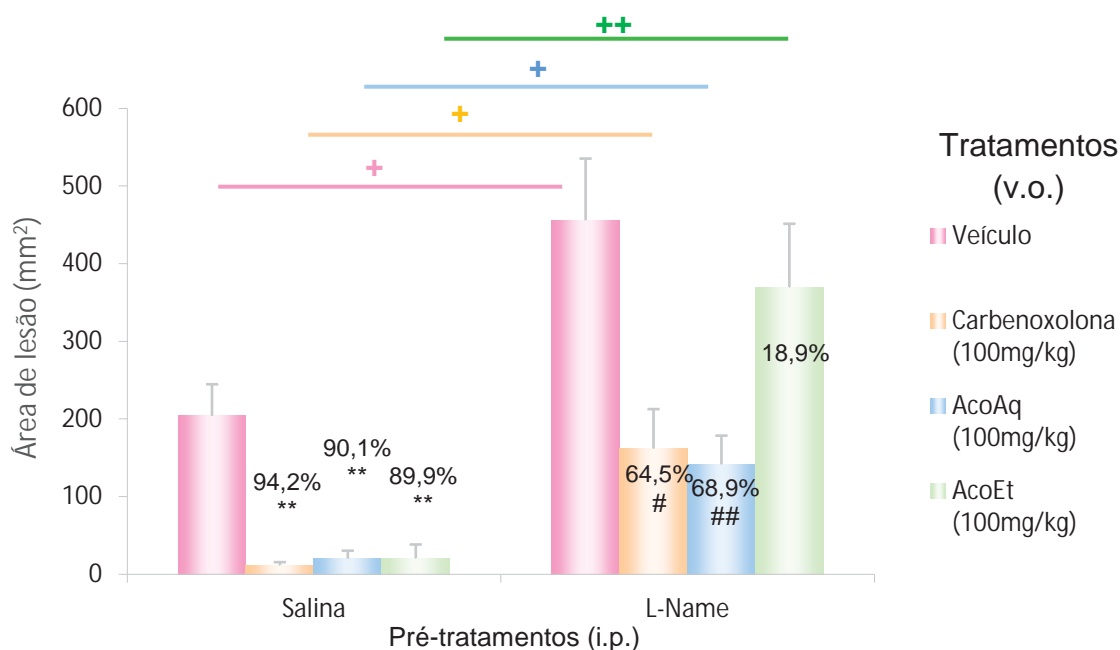


Figura 19. Efeito das partições AcoAq e AcoEt de *B. intermedia* ao inibidor de NO (L-NAME) em modelo de úlcera gástrica induzida por Etanol absoluto em ratos. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo ou veículo + L-NAME, respectivamente. $F_{(3,20)} = 16,79$ para Salina $p < 0.01$. ANOVA $F_{(3,20)} = 5,71$ para L-NAME $\#p < 0.05$ e $\#\#p < 0.01$. Teste de Dunnett. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+veículo ou L-NAME + veículo). As barras transversais representam os valores de média e e.p.m. e as diferenças significantes ($^{\dagger}p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina+tratamento e L-NAME +tratamento).

Ao quantificar a glutatona no tecido dos animais tratados com as partições AcoAq ou AcoEt verificou-se que os níveis de glutatona total apresentaram-se

inalterados para AcoAq. O mesmo não aconteceu para AcoEt que apresentou níveis reduzidos de glutathiona total na presença do inibidor de NO (**figura 20**).

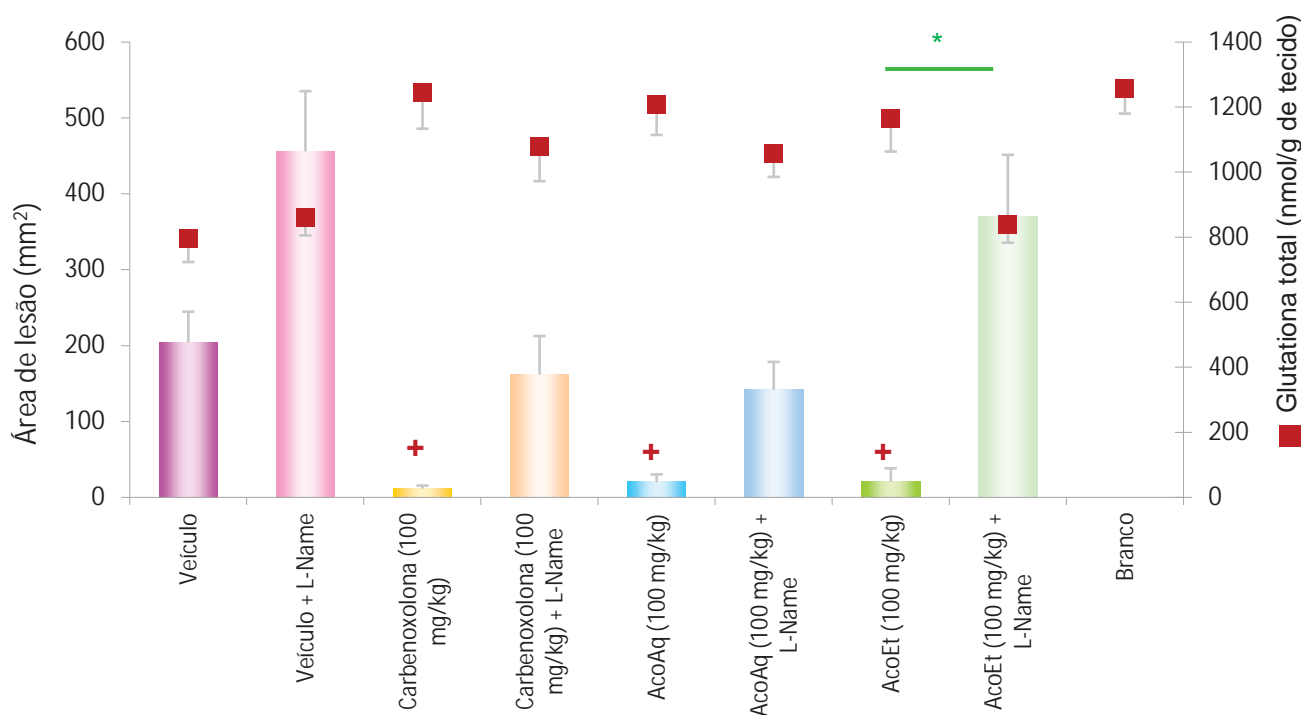


Figura 20. Efeito das partições AcoAq e AcoEt de *B. intermedia* nos níveis de glutathiona total frente ao inibidor de NO em modelo de úlcera induzida por Etanol absoluto em ratos ANOVA, $F_{(8,43)}=4,08$. As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo); + $p<0.05$; ++ $p<0.01$. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m e são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e L-NAME+tratamento); * $p<0.05$. Teste de Dunnet. ANOVA $F_{(8,43)} = 4,08$ + $p<0.05$; ++ $p<0.01$ comparado ao controle.

4.3.4. Participação dos neurônios sensíveis à capsaicina na gastroproteção

Os resultados na **Figura 21** demonstram que a prévia administração do bloqueador de receptores vanilóides, o Ruthenium Red (RR), foi capaz de reverter a gastroproteção apresentada por BiMeOH.

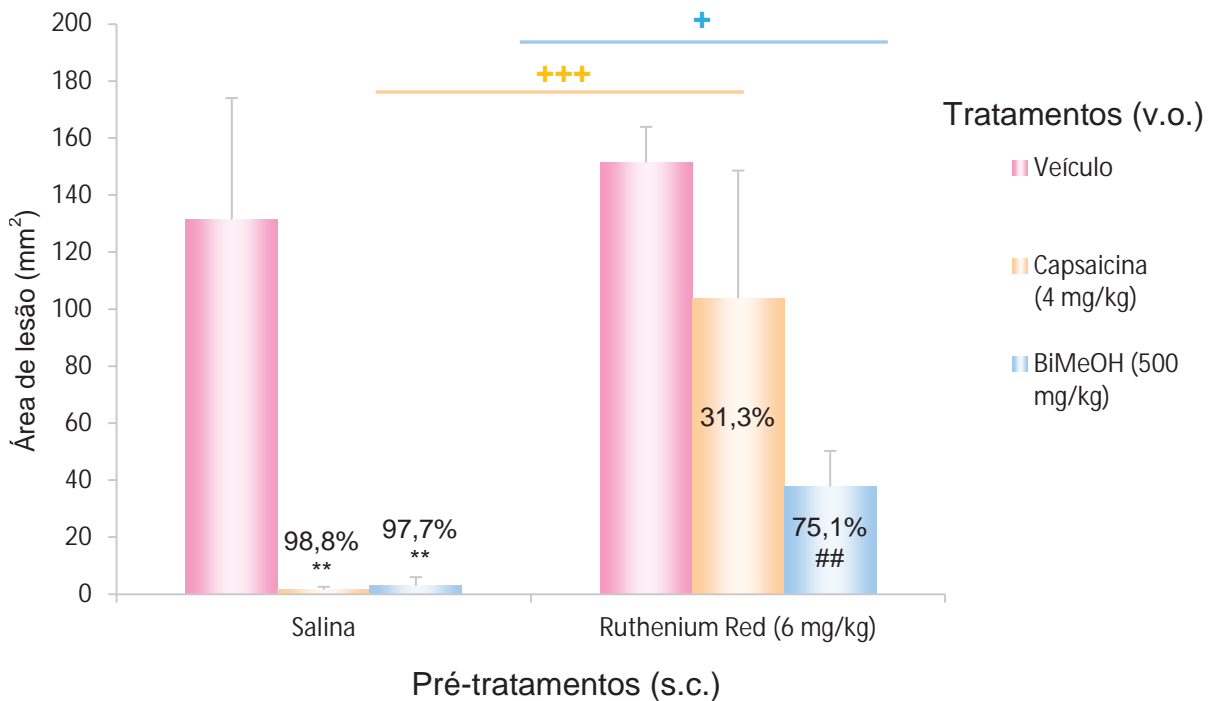


Figura 21. Efeito do tratamento oral de BiMeOH no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com Ruthenium Red. ANOVA $F_{(2,14)}=11,37$ para Salina $^{**}p<0.01$ e $F_{(2,17)}= 5,42$ para Ruthenium Red $^{##}p<0.01$ para área de lesão; Teste de Dunnet. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controles (veículo+salina ou Ruthenium Red+salina). As barras transversais representam os valores de média \pm e.p.m e as diferenças significantes ($+p<0.05$, $^{+++}p<0.001$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e Ruthenium Red + tratamento). Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo ou veículo + Ruthenium Red, respectivamente.

Ao avaliar o efeito do tratamento com AcoAq e AcoEt pode-se observar (**figura 22**) que o prévio tratamento com o bloqueador Ruthenium Red reverteu a gastroproteção apenas de AcoEt, demonstrando a participação desta via na gastroproteção exercida por esta partição, resultado semelhante ao observado para o extrato BiMeOH.

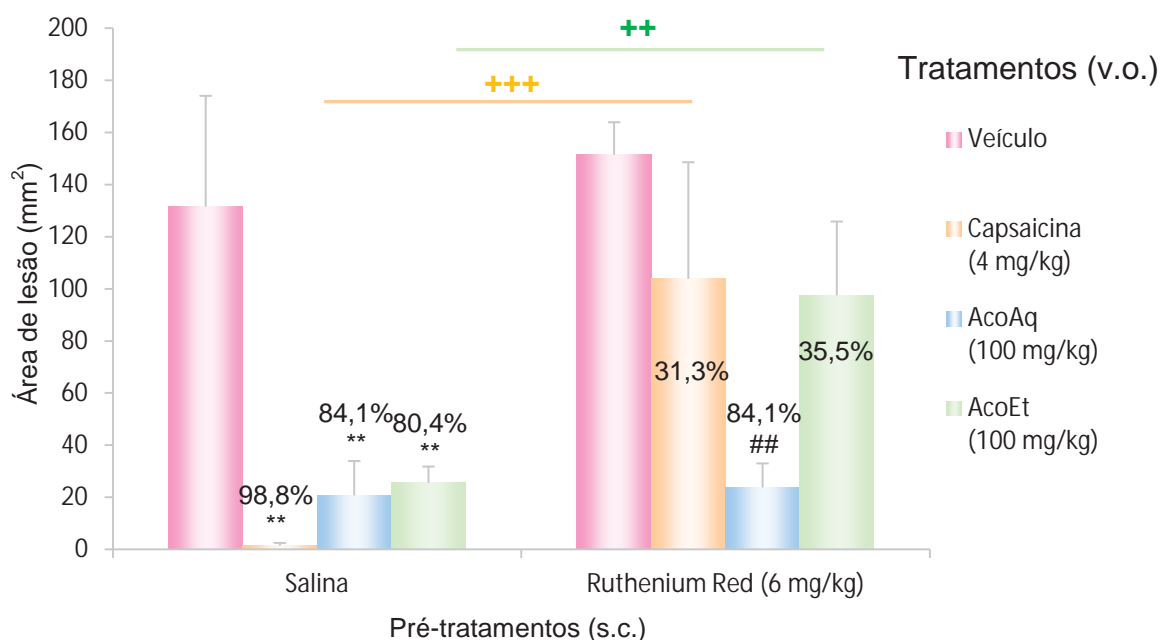


Figura 22. Efeito do tratamento oral de AcoAq e AcoEt no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com Ruthenium Red ANOVA $F_{(4,22)}=8,23$ para Salina $**p<0.01$ e $F_{(4,26)}= 5,19$ para Ruthenium Red $## p<0.01$; Teste de Dunnet. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controles (veículo+salina ou Ruthenium Red+salina). As barras transversais representam os valores de média \pm e.p.m e as diferenças significantes ($++p<0.01$, $+++p<0.001$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e Ruthenium Red + tratamento). Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo ou veículo + Ruthenium Red, respectivamente.

Verificou-se ainda (**figura 23**) que o tratamento com BiMeOH aumentou os níveis de glutathiona total, quando comparado ao controle pré-tratado com salina. Quando os animais foram expostos ao bloqueador Ruthenium Red, verificou-se que BiMeOH apresentou redução destes níveis.

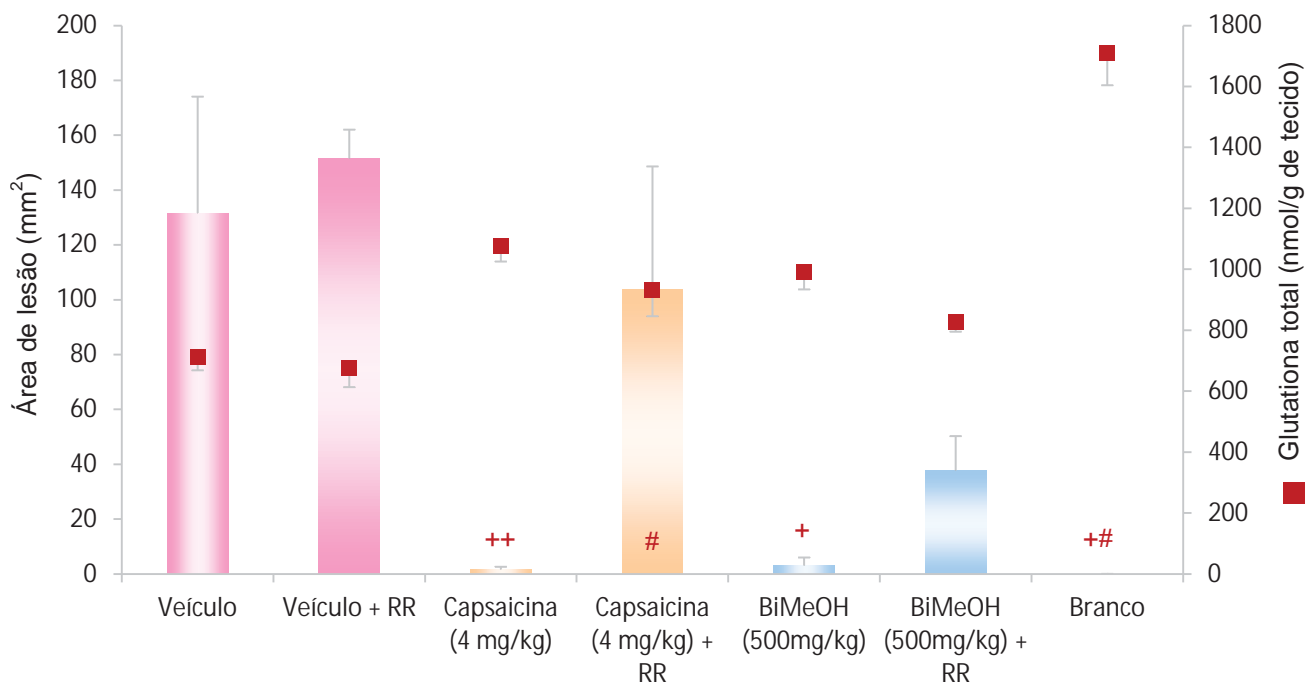


Figura 23. Efeito do tratamento com BiMeOH no modelo de indução de lesão gástrica por etanol absoluto com Ruthenium Red em ratos; ANOVA $F_{(3,19)}=38,73$ para pré-tratamento Salina, $+p<0.05$ e $++p<0.01$; $F_{(3,21)}=40,64$ para pré-tratamento com Ruthenium Red (RR), $\#p<0.05$; Teste de Dunnet. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controles (veículo+salina ou Ruthenium Red+salina). As barras transversais representam os valores de média \pm e.p.m e as diferenças significantes ($*p<0.05$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e Ruthenium Red+tratamento). $\#\# p<0.01$ para pré-tratamento com Salina ou Ruthenium Red.

Verificou-se (**figura 24**) que o tratamento com AcoAq e AcoEt aumentaram os níveis de glutaciona total, quando comparado ao controle pré-tratado com salina. Quando os animais foram expostos ao bloqueador Ruthenium Red, verificou-se que apenas AcoAq foi capaz de aumentar de forma significativa, os níveis de Glutaciona total. Os animais tratados com AcoEt e com o bloqueador dos receptores vanilóides apresentaram reduções significantes dos níveis de glutaciona, resultados estes que corroboram a avaliação macroscópica das lesões.

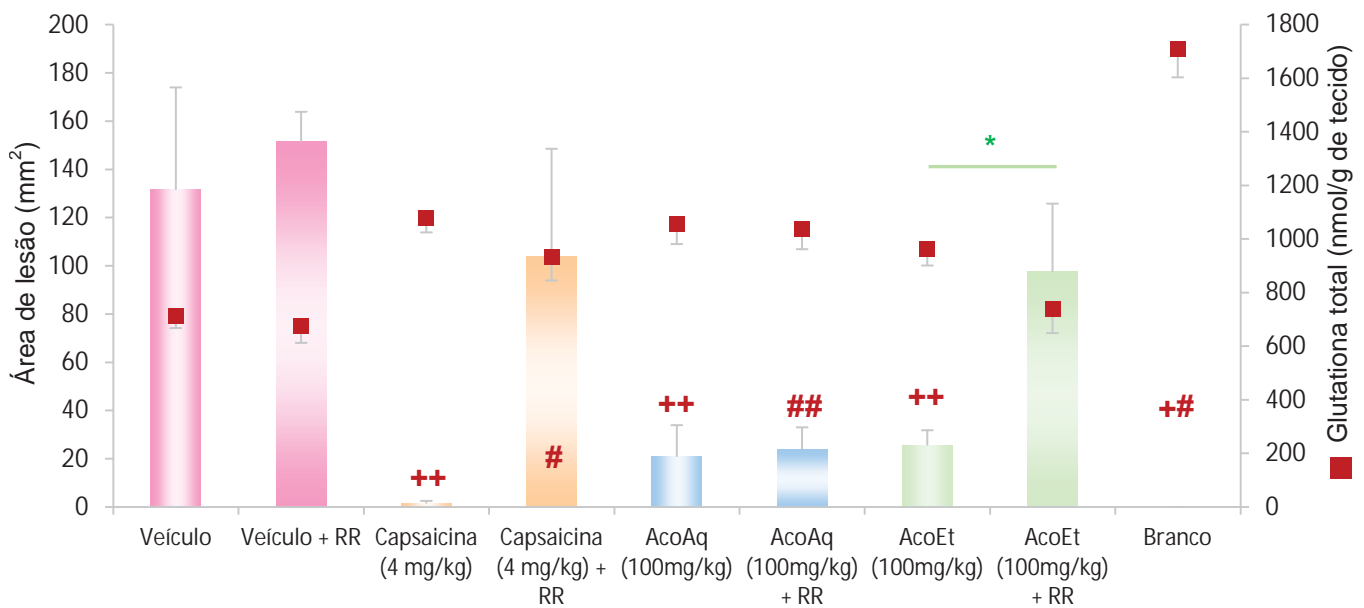


Figura 24. Efeito do tratamento com AcoAq e AcoEt no modelo de indução de lesão gástrica por etanol absoluto com Ruthenium Red em ratos; ANOVA $F_{(4,22)}=27,74$ para pré-tratamento Salina, $+p<0.05$ e $++p<0.01$; $F_{(4,23)}=23,86$ para pré-tratamento com Ruthenium Red (RR), $\#p<0.05$; $##p<0.01$; Teste de Dunnet. As diferenças observadas foram em relação aos seus respectivos grupos controles (veículo+salina ou Ruthenium Red+salina). As barras transversais representam os valores de média \pm e.p.m e as diferenças significantes ($*p<0.05$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (Salina+tratamento e Ruthenium Red+tratamento). $\#p<0.01$ para pré-tratamento com Salina ou Ruthenium Red.

4.3.5. Lesão gástrica induzida por isquemia-reperfusão

Na **figura 25** estão demonstrados os resultados do efeito gastroprotetor exercido pelos tratamentos com BiMeOH após indução de lesão por isquemia-reperfusão. Neste modelo, pode-se verificar que o extrato foi efetivo ao inibir a formação da lesão em 87.7%. Esta inibição da lesão foi acompanhada por redução nos níveis de MPO sem alteração dos níveis de glutathiona total no tecido.

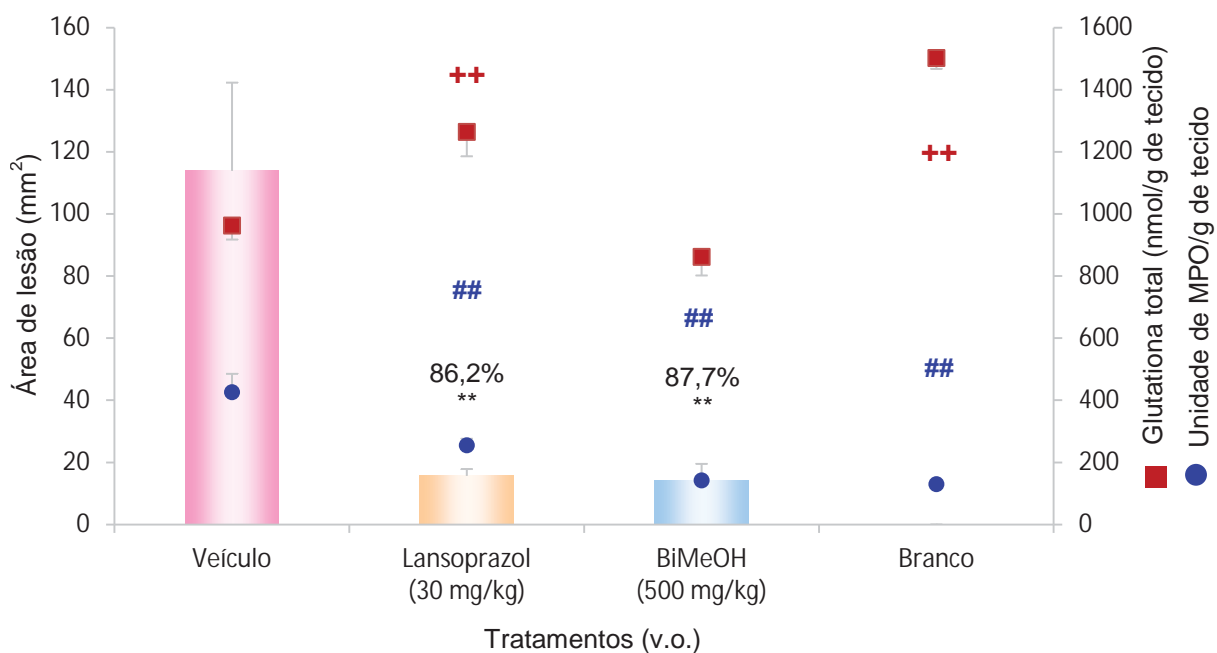


Figura 25. Atividade gastroprotetora de biMeOH no modelo de indução de lesão gástrica por Isquemia/Reperfusão em ratos; As barras representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao veículo. ANOVA $F_{(2,24)}=11.70$; $**p<0.01$ para Área de lesão, Teste de Dunnet. ANOVA $F_{(3,27)}=13.65$; $##p<0.01$ para MPO, Teste de Dunnet. ANOVA $F_{(3,27)}=18.41$; $++p<0.01$ para Glutaciona total, Teste de Dunnet.

Na **figura 26** esta demonstrado o resultado do efeito gastroprotetor exercido pelos tratamentos com AcoAq e AcoEt após indução de lesão por isquemia-reperfusão. Verifica-se que ambos os tratamentos foram significativamente efetivos, ao inibirem a formação da lesão 76.3% para AcoAq e 81.5% para AcoEt. A redução na lesão foi acompanhada por aumento do nível de glutaciona total para AcoEt além de redução dos níveis de MPO no tecido gástrico. Já AcoAq reduziu os níveis de MPO sem alterar os níveis de glutaciona total no tecido, mesmo resultado encontrado para BiMeOH.

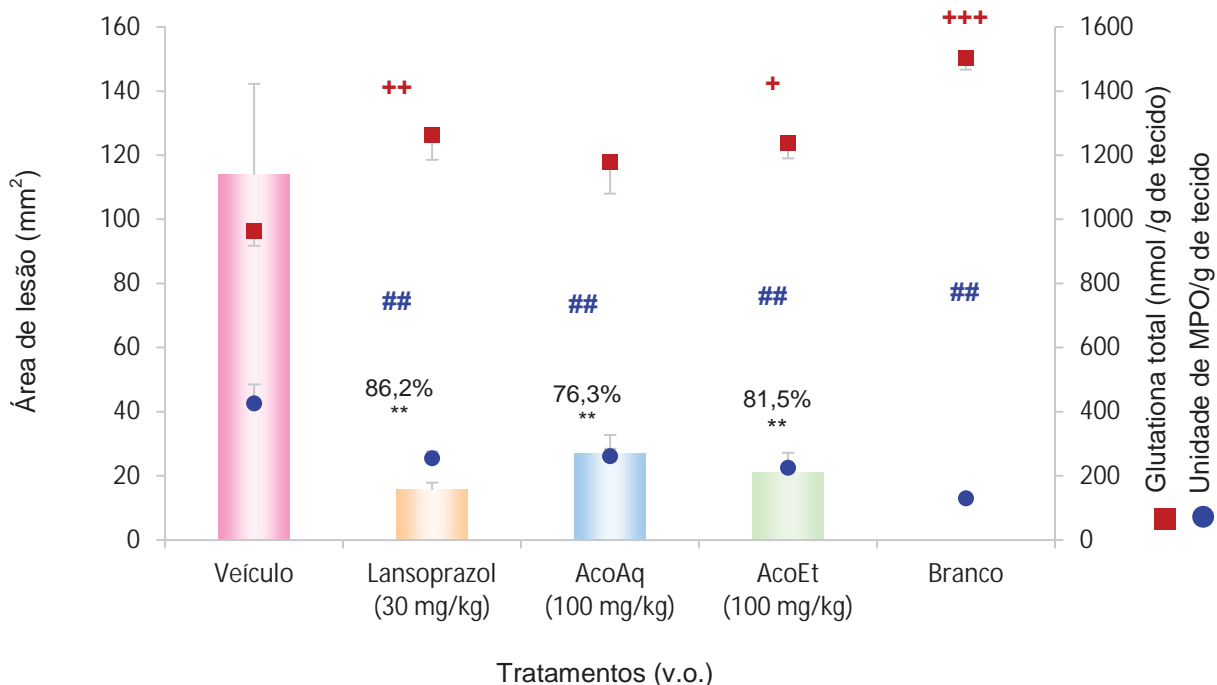


Figura 26. Atividade gastroprotetora das partições AcoAq e AcoEt no modelo de indução de lesão gástrica por Isquemia/Reperfusão em ratos; As barras representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em percentagem indicam a proteção em relação ao veículo. ANOVA $F_{(3,33)}=10.25$; $**p<0.01$ para Área de lesão, Teste de Dunnet. ANOVA $F_{(4,37)}=9.43$; $##p<0.01$ para MPO, Teste de Dunnet. ANOVA $F_{(4,37)}=10.25$; $++p<0.01$ para Glutathione total, Teste de Dunnet

4.3.6. Lesão duodenal induzida por cisteamina

Na **figura 27** estão representados o score de lesão duodenal após a administração da cisteamina, bem como os níveis de glutathione total e níveis de MPO nos tecidos dos animais pré-tratados com veículo, lansoprazol (30 mg/kg) ou BiMeOH (500 mg/kg). Neste modelo, BiMeOH foi capaz de inibir a formação da lesão duodenal em 69.3%. A quantificação de glutathione total mostrou-se inalterada para BiMeOH. A prévia administração de BiMeOH foi capaz de inibir a formação das lesões, mantendo baixo os níveis de MPO próximos aos animais do grupo branco.

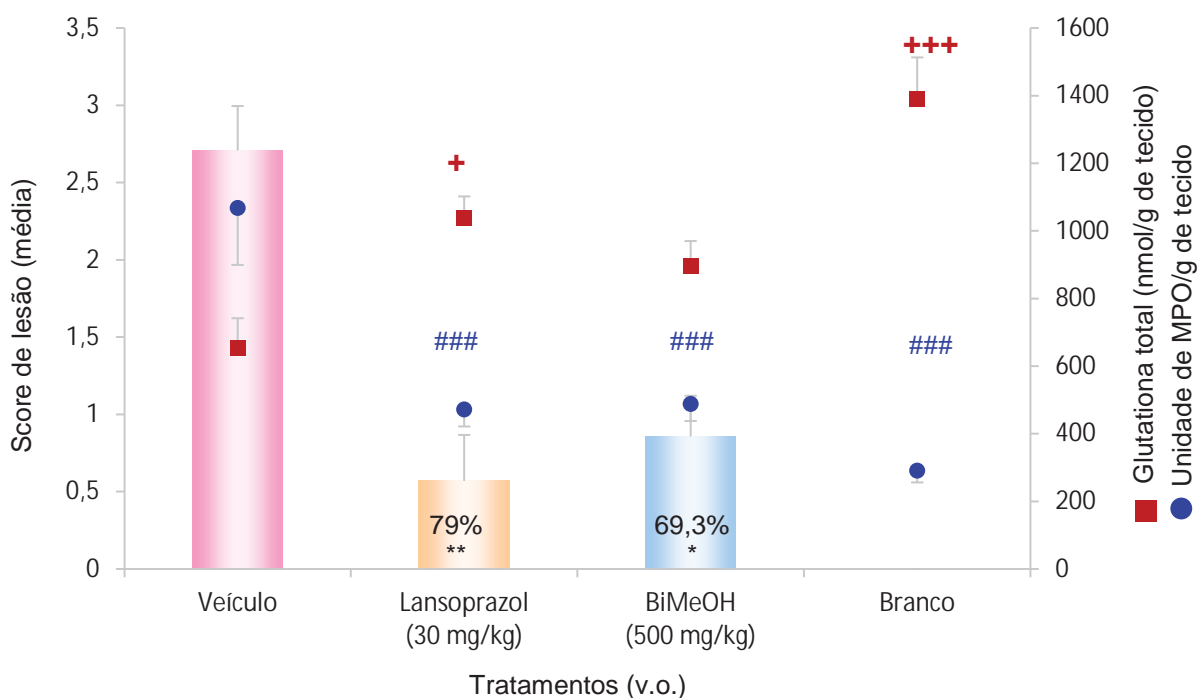


Figura 27. Efeito do extrato BiMeOH de *B. intermedia* no modelo de indução de lesão duodenal induzida pela administração oral de cisteamina em ratos; ANOVA, seguido por teste Kruskal-Wallis * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ para score de lesão. As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo). Os números em porcentagem indicam a inibição em relação ao controle; ANOVA, teste de Dunnett: $F_{(3,20)} = 12.5$ + $p < 0.05$ e +++ $p < 0.001$ para glutaciona total; $F_{(3,20)} = 13.88$ ### $p < 0.001$ para Mieloperoxidase.

Neste mesmo modelo, verificou-se que apenas AcoAq foi capaz de inibir a formação de lesões na mucosa duodenal, de modo significativo, em 75.3%. O mesmo não aconteceu para a partição AcoEt (**figura 28**) que apresentou inibição das lesões em 52.4% ($p > 0.05$). Estes resultados indicam, portanto que provavelmente AcoAq manteve em sua composição substâncias do extrato BiMeOH, que garantiram sua atividade protetora nesse modelo. AcoAq ainda apresentou níveis reduzidos de MPO, sem alterar os níveis de glutaciona total, como visto também para BiMeOH.

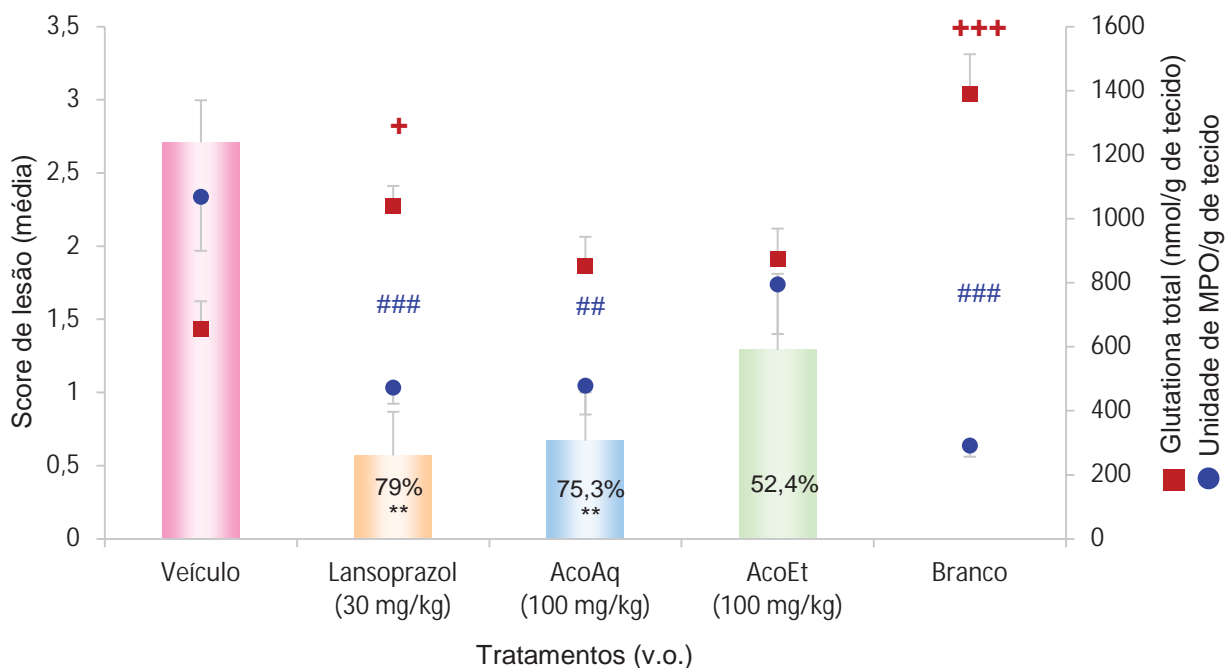


Figura 28. Efeito das partições AcoAq e AcoEt de *B. intermedia* no modelo de indução de lesão duodenal induzida pela cisteamina; ANOVA, seguido por teste Kruskal-Wallis ** $p < 0.01$ para score de lesão. As diferenças observadas foram em relação ao grupo controle (veículo). Os números em porcentagem indicam a inibição em relação ao controle; ANOVA, teste de Dunnett: $F_{(4,26)}=9.29$ + $p < 0.05$ e +++ $p < 0.001$; $F_{(4,26)}=7.81$ ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ para MPO.

4.3.7. Discussão

A úlcera péptica é induzida pela predominância de fatores agressivos sobre fatores defensivos, o balanço entre esses fatores é necessário para manter intacta e saudável a mucosa gástrica (Bose, Motghare *et al.*, 2003). A constatação da atividade antiulcerogênica do extrato de *B. intermedia* na prevenção das lesões gástricas nos modelos experimentais agudos, anteriormente descritos (Santos, Kushima *et al.*, 2012), levou à realização de experimentos que possibilitassem explicar possíveis mecanismos de ação pelos quais BiMeOH e as partições AcoAq e AcoEt atuam.

O uso de DAINES está frequentemente associado com toxicidade gastrointestinal (Griffin e Scheiman, 2001), que é um importante problema médico apesar dos recentes avanços terapêuticos (Hawkins e Hanks, 2000). Além de serem utilizadas para alívio da dor, as DAINES estão cada vez mais sendo utilizadas para prevenção de neoplasias, acidente vascular cerebral, pré-eclâmpsia, doença de Alzheimer e muitas outras doenças (Garner, 1992; Pace, 1995; Coruzzi, Menozzi *et al.*, 2004).

Estudos têm demonstrado que a indometacina, uma destas DAINES, tem a capacidade de romper a barreira mucosa, levando à difusão de íons de hidrogênio e extensos danos na mucosa (Clinch, Banerjee *et al.*, 1987), através de vários processos, como a inibição da síntese de prostaglandinas (Halter, Tarnawski *et al.*, 2001; Dormond, Bezzi *et al.*, 2002). É descrito que a indometacina regula a síntese de moléculas pró-inflamatórias, contribuindo para a lesão da mucosa (Appleyard, Mccafferty *et al.*, 1996), diminuindo também fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, volume de células epiteliais, bicarbonato e secreção mucosa (Bech, 2000).

No modelo de indução de lesão gástrica por indometacina, verificou-se que apenas a partição AcoAq foi capaz de diminuir as lesões gástricas, de modo significativo. Em análise anterior foi possível observar que BiMeOH também possui esta atividade gastroprotetora frente a este agente lesivo, a partir do qual pode-se inferir que AcoAq manteve durante o particionamento os compostos responsáveis por essa atividade em BiMeOH. Ao proceder à quantificação de glutathiona total da mucosa gástrica destes animais, verificou-se que não houve alteração nesse parâmetro. Em contrapartida, os níveis de MPO apresentaram-se reduzidos após o tratamento com AcoAq. Está bem caracterizado que a atividade da MPO se eleva nos tecidos, após indução de lesão gástrica por DAINES (Whittle, 2004). Os aumentos nos níveis dessa enzima podem estar associados com o aumento nos

níveis de infiltração de neutrófilos e H_2O_2 no tecido danificado pré-tratado com indometacina. Sabe-se que a liberação de MPO nas células gástricas é outro indicativo no grau de ulceração (Takeuchi, Ukawa *et al.*, 1999; Bayir, Odabasoglu *et al.*, 2006). Desta forma, AcoAq foi capaz de inibir a formação de lesões gástricas induzidas por indometacina, com redução nos níveis de MPO que neutralizam os efeitos deletérios da DAINE nas células da mucosa gástrica, indicando portanto, que esta partição manteve os compostos fitoquímicos responsáveis por esta atividade em BiMeOH.

Um fator que contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de compostos SH que tem como finalidade básica o fortalecimento das pontes de dissulfeto e redução da formação de radicais livres derivados de oxigênio, relacionando-se com a proteção celular (Konturek, Brzozowski *et al.*, 1990; Matsuda, Li *et al.*, 1999). Os efeitos gastroprotetores dos compostos SH incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzidos por diversos agentes e circunstâncias, como aqueles que ocorrem com as exposições tóxicas como o próprio etanol na mucosa gástrica (Takeuchi, Okada *et al.*, 1989; Konturek, Brzozowski *et al.*, 1990). Em contrapartida, a redução dos níveis normais de SH tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (Glavin e Szabo, 1992; Ko e Cho, 1995). A administração do inibidor de formação dos compostos sulfidrílicos endógenas (NEM) em todos os grupos tratados, provocou um aumento expressivo das lesões gástricas induzidas pelo etanol. O aumento significativo das lesões dos animais pré-tratados com o bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos e tratados com o extrato, evidenciou a importância deste fator na gastroproteção do extrato de *B. intermedia* indicando a forte participação deste componente no

mecanismo de ação do extrato. A análise dos níveis de glutathione total no tecido destes mesmos animais demonstrou que, ao inibir a formação das lesões gástricas, BiMeOH também foi capaz de aumentar os níveis de glutathione total, quando comparado aos animais que receberam somente o veículo. Comparando ainda, o efeito do tratamento com BiMeOH aos animais intactos (branco) verifica-se, que não existe diferença significativa entre os grupos. A prévia inibição dos compostos SH aos animais tratados com BiMeOH, foi capaz de reduzir os níveis de glutathione total, demonstrando a importância deste componente antioxidante para a gastroproteção exercida por BiMeOH. No tecido estomacal, enquanto a diminuição dos níveis de glutathione causa um dano gástrico, níveis crescentes de glutathione produzem um efeito gastroprotetor (Hirota, Inoue *et al.*, 1989; Naito, Yoshikawa *et al.*, 1993). A glutathione é um componente antioxidante endógeno e sua propriedade antioxidante está relacionada com a presença do grupo tiol em sua estrutura. A glutathione reage com peróxidos e radicais de oxigênio tóxicos para proteger células contra danos e também mantém grupamentos SH de proteína em sua forma reduzida, protegendo da oxidação (Walker, Crowley *et al.*, 1995). O tratamento agudo com etanol induz ao estresse oxidativo, dano no DNA, queda da atividade da xantina oxidase e dos níveis de malondialdeído e diminuição do conteúdo de glutathione total em células da mucosa gástrica (Marotta *et al.*, 1999). Quando a defesa do sistema antioxidante é insuficiente, radicais livres são acumulados causando injúrias na membrana celular, danos oxidativos e morte celular se o dano for contínuo (Repetto e Llesuy, 2002). Ao avaliar as partições AcoAq e AcoEt, para verificar seu envolvimento com os grupamentos SH, verificou-se que ambas partições apresentaram redução na proteção da mucosa quando expostas ao prévio tratamento com o inibidor de SH. Ambas as partições apresentaram níveis altos de glutathione mesmo na presença de etanol. Porém, os níveis foram

reduzidos significativamente na presença do inibidor de SH. AcoEt apresentou queda significativa nos níveis de glutathione enquanto AcoAq apresentou maior dano macroscópico na mucosa na ausência dos grupamentos SH.

Estudos realizados por Cho (2001) e Ancha *et al.*, (2003) indicam o envolvimento de NO na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera, pois o NO promove vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também existem relatos de seu envolvimento com agente anti-inflamatório nos tecidos. De acordo com Wallace e Miller (2001), o NO é também um importante regulador da secreção de muco no estômago e seus efeitos são produzidos pela estimulação da guanilato ciclase nas células epiteliais. Assim, NO parece ser produzido na célula epitelial em resposta à ativação de receptores colinérgicos e provoca a liberação de muco para essas células, garantindo assim, a integridade da mucosa. O NO é responsável tanto pela mediação das funções teciduais normais, quanto pelas lesões na mucosa gástrica. Assim, o NO, é um mediador das defesas e do reparo na mucosa gastrointestinal, porém o NO também pode contribuir com as injúrias teciduais em algumas doenças do trato digestório e alterar a motilidade gástrica (Wallace, Del Soldato *et al.*, 1999; Cho, 2001), além de promover ou iniciar respostas inflamatórias quando combinado com outras espécies reativas de oxigênio (Cho, 2001). No modelo experimental em que foi avaliado o papel de NO como fator protetor ativado pelo extrato, foi utilizado o inibidor de NO (L-NAME). O pré-tratamento com o inibidor L-NAME não reverteu a gastroproteção exercida por BiMeOH, demonstrando dessa forma, que não existe envolvimento desta via no mecanismo de ação gastroprotetora de BiMeOH. Ao proceder com a quantificação da glutathione nos tecidos destes animais pré-tratados com BiMeOH, verificou-se, que, apesar do L-NAME não causar danos visíveis à mucosa, este foi capaz de reduzir os níveis de glutathione, de modo significativo. Ao

analisar o efeito da inibição de NO pelo pré-tratamento com as partições, verificou-se que ambas apresentaram aumento na área de lesão gástrica, no entanto, AcoEt demonstrou ser mais dependente dessa via que AcoAq. A análise quantitativa dos níveis de glutathione demonstraram que somente AcoEt teve seus níveis reduzidos na presença do inibidor de NO. Portanto, os componentes de AcoEt presentes no extrato (provavelmente flavonóides) certamente são responsáveis pelo papel do NO na gastroproteção.

A peroxidação lipídica mediada por espécies reativas de oxigênio é uma importante causa da destruição e lesão nas membranas celulares e está envolvido na patogênese de injúrias na mucosa induzidas por etanol, isquemia/reperfusão e indometacina (Kvietys, Twohig *et al.*, 1990; Salim, 1990). A glutathione está presente no organismo em suas formas; reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção (Meister e Anderson, 1983). É um consenso, atualmente, que o efeito lesivo promovido pelo etanol sobre a mucosa gástrica é consequência do aumento da peroxidação lipídica e diminuição do nível de glutathione (Rodríguez, 2007). A glutathione é um marcador da saúde celular e sua queda é indicativa de lesão oxidante. Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais. Os dados obtidos neste projeto sugerem uma maior participação da glutathione na gastroproteção exercida por AcoEt. E embora a AcoEt esteja em menor concentração no extrato BiMeOH, os compostos flavonóides derivados da quercetina presentes em AcoEt são dependentes da glutathione e exercem intensa atividade no extrato bruto. A lesão gástrica induzida por etanol pode ocorrer devido a uma ação direta do epitélio gástrico causando peroxidação lipídica e vários estudos mostram atividade antioxidante de flavonóides e outros

compostos naturais (Czinner, Hagymasi *et al.*, 2001). Antioxidantes intracelulares, como a glutathiona parecem ter uma significativa ação protetora na mucosa gástrica contra o etanol (Hirowaka *et al.*, 1998).

Entre os vários fatores gastroprotetores, a microcirculação gástrica desempenha um papel importante na manutenção da barreira gástrica (Brzozowski, Konturek *et al.*, 2001; Kwiecien, Brzozowski *et al.*, 2002). Os nervos sensoriais estão envolvidos na regulação da circulação sanguínea na mucosa gástrica (Jaworek *et al.*, 2002; Pawlik *et al.*, 1998), que é densamente innervada por neurônios aferentes sensíveis à capsaicina, contendo peptídeos vasodilatadores, tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Sternini *et al.*, 1987). A capsaicina afeta os nervos de duas maneiras diferentes, baixas doses resultam na estimulação dos nervos sensoriais, acompanhada pela liberação de CGRP; enquanto altas doses de capsaicina levam à ablação ou inativação funcional dos nervos sensoriais (Warzecha, Dembinski *et al.*, 2000). A liberação de CGRP pelos nervos sensitivos à capsaicina também foram implicados na manutenção da integridade da mucosa pois a ablação funcional dos neurônios resultam numa diminuição da reatividade ao CGRP na mucosa e leva a um agravamento da lesão gástrica induzida por diversos compostos ulcerogênicos (Brzozowski *et al.*, 1996; Kwiecien *et al.*, 2002). O receptor de capsaicina, TRPV1 (receptor vanilóide de potencial transitório) pode ser ativado não só por capsaicina, mas também pelo calor (temperatura acima de 43°C), ácido, vários lipídios e estímulos nocivos (Caterina e Julius, 2001). O Ruthenium Red, um antagonista de receptores TRPVs, é descrito como um antagonista funcional (Amann e Maggi, 1991) porque não interfere com o sitio de ligação do receptor (Szallasi e Blumberg, 1999), mas bloqueia o canal iônico ativo (Bleakman, Brorson *et al.*, 1990).

Gazzieri *et al.* (2007), ressaltam que o etanol ativa receptores TRPV1 em neurônios sensoriais da mucosa gástrica, estimulando a liberação de substância P no estômago, que por sua vez ativa receptores NK1 das células epiteliais gástricas promovendo o aumento de espécies reativas (estresse oxidativo), que provocam lesões hemorrágicas na parede do estômago decorrentes da peroxidação lipídica. Nossos resultados mostram que o bloqueio dos nervos sensitivos à capsaicina foi capaz de reverter a gastroproteção exercida por AcoEt e de forma menos efetiva, a gastroproteção de BiMeOH. Já AcoAq não apresentou alteração na inibição das lesões ocasionadas pela administração pelo etanol absoluto mesmo na presença do bloqueador de TRPV. Considerando que BiMeOH apresenta em sua constituição majoritariamente (cerca de 70%) os compostos concentrados em AcoAq pode-se supor que este seja o motivo pelo qual o extrato BiMeOH apresentou apenas uma reversão parcial da sua gastroproteção na presença do bloqueador Ruthenium Red.

Ainda neste modelo experimental, na presença do bloqueador de TRPV, BiMeOH e AcoEt apresentaram quedas expressivas dos níveis de glutathione, enquanto AcoAq manteve seus níveis inalterados. Estes dados corroboram os obtidos na análise macroscópica quando AcoAq não apresentou alteração na sua gastroproteção mesmo na presença do bloqueador Ruthenium Red. Foi possível observar em BiMeOH e mais evidentemente em AcoEt, uma diminuição dos níveis de glutathione quando na presença do bloqueador, bem como a inibição das lesões nestes dois grupos experimentais ficou significativamente comprometida.

A interrupção do suprimento de sangue para um órgão ou tecido seguido pela reintrodução de sangue na área afetada são chamados de isquemia/reperfusão, e são conhecidas por induzir lesões gástricas predominantemente devido à formação excessiva de metabólitos de oxigênio

reativo, adesão dos neutrófilos às células endoteliais, disfunção microvascular, secreção de ácido gástrico, liberação de histamina endógena e gástrico (Brzozowski, Konturek *et al.*, 2000). A isquemia enfraquece a barreira mucosa gástrica, aumentando a difusão ácida predispondo a mucosa a danos (Kawai, Joh *et al.*, 1994). Após a reperfusão, as espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas a partir do sistema xantina-oxidase e neutrófilos são ativados, levando a peroxidação lipídica do tecido que, em combinação com a secreção gástrica resulta em danos e morte celular (Smith, Mercer *et al.*, 1996; Wada, Kamisaki *et al.*, 1996). ERO, como os radicais superóxido e hidroxila são conhecidos por diretamente ou indiretamente causar dano tecidual e também estão envolvidos na patogênese de lesões gástricas observadas após isquemia/reperfusão e estresse (Iino *et al.*, 2002). A reperfusão de tecidos isquêmicos, paradoxalmente, agrava o processo de lesão e leva à liberação de espécies reativas de oxigênio e mediadores pró-inflamatórios e à atração de células inflamatórias infiltrando os tecidos (Chamoun, Burne *et al.*, 2000; Piper, Meuter *et al.*, 2003). No trato gastrointestinal, lesões por isquemia/reperfusão são conhecidas por serem associadas à morbidade e mortalidade durante o choque hemorrágico, correção de aneurisma da aorta abdominal, doença isquêmica intestinal e enterocolite necrosante Riaz *et al.*, 2002; (Dimmitt, Glew *et al.*, 2003). Este modelo experimental é utilizado para avaliar resposta de fármacos em um processo de ulcerogênese sem utilização de agentes químicos, patógenos ou estresse somático, como nos modelos de etanol, *H. pylori* e estresse por contenção e frio; isolando desta forma, os fatores ulcerativos relacionados a radicais livres formados por processos inflamatórios e vasculares (Zimmerman e Granger, 1994; Cabeza, Motilva *et al.*, 2001). Neste procedimento experimental, BiMeOH, AcoAq e AcoEt foram capazes de inibir a formação das

lesões gástricas, com inibições superiores a 75%, resultados estes bastante expressivos para um modelo tão agudo de dano gástrico.

A isquemia por si só é capaz de provocar lesões no tecido gástrico; sendo que após a reperfusão que ocorrem os principais eventos lesivos. Kitano *et al.*, (2005) mostraram que após a re-oxigenação da mucosa gástrica, as lesões são aumentadas em relação a aquelas ocasionadas no período de isquemia (Campos e Yoshida, 2004). A utilização de compostos antioxidantes e os varredores de radicais livres têm se mostrado benéfica em animais expostos a este processo (Sakurai, Sugawara *et al.*, 1994; Naito, Yoshikawa *et al.*, 1999; Derin, Izgut-Uysal *et al.*, 2004; Derin, Agac *et al.*, 2006). A quantificação de glutathione mostrou que apenas a partição AcoEt aumentou os níveis de glutathione total. Como já mencionado, esta partição apresenta majoritariamente flavonóides em sua composição, compostos sabidamente antioxidantes e prováveis responsáveis por esta ação no tecido gástrico.

As informações relacionadas com as lesões agudas na mucosa gástrica induzida por isquemia/reperfusão tem aumentado expressivamente nos últimos anos (Derin, Izgut-Uysal *et al.*, 2004(Bulbul, Tan *et al.*, 2008). O trato gastrointestinal é um dos primeiros tecidos afetados por hipoperfusão durante o choque hemorrágico. Em condições de choque, a camada mais vulnerável do trato gastrointestinal é a mucosa. A lesão aguda na mucosa gástrica é relatada como resultado da diminuição do fluxo sanguíneo e as alterações na microvascularização causando lesões devido à isquemia/reperfusão. A disfunção microvascular, ativação de neutrófilos e espécies reativas de oxigênio, que são formados pela restauração do fluxo sanguíneo através da reperfusão, provocam a morte celular e lesão na mucosa através aumento de peroxidação lipídica e os efeitos nocivos do ácido gástrico (Derin , Izgut-Uysal *et al.*, 2004). A MPO é a maior proteína de

neutrófilos, que é armazenada em grânulos azurofílicos e liberada durante a fagocitose de células ativadas. Pode ser utilizada como um índice quantitativo e sensível de acumulação de neutrófilos no tecido reperfundido (De Gusmao, Becker *et al.*, 2005). A isquemia leva à ativação de leucócitos e os neutrófilos ativados secretam ERO e ácido hipocloroso, estes derivados tóxicos apresentam um efeito destrutivo sobre os tecidos Hayashi *et al.*, 2004. Ao quantificar MPO no tecido gástrico após isquemia, foi possível observar uma redução destes níveis tanto para BiMeOH quanto para AcoAq e AcoEt. Estes resultados indicam que tanto o extrato BiMeOH quanto as partições foram capazes de inibir a ativação de neutrófilos provocada pela isquemia, inibindo esta via de geração de ERO, levando a uma preservação da mucosa gástrica neste modelo experimental. Ainda neste modelo, AcoEt foi capaz de aumentar os níveis de glutathiona total no tecido gástrico, demonstrando mais uma vez a importância desta via na atividade da partição.

O efeito deletério da ablação de nervos sensoriais pela capsaicina foi recentemente demonstrado no modelo de isquemia/reperfusão de dano da mucosa gástrica e mostraram a participação desta via na severidade das lesões causadas por este modelo (Pawlik *et al.*, 2001). Como mencionado anteriormente, os neurônios sensitivos à capsaicina apresentam papel importante na microcirculação gástrica e regulação do fluxo sanguíneo que também é afetada durante a isquemia. Lembrando que BiMeOH e AcoEt apresentaram participação desta via em sua gastroproteção, não se deve descartar esta possibilidade de mecanismo de ação conjunta com a inibição da MPO e aumento na glutathiona na gastroproteção exercida neste modelo.

De acordo com Sonnenberg e Everhart (1997) e Chan e Leung (2002), a úlcera duodenal apresenta forte associação com infecção por *H. pylori* e muitos estudos tem se baseado na indução da úlcera duodenal utilizando a cisteamina

(HS-CH₂-CH₂-NH₂, mercaptoetilamina) que produz úlceras perfurantes no duodeno do animal dentro de 24-48h após sua administração (Selye e Szabo, 1973; Szabo, 1978; (Szabo e Pihan, 1987). Khomenko *et al.* (2009) descreveu o mecanismo citotóxico *per si* promovido pela cisteamina, no entanto, Szabo (1987) cita que a cisteamina é capaz de causar lesões duodenais pelo aumento da secreção ácida e a deficiência de neutralização por íons bicarbonato e redução do transporte do conteúdo neutralizado do duodeno para as regiões distais do intestino. No entanto, o mecanismo molecular pelo qual a cisteamina induz ulceração duodenal não está completamente entendido.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com BiMeOH foi capaz de inibir a formação de lesão duodenal pela cisteamina. O extrato também promoveu redução nos níveis de MPO no tecido. Os níveis de glutathione não se mostraram alterados neste modelo. A MPO é um marcador sensível e específico da inflamação aguda e reflete a infiltração celular no local lesado (Dengiz, Odabasoglu *et al.*, 2007). E redução nos níveis de MPO podem estar relacionada com a habilidade protetora de BiMeOH. Ao avaliar o efeito das partições sobre as lesões duodenais, foi possível verificar que apenas AcoAq foi capaz de inibir as formações de lesões, reduzindo também os níveis de MPO no tecido duodenal. Assim, provavelmente os compostos presentes em AcoAq (predominantemente taninos condensados) sejam os responsáveis pela ação de BiMeOH em sua atividade protetora frente à úlcera duodenal.

4.4. Atividade cicatrizante

4.4.1. Isquemia-Reperfusão

Na **figura 29** estão demonstrados os resultados da análise macroscópica das lesões induzidas por isquemia-reperfusão. Os animais foram tratados 24 horas após a indução, uma única vez, antes de serem mortos. Os resultados demonstram que não houve redução significativa das lesões em nenhum dos tratamentos.

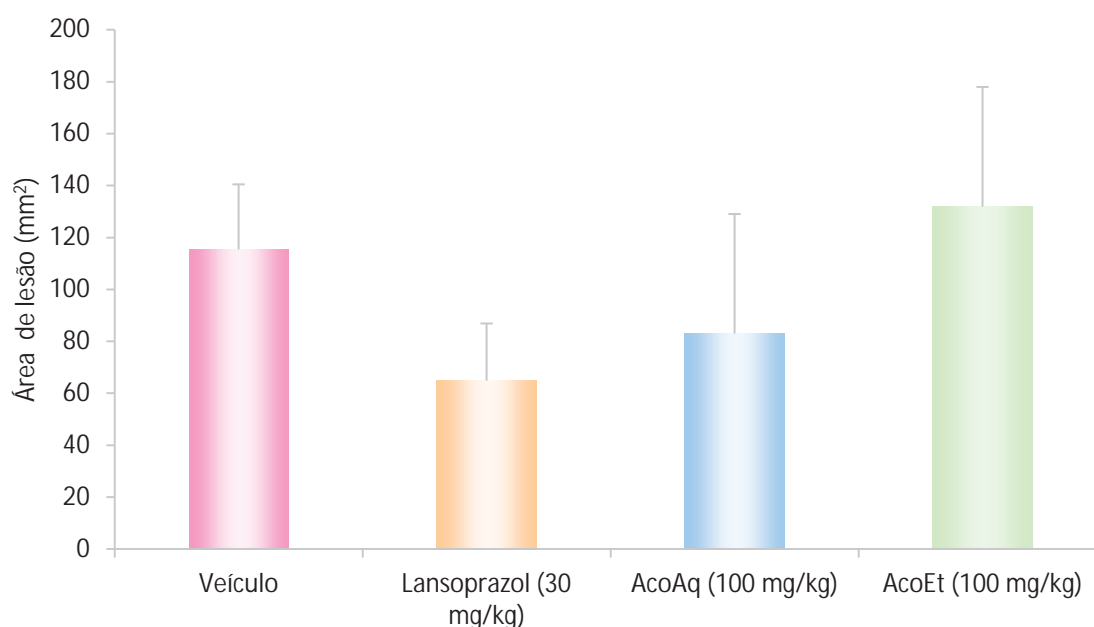


Figura 29. Efeito do tratamento único com as partições aquosa (AcoAq) e acetato de etila (AcoEt) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão em ratos. ANOVA $F_{(3,19)} = 0,71$ para área de lesão em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Após análise macroscópica das lesões, foram realizadas quantificações bioquímicas para elucidar mecanismo de ação do extrato e partições após indução de lesão gástrica por isquemia-reperfusão. Na **figura 30**, pode-se observar que o

tratamento com as ambas as partições não apresentaram alterações nos parâmetros observados, dados que corroboram com os resultados macroscópicos.

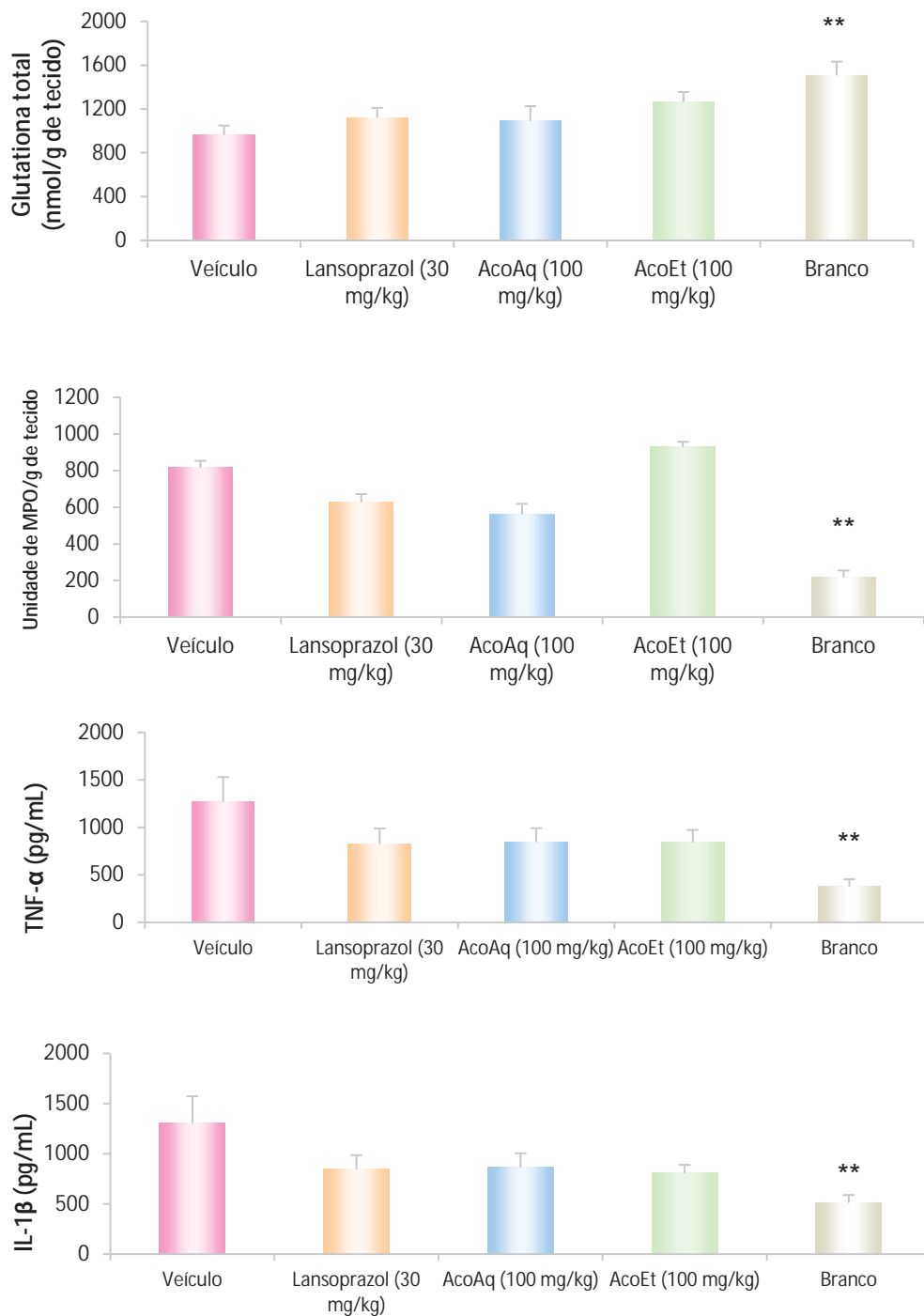


Figura 30. Efeito do tratamento único com AcoAq e AcoEt nos Níveis de Glutathiona total, MPO, TNF- α e IL-1 β no modelo de Isquemia/Reperusão em ratos, ANOVA $F_{(4,23)} = 3,15$ ** $p < 0.01$ para TNF- α ; $F_{(4,23)} = 3,15$ ** $p < 0.01$ para IL-1 β ; $F_{(4,23)} = 5,93$ ** $p < 0.01$ para MPO; $F_{(4,25)} = 3,52$ ** $p < 0.01$ para Glutathiona total; em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnett.

Na **figura 31** estão demonstrados os resultados da avaliação da área de lesão gástrica induzida pela isquemia-reperfusão. Os animais foram expostos ao processo lesivo (isquemia-reperfusão) e tratados por 6 dias após a indução das lesões. Pode-se observar que tanto o grupo controle positivo quanto o extrato BiMeOH foram capazes de reduzir significativamente as lesões induzidas pelo processo isquêmico.

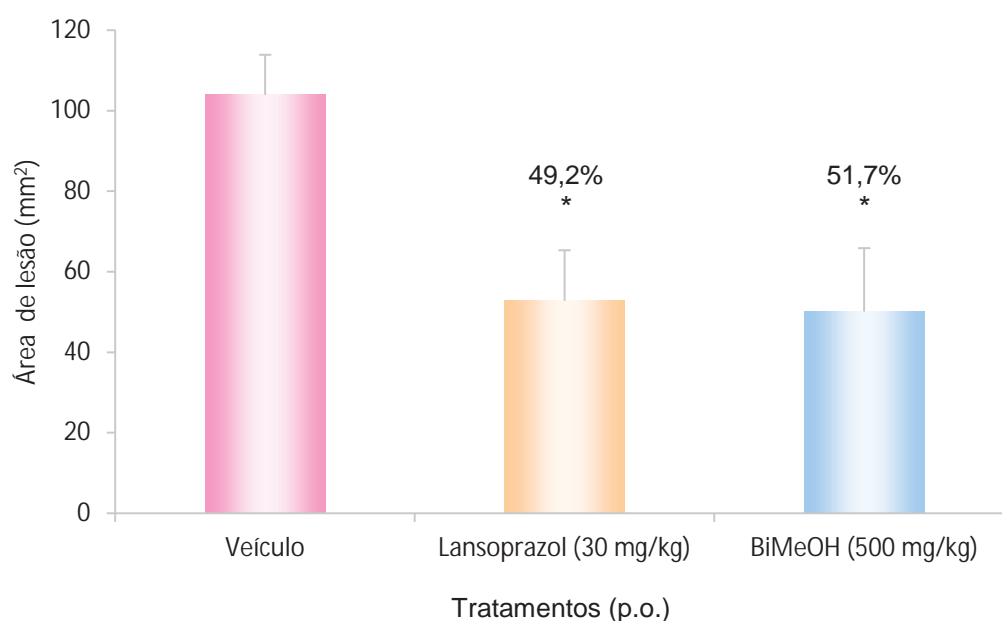


Figura 31. Efeito do tratamento por 6 dias com o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão em ratos. ANOVA $F(2,18)= 5,47$ * $p<0.05$ para área de lesão em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnett.

Ao avaliar o tratamento por 6 dias com as partições após a indução de lesão pelo processo isquêmico (**figura 32**), foi possível observar que apenas a partição AcoEt reduziu de modo significativo a área de lesão gástrica.

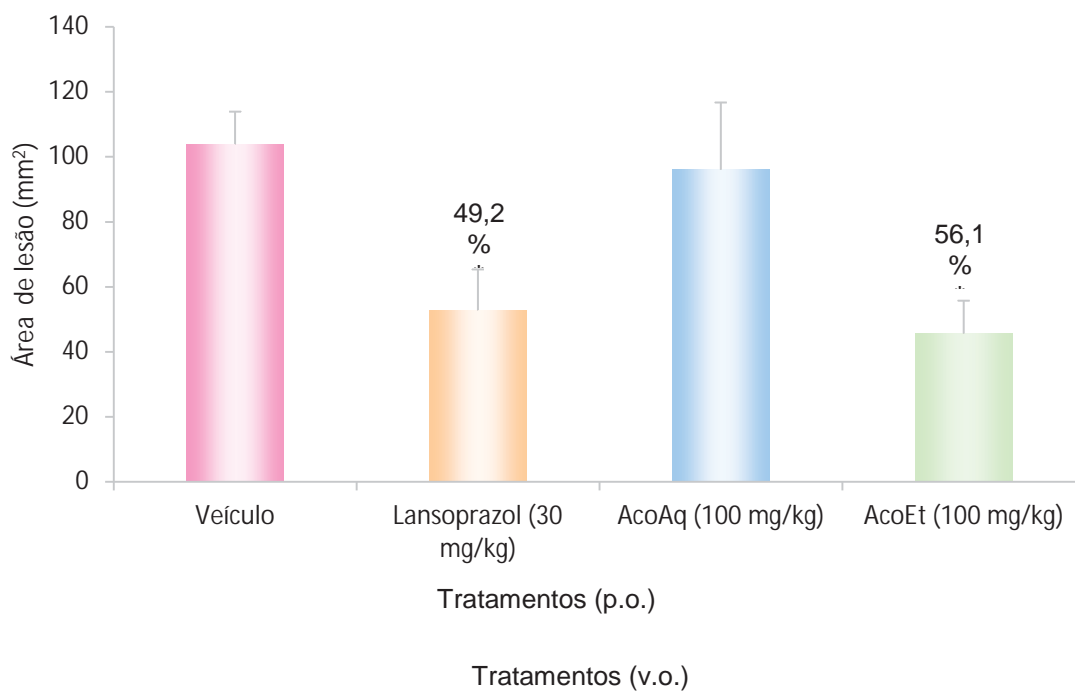


Figura 32. Efeito do tratamento por 6 dias com as partições aquosa (AcoAq) e acetato de etila (AcoEt) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão em ratos. ANOVA $F_{(3,22)} = 4,71$ * $p < 0.05$ para área de lesão em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Em continuidade, foram realizadas quantificações bioquímicas a fim de caracterizar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade de extrato e partições após indução de lesão por isquemia-reperfusão. Na **figura 33** estão os resultados que mostram os níveis de glutathiona total inalterados após 6 dias de tratamento com BiMeOH.

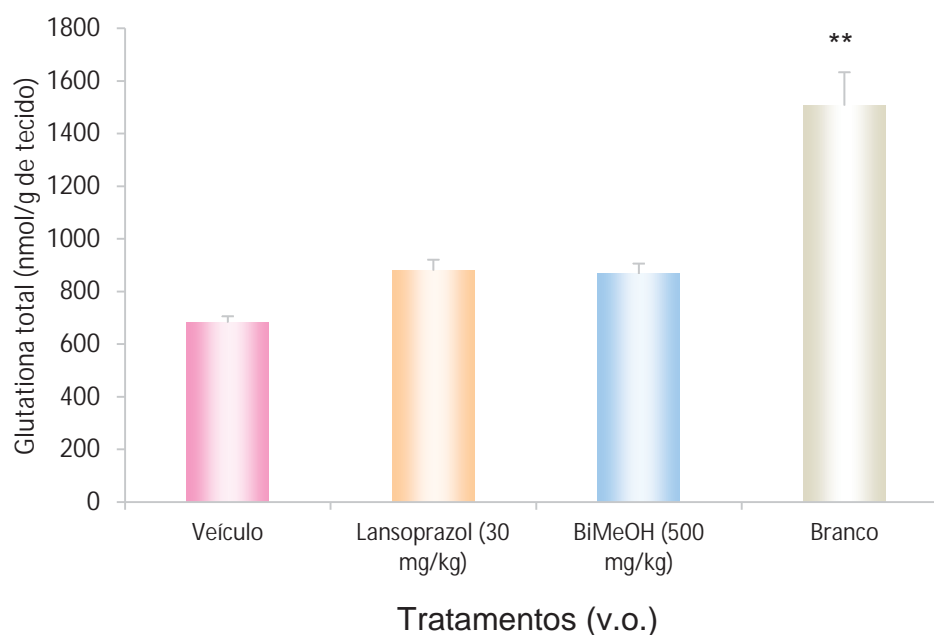


Figura 33. Efeito do tratamento por 6 dias com o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis totais de glutathiona. ANOVA $F_{(3,25)} = 34,4$ $^{**}p < 0.01$ para glutathiona total em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

No entanto, ao avaliar os níveis de glutathiona total no tecido gástrico após tratamento com as partições AcoAq e AcoEt, foi possível constatar um aumento significativo ($p < 0.05$) para ambas as partições (**figura 34**).

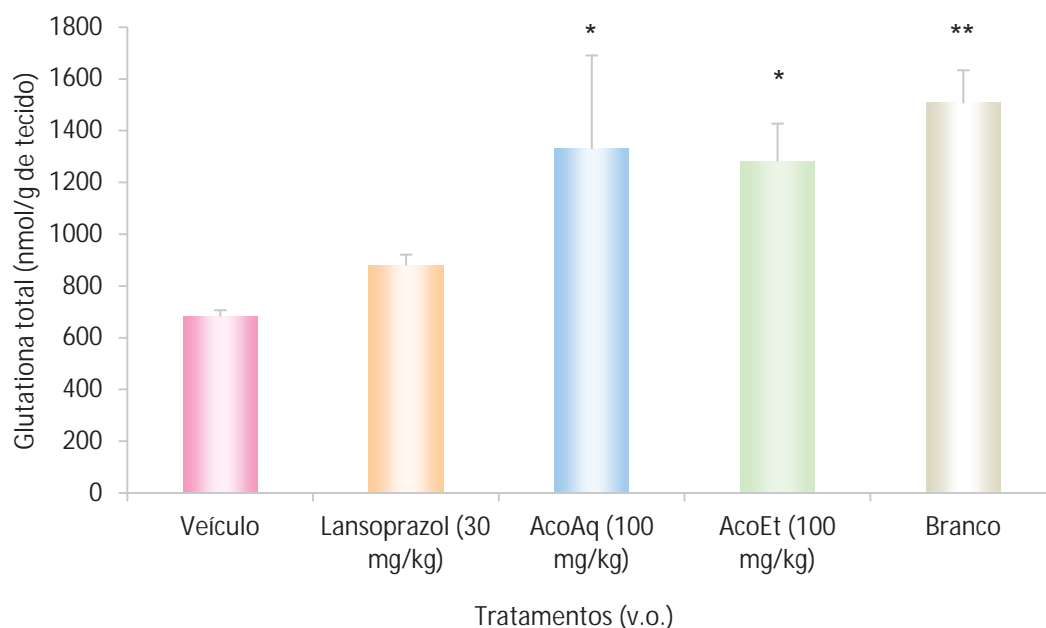


Figura 34. Efeito do tratamento por 6 dias com AcoAq e AcoEt após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis totais de glutathione. ANOVA $F_{(4,31)} = 48,6$ $**p < 0.01$ para glutathione total em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Na **figura 35** estão os resultados da análise dos níveis de MPO na mucosa gástrica após isquemia-reperfusão em animais tratados por 6 dias. Os resultados demonstram que BiMeOH foi efetiva ao reduzir em 39.4% os níveis de MPO, dados que corroboram com os achados macroscópicos. Na **figura 36** estão os resultados de MPO após tratamento com AcoAq e AcoEt, na qual é possível observar que apenas AcoEt foi capaz de reduzir (45.6%) de modo significativo, os níveis de MPO. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na análise macroscópica e apontam os compostos presentes na partição AcoEt como responsáveis pela atividade de BiMeOH neste modelo experimental.

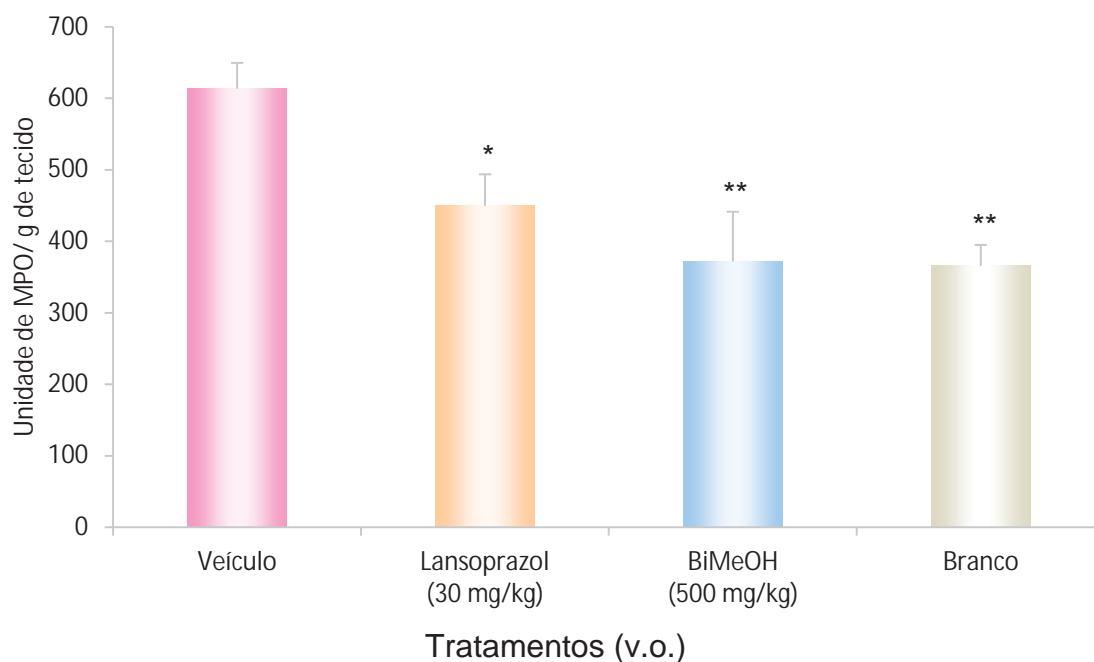


Figura 35. Efeito do tratamento por 6 dias com o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão na MPO. ANOVA $F_{(3,25)} = 4,25$; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ para MPO em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

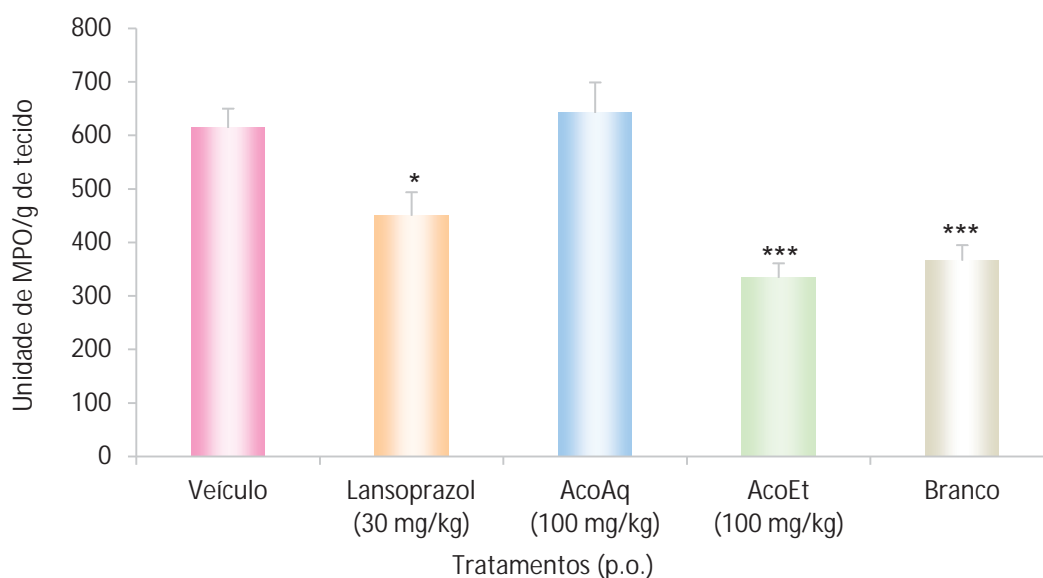


Figura 36. Efeito do tratamento por 6 dias com AcoAq e AcoEt após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão na MPO. ANOVA $F_{(4,31)} = 12,24$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ para MPO em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Ao avaliar o nível de TNF- α no tecido gástrico após tratamento com BiMeOH (figura 37), não foi possível observar alterações significantes entre os grupos. No entanto, a partição AcoEt foi capaz de reduzir em 49.5% os níveis de TNF- α quando comparado ao veículo (figura 38).

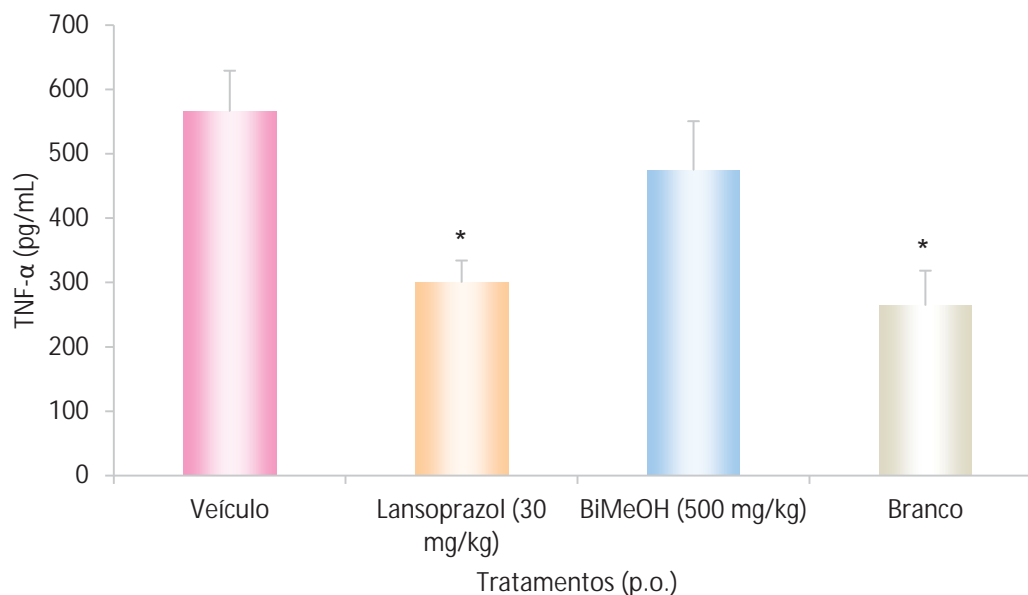


Figura 37. Efeito do tratamento por 6 dias com extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis de TNF- α . ANOVA $F_{(3,22)} = 4,36$ * $p < 0.05$ para TNF- α em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnett.

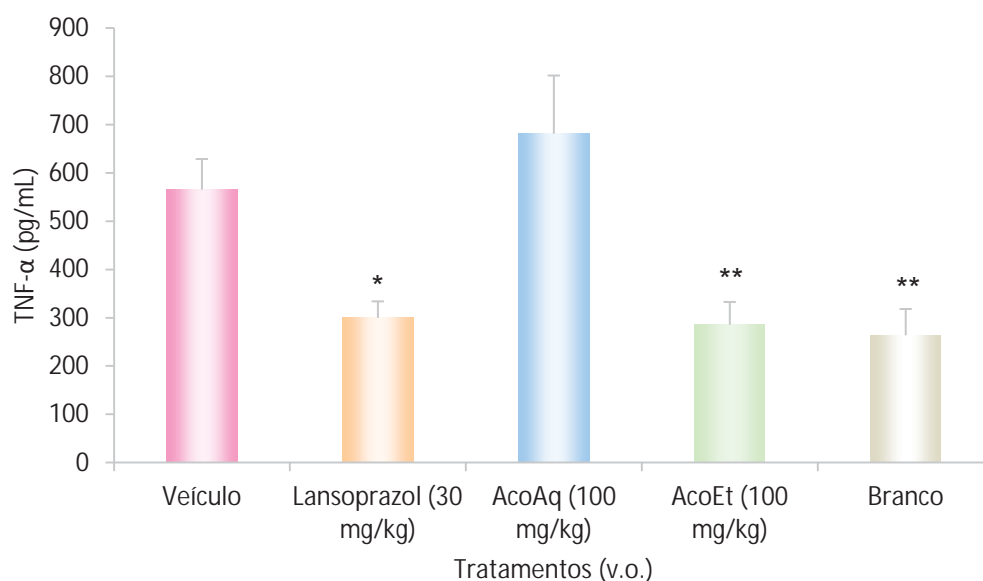


Figura 38. Efeito do tratamento por 6 dias com extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis de TNF- α . ANOVA $F_{(4,26)}= 7,69$ * $p<0.05$ e ** $p<0.01$ para TNF- α em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Na **figura 39** estão os resultados da quantificação de IL-1 β após tratamento com BiMeOH no modelo de isquemia-reperfusão, sendo possível observar uma redução significativa (34.9%) dos níveis desta interleucina, quando comparado ao grupo veículo.

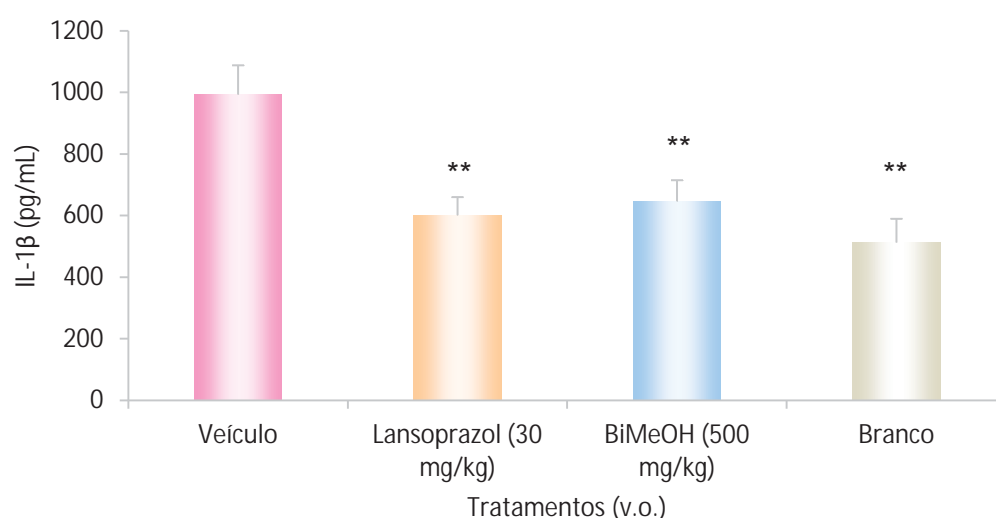


Figura 39. Efeito do tratamento por 6 dias com extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis de IL-1 β . ANOVA $F_{(3,22)}= 8,67$ ** $p<0.01$ para IL-1 β em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Ao analisar a mesma interleucina após o tratamento com as partições acoAq e AcoEt (**figura 40**), foi possível observar que, novamente, apenas a partição AcoEt apresentou redução significativa (49.5%) deste parâmetro, dados estes que confirmam o resultado encontrado na análise macroscópica das lesões.

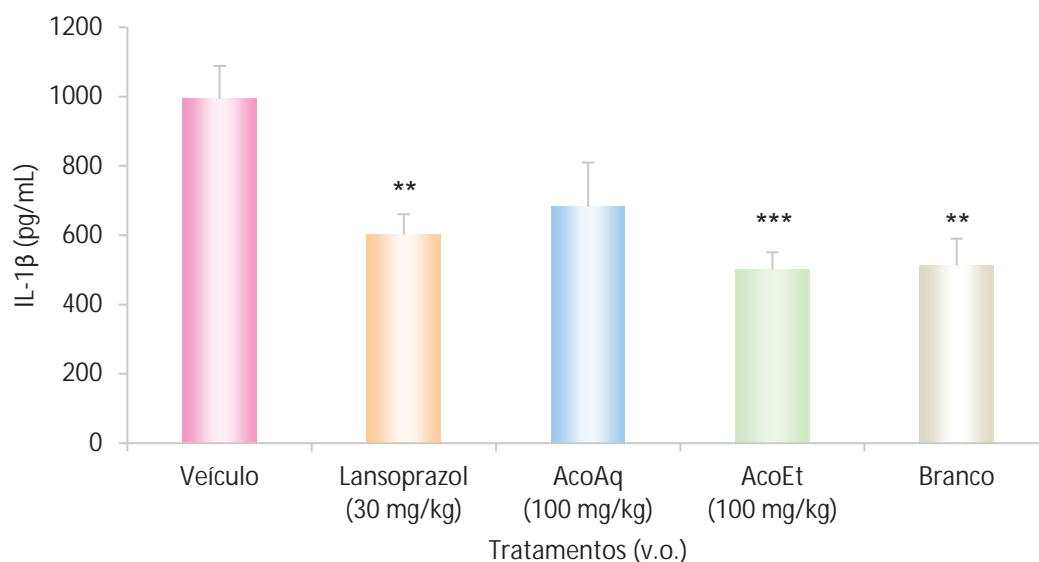


Figura 40. Efeito do tratamento por 6 dias com AcoAq e AcoEt após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis de IL-1 β . ANOVA $F_{(4,25)} = 6,38$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ para IL-1 β em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

Outra análise realizada, foi a quantificação de IL-10, uma interleucina anti-inflamatória que apresentou aumento no grupo de animais tratados com BiMeOH (94.3%) em comparação aos animais que receberam veículo (**figura 41**). Ao avaliar o resultado obtido com as partições neste mesmo modelo (**figura 42**), foi possível observar que ambas as partições apresentaram aumento nos níveis de IL-10. No entanto, este aumento foi mais evidente para AcoEt (>100%) que para AcoAq (50.3%).

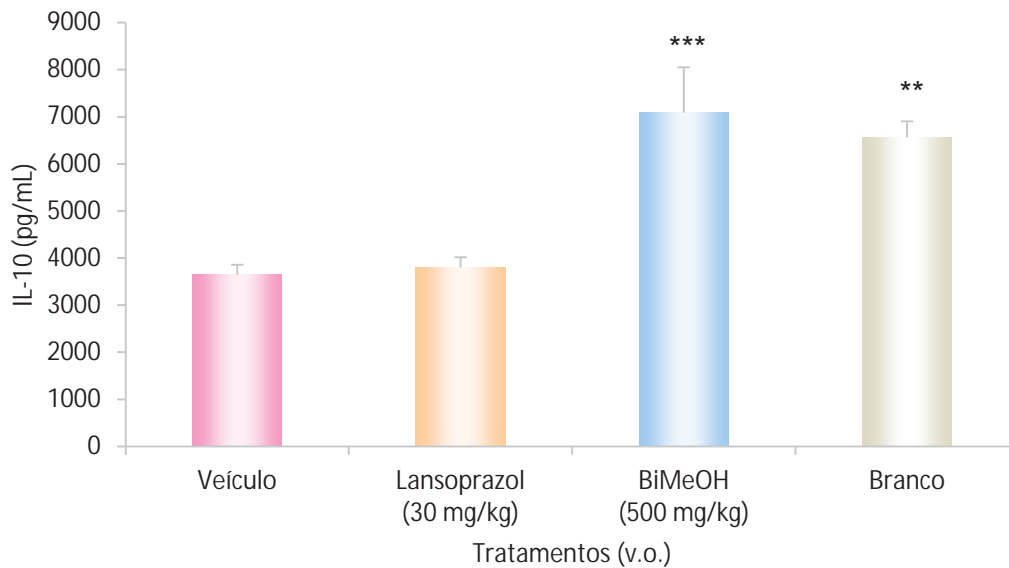


Figura 41. Efeito do tratamento por 6 dias com o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis de IL-10 ANOVA $F_{(3,22)} = 11,99$ $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$ para IL-10 em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

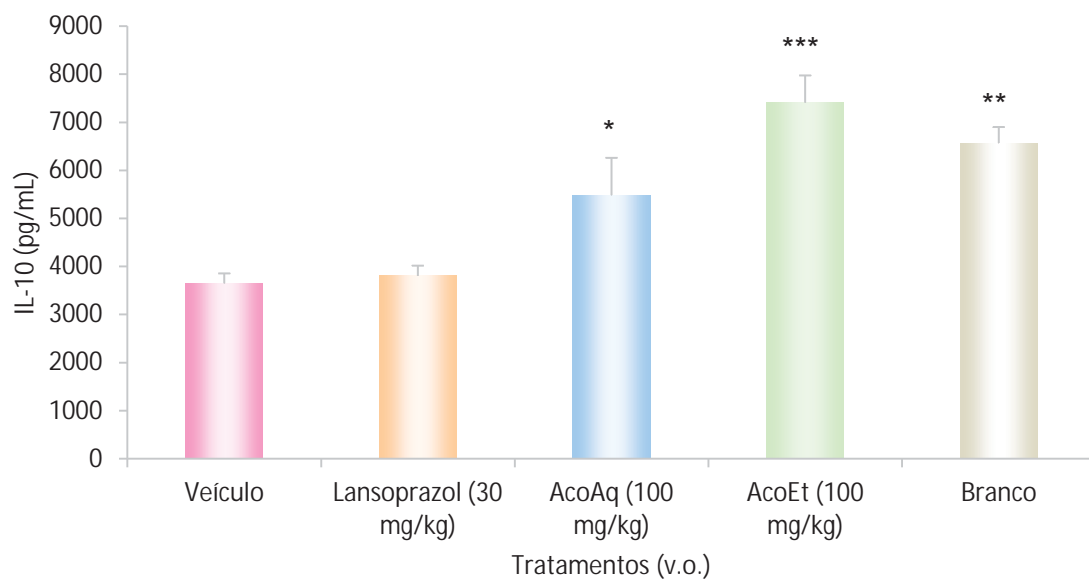


Figura 42. Efeito do tratamento por 6 dias com as partições AcoAq e AcoEt após indução de úlcera gástrica por isquemia-reperfusão nos níveis de IL-10. ANOVA $F_{(3,22)} = 11,16$, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ e $***p < 0.001$ para IL-10 em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Teste de Dunnet.

4.4.2.Ulcera gástrica

Na **figura 43** estão demonstrados os resultados da análise macroscópica das lesões induzidas por ácido acético no modelo de cicatrização. As lesões foram avaliadas 7 ou 14 dias após o início do tratamento. Decorridos 7 dias de tratamento, pode-se verificar que não houve redução significativa da área de lesão para BiMeOH, porém, transcorridos 14 dias de tratamento com BiMeOH, a área de lesão foi significativamente reduzida (51.9%) com o tratamento com o extrato quando comparada ao veículo.

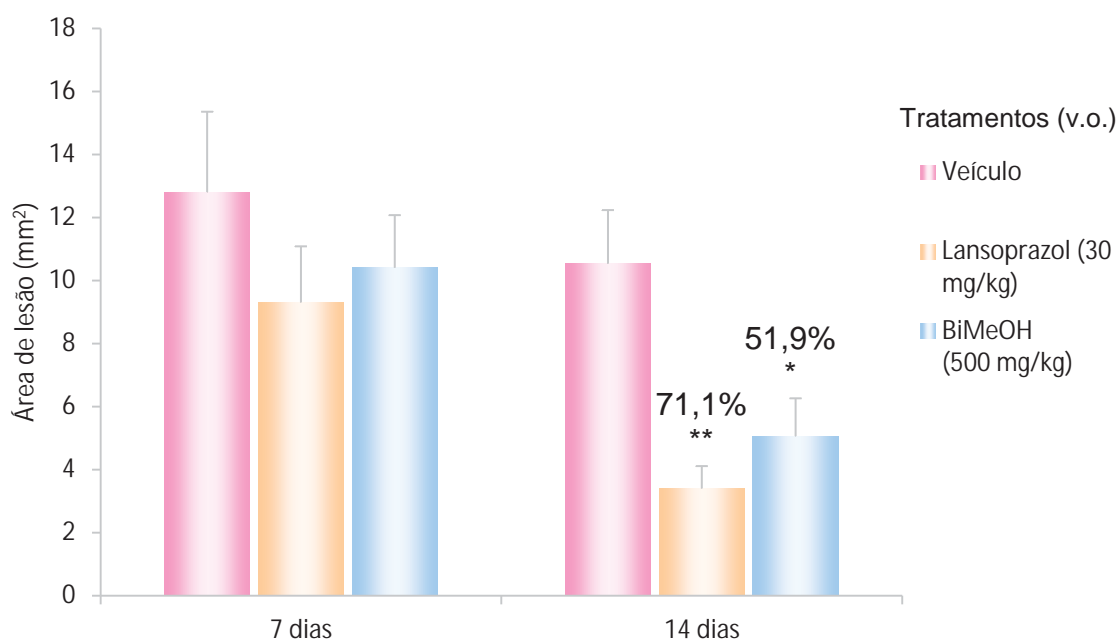


Figura 43. Efeito do tratamento por 7 ou 14 dias com o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera gástrica por ácido acético em ratos. ANOVA $F_{(2,18)} = 0,78$ para área de lesão (7 dias); $F_{(2,19)} = 8,06$ para área da lesão (14 dias), em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em percentagem indicam a proteção em relação ao respectivo veículo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Teste de Dunnet.

Ao avaliar a atividade cicatrizante das partições, foi possível observar que AcoAq não apresentou redução na área de lesão decorridos 7 dias de tratamento. Em contrapartida, o tratamento com AcoEt apresentou aumento de área de lesão,

quando comparado aos demais tratamentos e ao veículo porém este aumento da lesão não foi estatisticamente significativo quando comparado ao grupo tratado com o veículo. Após 14 dias de tratamento, pode-se observar que a partição AcoAq reduziu 72,8% enquanto AcoEt reduziu 34,7% (**figura 44**).

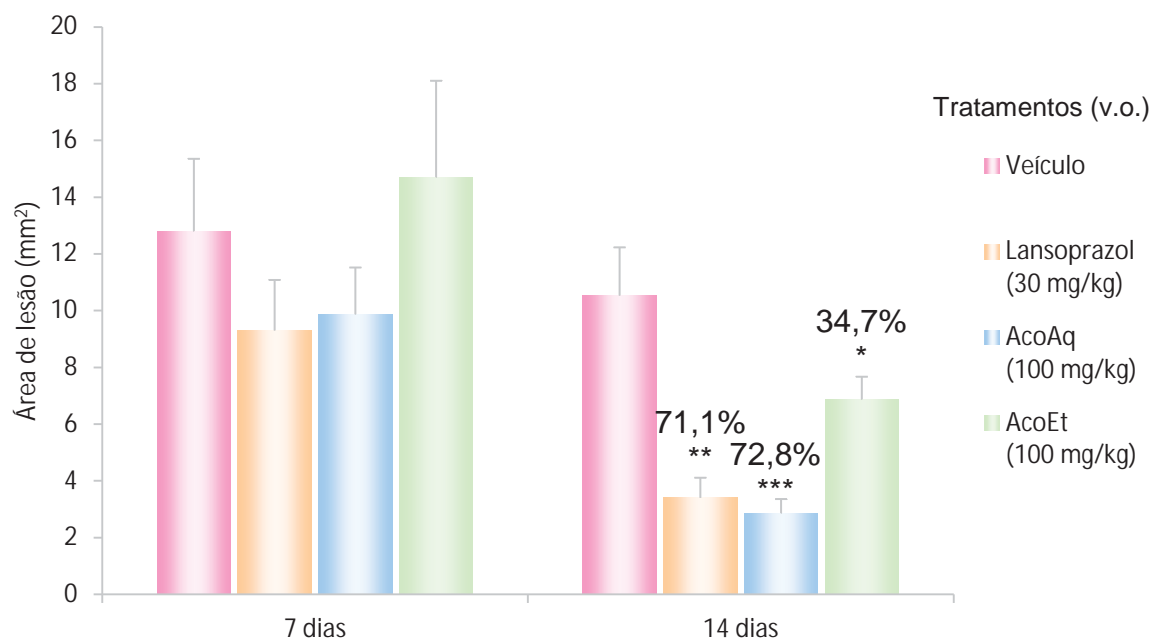


Figura 44. Efeito do tratamento por 7 ou 14 dias com as partições AcoAq e AcoEt após indução de úlcera gástrica por ácido acético em ratos. ANOVA $F_{(3,25)} = 1,11$ para área de lesão (7 dias); $F_{(3,27)} = 11,67$ para área da lesão (14 dias), em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em percentagem indicam a proteção em relação ao respectivo veículo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste de Dunnett.

4.4.3.Ulcera duodenal

Na **figura 45** estão demonstrados os resultados da avaliação da área de lesão duodenal induzida por ácido acético em animais tratados por 7 ou 14 dias.

Decorridos 7 dias do início do tratamento, pode-se verificar significativa diminuição da área de lesão após tratamento com BiMeOH (43.7% de redução) e após 14 dias de tratamento com o extrato, observou-se redução de 48% em relação ao grupo tratado com veículo.

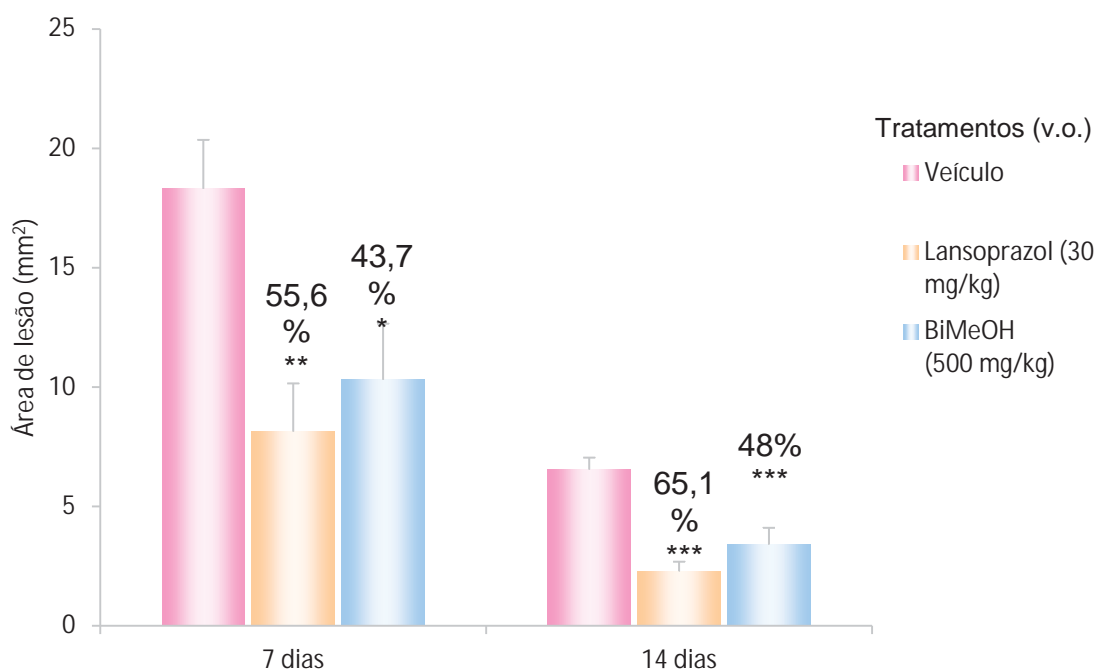


Figura 45. Efeito do tratamento por 7 ou 14 dias com o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia* (BiMeOH) após indução de úlcera duodenal por ácido acético em ratos. ANOVA $F_{(2,17)} = 6,56$ para área de lesão (7 dias); $F_{(2,15)} = 17,3$ para área da lesão (14 dias), em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao respectivo veículo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Teste de Dunnet

Ao analisar a atividade cicatrizante das partições, foi possível observar que após 7 dias de tratamento já ocorreram reduções significantes na área de lesão em ambas partições (**figura 46**). No entanto, após 14 dias de tratamento, AcoEt apresentou uma melhor atividade ao reduzir 68% da área de lesão contra 48.2% de AcoAq.

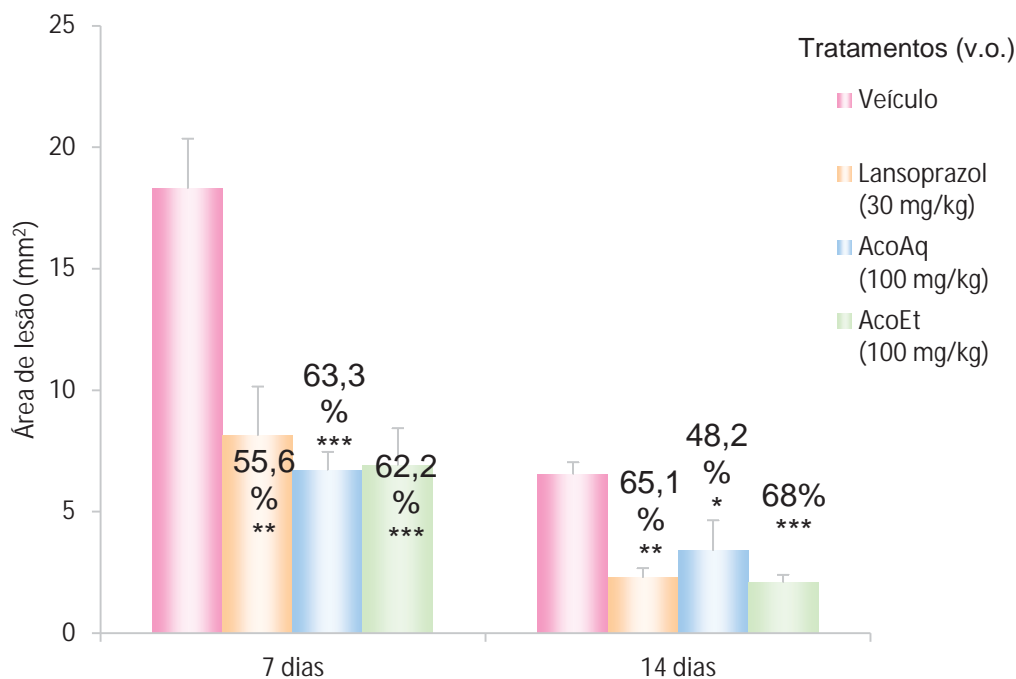


Figura 46. Efeito do tratamento por 7 ou 14 dias com as partições AcoAq e AcoEt após indução de úlcera duodenal por ácido acético em ratos. ANOVA $F_{(3,23)} = 11,09$ para área de lesão (7 dias); $F_{(3,23)} = 7,37$ para área da lesão (14 dias), em comparação com o grupo controle tratado com veículo. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média. Os números em percentagem indicam a proteção em relação ao respectivo veículo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Teste de Dunnet

Na **Figura 47** estão representados os resultados da quantificação de Glutaciona total da mucosa gástrica de animais submetidos à indução de lesão por ácido acético e posterior tratamento por 7 ou 14 dias. Verifica-se que não ocorreram alterações dos níveis de Glutaciona total na mucosa gástrica em nenhum dos períodos avaliados.

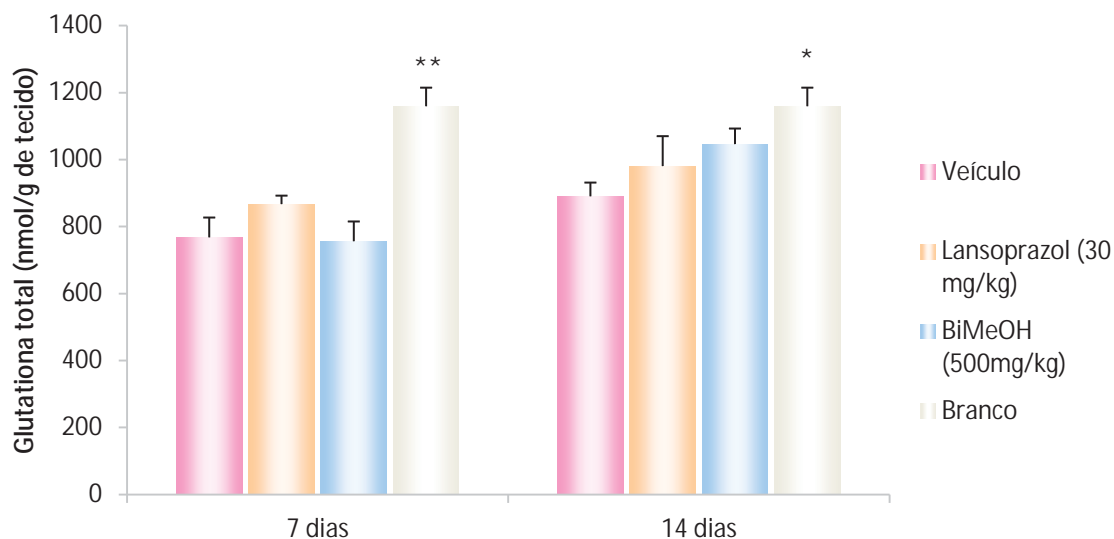


Figura 47. Quantificação dos níveis de GSH na mucosa gástrica após tratamento por 7 ou 14 dias com BiMeOH. ANOVA $F_{(3,19)} = 12,18$ para 7 dias; $F_{(3,21)}=2,77$ para 14 dias. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Teste de Dunnet. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m. as diferenças observadas foram em relação ao respectivo controle.

Na **Figura 48** estão representados os resultados da quantificação de Glutathione total da mucosa gástrica de animais submetidos à indução de lesão por ácido acético e posterior tratamento por 7 ou 14 dias com as partições AcoAq ou AcoEt. Verifica-se que aos 7 dias, os níveis de Glutathione total na mucosa gástrica não apresentam qualquer diferença estatística com o grupo controle tratado somente com o veículo. Porém, decorridos 14 dias de tratamento, observou-se que tanto AcoAq quanto AcoEt apresentaram níveis significativamente aumentados de Glutathione, igualando-se aos animais denominados Branco, que não foram submetidos a processo cirúrgico ou tratamento durante este período.

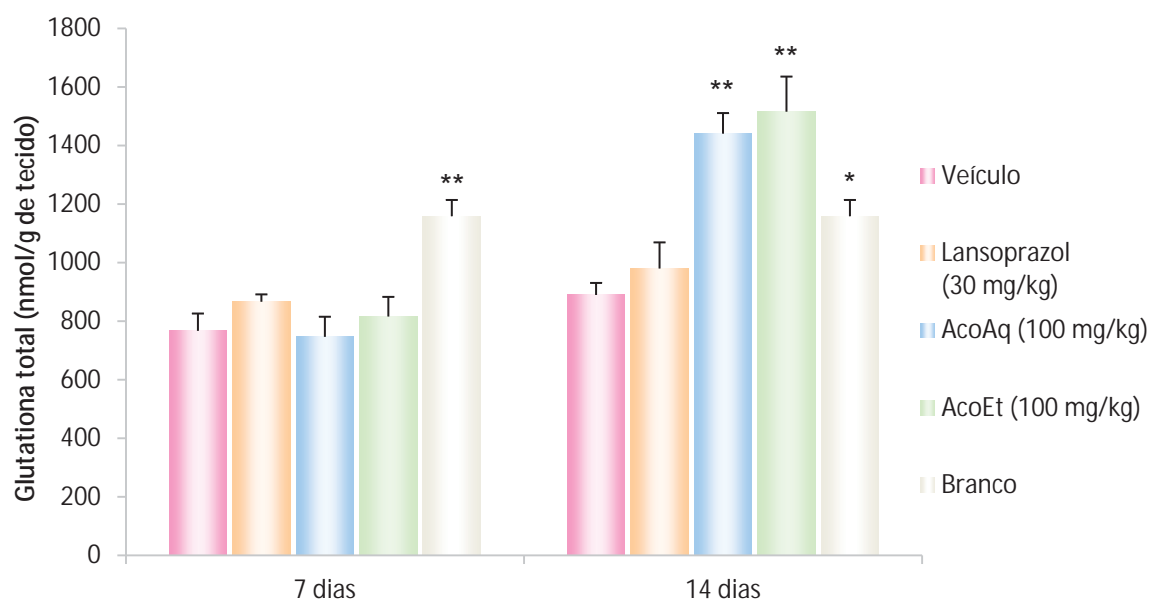


Figura 48. Quantificação dos níveis de GSH na mucosa gástrica após tratamento por 7 ou 14 dias com AcoAq ou AcoEt. ANOVA $F(4,25) = 7,22$ para 7 dias; $F(4,27)=10,86$ para 14 dias. * $p<0.05$; ** $p<0.01$. Teste de Dunnet. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m. as diferenças observadas foram em relação ao respectivo controle.

Na **figura 49** estão mostrados os resultados dos animais com lesão duodenal por ácido acético e tratados com BiMeOH por 7 ou 14 dias. Os níveis de Glutathiona total não apresentaram alterações.

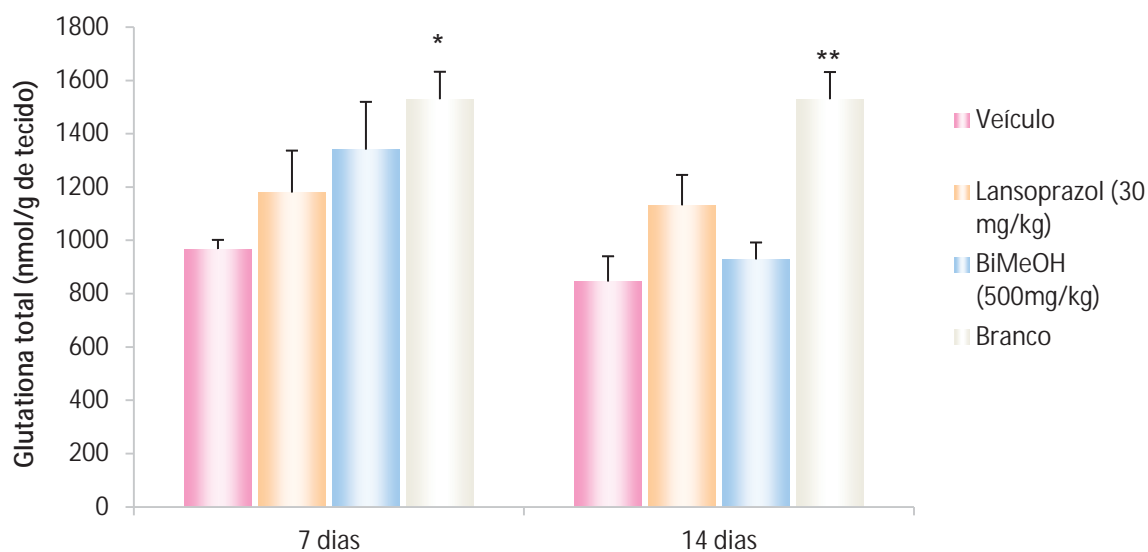


Figura 49. Quantificação dos níveis de GSH na mucosa duodenal após tratamento por 7 ou 14 dias com BiMeOH ANOVA $F(3,19) = 3,09$ para 7 dias; $F(3,19)=9,51$ para 14 dias. * $p<0.05$; ** $p<0.01$. Teste de Dunnet. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m. as diferenças observadas foram em relação ao respectivo controle.

Na **figura 50** estão mostrados os resultados dos animais com lesão duodenal por ácido acético e tratados com as partições AcoAq e AcoEt. Apenas AcoEt apresentou aumento significativo dos níveis de glutatona total, em relação ao grupo controle após 7 ou 14 dias de tratamento.

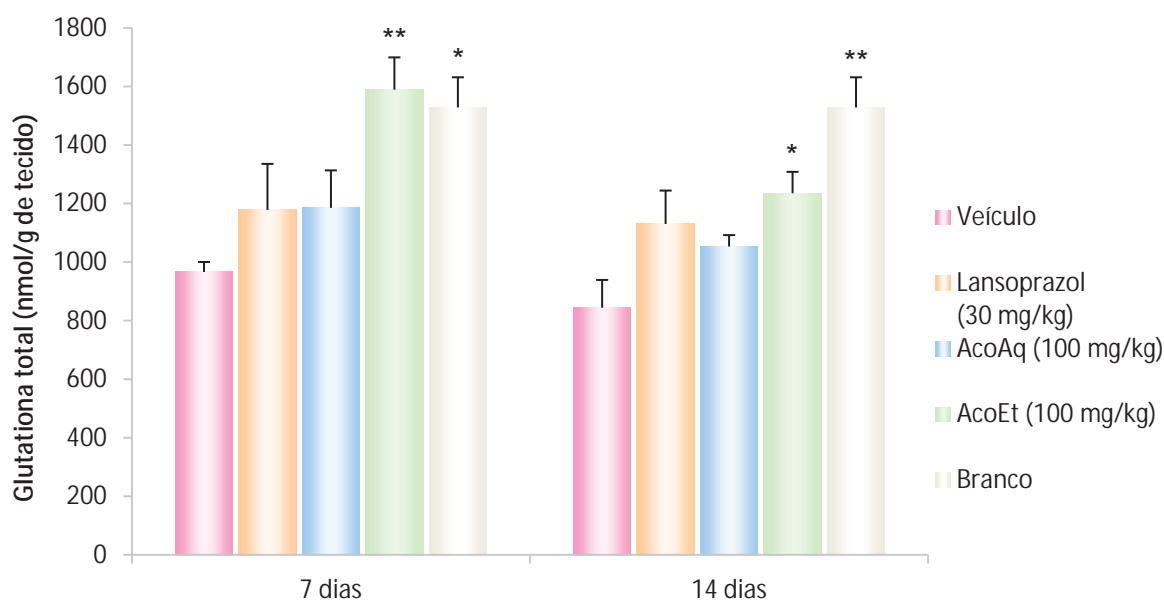


Figura 50. Quantificação dos níveis de GSH na mucosa duodenal após tratamento por 7 ou 14 dias com AcoAq ou AcoEt. ANOVA $F_{(4,24)} = 9,67$ para 7 dias; $F_{(4,24)}=7,67$ para 14 dias. * $p<0.05$; ** $p<0.01$. Teste de Dunnet. As barras transversais representam os valores de média e e.p.m. as diferenças observadas foram em relação ao respectivo controle.

4.4.4. Discussão

A partir da análise macroscópica das lesões, verificamos que uma administração única com AcoAq ou AcoEt não foram suficientes para diminuir o efeito lesivo do processo isquemia-reperfusão, no entanto, decorridos 6 dias de

tratamento, foi possível observar que tanto o tratamento com BiMeOH quanto com AcoEt atenuaram o dano gástrico, reduzindo significativamente a área de lesão. Ao avaliar os níveis de glutathione, no entanto, foi possível observar que apenas as partições apresentaram aumento no nível deste componente antioxidante. Kitano *et al.*, (2005) mostraram que após a re-oxigenação da mucosa gástrica, as lesões são aumentadas em relação a aquelas ocasionadas no período de isquemia (Campos e Yoshida, 2004). A utilização de compostos antioxidantes e os varredores de radicais livres têm se mostrado benéfica em animais expostos a este processo (Derin *et al.*, 2004; Derin *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 1994).

Flavonóides são compostos naturais polifenólicos encontrados em vegetais e frutas, apresentando potente efeito antioxidante em uma variedade de modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando oxidantes endógenos ou exógenos (Gao *et al.*, 1999;. Haramaki *et al.*, 1994; Sakano *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Especificamente, os flavonóides têm sido investigados por sua capacidade de prevenir lesões causadas por oxidantes após o processo de isquemia-reperfusão, (Pataki *et al.*, 2002;. Sato *et al.*, 2001). Nossos resultados demonstram, que além de prevenir as lesões causadas pela isquemia-reperfusão, os flavonóides presentes em AcoEt apresentam a capacidade de reverter os danos deste processo.

AcoEt apresenta em sua constituição, majoritariamente flavonóides derivados de quercetina, que já vem sendo descritos como compostos antioxidantes (Czinner *et al.*, 2001). A atividade antioxidante destes compostos dá-se principalmente pelas suas propriedades de óxido-redução, aos quais podem desempenhar importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio ou decompondo peróxidos. Alguns estudos têm apresentado que o consumo de compostos antioxidantes na dieta diária pode vir a produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos, que naturalmente ocorrem

no organismo. Várias doenças entre as quais, câncer, aterosclerose, artrite, doenças coronárias, entre outras, podem estar ligadas a danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Brenna e Pagliarini, 2001, Yldirim *et al.*, 2002). Sob a ótica nutricional, os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Rahua *et al.*, 2000), além de reduzirem as tendências a doenças trombóticas. Os efeitos farmacológicos e bioquímicos dos flavonóides são muito vastos, destacando as ações antioxidantes, antiinflamatória, antiplaquetária, antialérgico, além da possibilidade de inibirem enzimas como as cicloxigenases, prostaglandina sintetase, lipoxigenase também podem induzir enzimas do sistema desintoxicante (Kool e Suhaila, 2001).

A lesão aguda na mucosa gástrica é relatada como resultado da diminuição do fluxo sanguíneo e as alterações na microvascularização gástrica causando lesões devido à isquemia/reperfusão. A disfunção microvascular, ativação de neutrófilos e espécies reativas de oxigênio, que são formados pela restauração do fluxo sanguíneo através da reperfusão, provocam a morte celular e lesão na mucosa através aumento de peroxidação lipídica e os efeitos nocivos do ácido gástrico (Derin *et al.*, 2004). A Mieloperoxidase (MPO) é a maior proteína de neutrófilos, armazenada em granulos azurofílicos e liberada durante a fagocitose de células ativadas. Pode ser utilizada como um índice quantitativo e sensível de acumulação de neutrófilos no tecido reperfundido (De Gusmao *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 1997). A isquemia leva à ativação de leucócitos e os neutrófilos ativados secretam ERO e ácido hipocloroso, estes derivados tóxicos apresentam um efeito destrutivo sobre os tecidos (Hayashi *et al.*, 2004). Ao quantificar MPO no tecido gástrico após tratamento único com AcoAq ou AcoEt, verificamos que não ocorreram alterações significativas entre os tratamentos, o que corroboram com os

achados macroscópicos. Após 6 dias de tratamento, observamos que tanto BiMeOH quanto AcoEt apresentaram níveis reduzidos de MPO. Novamente, os resultados encontrados na análise macroscópica coincidem com os achados da quantificação bioquímica e sugerem que os compostos presentes em AcoEt sejam responsáveis por esta ação no extrato BiMeOH.

Outra análise feita neste trabalho foi a avaliação dos níveis de TNF- α na mucosa gástrica dos animais submetidos à isquemia-reperfusão e tratados por 24h ou 6 dias depois da indução da lesão.

Fatores de transcrição são ativados pelas células envolvidas na isquemia, dos quais o factor nuclear kappa β (NF-K β) tem destaque por induzir a expressão de citocinas importantes como o fator α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas pró-inflamatórias (IL-1a e 1b, IL-6 e 8). Uma ativação coordenada desses mediadores químicos garante a efetividade da resposta inflamatória. O TNF- α é um importante fator inflamatório com uma ampla gama de efeitos biológicos, tais como a inflamação e apoptose, entre outros (Bemelmans *et al.*, 1996; Szlozarek, 2006). Está bem demonstrado que durante a isquemia, TNF- α é intensamente expresso (Shames *et al.*, 2002; Hassanzadeh *et al.*, 2006), sabendo-se também que a liberação de TNF- α no início do curso da isquemia contribui para a lesão do tecido (Zhang *et al.*, 2005). Os dados mostram que AcoEt foi efetiva em reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β após 6 dias de tratamento, indicando, participação desta via de ação para manutenção da integridade da mucosa gástrica após a isquemia-reperfusão. Nesta avaliação, o extrato BiMeOH apresentou redução apenas dos níveis de IL-1 β .

Outro componente avaliado foi a IL-10 na atividade curativa de *B. intermedia* após o processo isquêmico.

A resposta inflamatória sistêmica pode ocorrer após septicemia ou endotoxemia, assim como depois de eventos não infecciosos como trauma grave ou lesões por isquemia-reperfusão. Uma cascata de eventos, incluindo produção de citocinas pró-inflamatórias, extravasamento, produção de mediadores, coagulação, fibrinólise e alterações nos parâmetros hemodinâmicos e de permeabilidade vascular podem levar à coagulação intravascular disseminada, falência múltipla de órgãos e morte (Volk *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2001).

A IL-10 é uma citocina antiinflamatória que inibe a síntese de vários mediadores inflamatórios normalmente secretados por monócitos/macrófagos ativados, tais como IL-1 α e β , ILs do tipo 6, 8, 12, 18, GM-CSG (fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos), TNF- α , LIF (fator inibidor da leucemia), PAF (fator ativador de plaquetas), quimiocinas e PGE2 (prostaglandina E2), entre outros (Fiorentino *et al.*, 1991; Mocellin *et al.*, 2003), além de aumentar a expressão de seus antagonistas naturais, indicando que a IL-10 não apenas desativa os monócitos mas também induz a produção de moléculas antiinflamatórias (Moore *et al.*, 2001).

Os resultados demonstram que tanto as partições quanto o extrato BiMeOH aumentaram os níveis de IL-10 no tecido gástrico, quando comparados ao grupo veículo, após 6 dias de tratamento, no entanto, o aumento foi mais evidente para AcoEt. De acordo com Yohidome *et al.* (1999), a IL-10 suprime injúrias causadas pela isquemia-reperfusão hepática e Welborn *et al.*, (2003) demonstraram que a IL-10 exógena resultou numa diminuição na infiltração de neutrófilos no pulmão após processo de isquemia-reperfusão visceral, em camundongos nocaute para IL-10, sugerindo que os efeitos benéficos da IL-10 pode ser mediada pela inibição da citocina IL-1 β , dados que estão de acordo com os resultados obtidos em nossas

investigações, visto que AcoEt diminuiu os níveis de TNF- α e IL-1 β , como observado anteriormente.

O modelo de cicatrização das úlceras gástricas induzida por ácido acético foi estabelecido há mais de 40 anos atrás (Takagi *et al.*, 1969), e tem sido usado para o estudo de mecanismos subjacentes de cicatrização de úlceras pépticas para caracterização de drogas antiúlceras que aceleram a cicatrização da mucosa (Okabe *et al.*, 1971; Konturek *et al.*, 2002; Chai e Tarnawski, 2002). Segundo Okabe e Agamase (2005), este modelo é o que mais se aproxima da úlcera gástrica humana. O processo de cicatrização consiste, de maneira geral, em migração celular, proliferação, re-epitelização, angiogênese e deposição de matriz celular (Tarnawski, 2005), eventos que são regulados por diversos fatores, como prostaglandinas, óxido nítrico, dentre outros (Tsukimi e Okabe, 2001). Apesar da semelhança do modelo experimental com o humano, a reprodutibilidade e padronização da área de lesão através desta técnica é muito variável e muitas vezes os dados gerados comprometem a avaliação do processo de cicatrização. Portanto, outras técnicas experimentais foram realizadas em nosso laboratório. Dentre elas, as induzidas pelo contato do tecido com uma solução de ácido acético em uma região pré-definida por um tubo plástico de 4,2 mm de diâmetro interno que é firmemente aplicado à superfície serosa da parede do estômago ou duodeno Okabe *et al.*,(1971) e modificada por Konturek *et al.*,(1988). Através desta técnica foi possível realizar análises macroscópicas das lesões após 7 ou 14 dias de tratamento com BiMeOH, AcoAq e AcoEt. Segundo Schmassmann (1998), o processo de cicatrização das úlceras pode ser dividido em 3 fases: de 0 a 3 dias, tem-se a fase do desenvolvimento da úlcera com necrose do tecido, implantação da úlcera, infiltração inflamatória e formação da margem da úlcera; entre 3 e 10 dias, tem-se a fase rápida da cicatrização, envolvendo migração de células

epiteliais e contração da base da úlcera; e entre 10 e 20 dias, ocorre a fase lenta da cicatrização, que compreende angiogênese, remodelação dos tecidos de granulação e completa re-epitelização da cratera da úlcera. Portanto, nosso protocolo atingiu duas fases distintas do processo ulcerogênico, a fim de verificar a atuação de BiMeOH, AcoAq e AcoEt tanto na fase rápida quanto na fase lenta de cicatrização.

Nossos resultados apontam que decorridos 7 dias de tratamento com o extrato e as partições, nenhum dos tratamentos foi capaz de diminuir a área de lesão gástrica. No entanto, BiMeOH e AcoAq apresentaram uma tendência à diminuição de área, enquanto AcoEt foi capaz de aumentar a área lesionada. Esse aumento da área lesionada pode estar relacionada com a grande quantidade de polifenóis na constituição de AcoEt, principalmente pela presença de flavonóides. Trabalhos recentes apontam que diversos fatores, como concentração de polifenóis, baixos níveis de antioxidantes nos meios celulares, presença de íons metálicos, temperatura e pH interferem na estabilidade das moléculas dos polifenóis, levando a formação de quinonas, semiquinonas, ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, que promovem efeitos pró-oxidativos nos tecidos (Sang *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2007; Sang *et al.*, 2005; Awad *et al.*, 2001). Após 14 dias de tratamentos, foi possível observar uma melhora significativa para AcoAq, indicando assim, que AcoAq atua na fase lenta do processo de cicatrização. BiMeOH e AcoEt também apresentaram redução da lesão gástrica, porém com menor significância.

Ao proceder com a mesma avaliação no tecido duodenal, pode-se verificar que após 7 dias da indução da lesão, todos os tratamentos diminuíram a área danificada do duodeno. Decorridos 14 dias, essa atividade ficou mais evidente para AcoEt, no entanto AcoAq e BiMeOH apresentaram atividade cicatrizante, de forma

menos evidente. As lesões duodenais foram instaladas aproximadamente a 5 mm abaixo do piloro. A mucosa do duodeno proximal é o único epitélio que fica exposto ao ácido gástrico, como por um “vazamento”, visto que as junções intercelulares criam uma barreira incompleta à difusão do ácido, desse modo, mecanismos de defesa não-estruturais, tais como secreção de muco, secreção de bicarbonato e o fluxo sanguíneo são de primordial importância na defesa do ácido luminal. Por esta razão, a ocorrência de dano lesivo nessa região torna-se mais comum na falha de um destes agentes de defesa da mucosa (Flemstron e Isenberg, 2001; Kaunitz e Akiba, 2002).

O sucesso da terapêutica utilizada para prevenir ou curar as lesões ulcerativas não dependem somente dos bloqueadores de secreção de ácido existentes no mercado, mas também dependem de estimular os promotores que fortalecem a mucosa duodenal, entre estes estão fatores endógenos como as prostaglandinas, gastrina, glutathione, fatores de crescimento epidermal, óxido nítrico e compostos sulfidrilicos (Natale *et al.*, 2004). De acordo com Brown e Tepperman (1997) e Venkova e Krier (1994) são muitos os efeitos do óxido nítrico na função intestinal, como a regulação da secreção de muco gástrico e bicarbonato e manutenção da integridade epitelial. Verificamos que o óxido nítrico e grupamentos sulfidrílicos tem papel importante a gastroproteção de *B. intermedia*. O bloqueio destes fatores reverteu a ação gastroprotetora de BiMeOH, AcoAq e AcoEt (resultados anteriores), indicando que os taninos condensados, concentrados na partição AcoAq e os flavonóides, concentrados na partição AcoEt presentes em BiMeOH atuam estimulando estes fatores promotores do fortalecimento da mucosa gástrica e possivelmente também da mucosa duodenal.

Após análise macroscópica das lesões nos diferentes modelos experimentais, acima apresentados, seguiu-se com a quantificação dos níveis de

glutathione total nos tecidos. Sabe-se que a glutathione é um componente antioxidante endógeno e que sua propriedade antioxidante é relacionada com a presença do grupo tiol em sua estrutura. A glutathione está presente no organismo em duas formas; reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Meister e Anderson, 1983). A glutathione reage com peróxidos e radicais de oxigênio tóxicos para proteger células contra danos e também mantém grupos SH de proteína em sua forma reduzida, protegendo da oxidação (Walker *et al.*, 1995)

Ao longo dos anos vários estudos têm apoiado o papel fundamental da glutathione em alguns processos fisiopatológicos (Cotgreave e Gerdes, 1998; Klatt e Lamas, 2000; Fratelli *et al.*, 2002). A glutathione tem duas características estruturais: uma ligação glutamílica e um grupo sulfidrílico. Essas partes do tripeptídeo parecem facilitar a sua participação em um número impressionante e uma variedade de funções, como na desintoxicação do peróxido de hidrogênio, outros peróxidos e radicais livres. Derivados análogos da glutathione são formados com metabólitos endógenos, por exemplo, no metabolismo de leucotrienos, prostaglandinas, esteróides e melaninas (Meister e Larsson, 1989).

A glutathione não só protege as membranas celulares do dano oxidativo, mas também ajuda a manter os grupos sulfidrílicos de muitas proteínas na forma reduzida, um requisito para sua função normal. Danos celulares irreversíveis sobrevivem quando a célula já não é capaz de manter seu conteúdo de glutathione reduzida (Reed e Faris, 1994). No tecido estomacal, enquanto a diminuição dos níveis de glutathione causa um dano gástrico, níveis crescentes de glutathione produzem um efeito gastroprotetor (Naito *et al.*, 1993; Hirota *et al.*, 1989). Os níveis de glutathione total apresentaram-se iguais ao do controle negativo após 7 dias

de tratamento no tecido gástrico; porém, ao quantificar os níveis totais de glutathione decorridos 14 dias de tratamentos, pode-se verificar aumento significativo para as partições AcoAq e AcoEt, mostrando a participação deste importante componente antioxidante para *B. intermedia* no combate ao dano gástrico induzido pelo ácido acético. Já no tecido duodenal, apenas AcoEt aumentou os níveis de glutathione total após 7 ou 14 dias de tratamento, sugerindo que BiMeOH e AcoAq possam atuar por outras vias, já que neste mesmo período, extrato e partição reduziram a área de lesão, sem alterar os níveis de glutathione total. De acordo com Chan e Leung (2002) e Sonnenberg e Everhart (1997) a úlcera duodenal apresenta forte associação com infecção por *H. pylori* e segundo Wang *et al.* (2001), pacientes infectados por esta bactéria apresentam baixos níveis de glutathione, assim como pacientes com úlcera gástrica, duodenal ou idosos, apresentam níveis reduzidos de glutathione na mucosa gástrica.

4.5. Atividade antidiarreica

4.5.1. Indução de diarreia por óleo de rícino – modelo preventivo

Na avaliação da ação antidiarrêica do BiMeOH, observamos significativa redução das evacuações causadas pelo agente catártico (**Tabela 9**) para BiMeOH. O tratamento com o extrato foi capaz de retardar o início das evacuações aquosas de modo significativo.

Tabela 9. Efeito do extrato metanólico (BiMeOH) e das partições AcoEt e AcoAq de *B. intermedia* no modelo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Início da diarreia (min)	Classificação da Evacuação			Inibição [#] (%)
			Sólido	Semi- Sólido	Líquido	
Veículo	-	74,1 ± 16,3	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,4	3,9 ± 0,5	-
Loperamida	5	220,8 ± 19,2 **	0,0 ± 0,0 **	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5 **	87,2
BiMeOH	500	167,0 ± 30,8 *	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,4	0,9 ± 0,6 *	76,9

ANOVA $F_{(2,30)} = 8,55$ para Início da diarreia. ANOVA $F_{(4,30)} = 7,39$ para Sólido; ANOVA $F_{(4,30)} = 2,75$ para Semi-Sólido, ANOVA $F_{(4,30)} = 6,22$ para Líquido; ANOVA $F_{(4,30)} = 9,45$ para IE. Teste de Dunnett $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$. # Em relação ao IE.

Em continuidade, foi realizado o mesmo procedimento com as partições, na mesma dose que apresentou efetividade na úlcera. Na **tabela 10** é possível observar que as partições não foram eficientes na redução da diarreia causada pelo óleo de rícino.

Tabela 10. Efeito das partições AcoEt e AcoAq de *B. intermedia* no modelo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Início da diarreia (min)	Classificação da Evacuação			Inibição [#] (%)
			Sólido	Semi- Sólido	Líquido	
Veículo	-	34.4 ± 11.0	1.1 ± 0.4	1.4 ± 0.3	5.0 ± 0.7	-
Loperamida	5	219.9 ± 29.3 **	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	94.0
AcoEt	100	133.0 ± 28.9	0.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.8 ± 0.6	44
AcoAq	100	119.9 ± 32.2	1.3 ± 0.3	2.0 ± 0.6	2.6 ± 0.6	48

ANOVA $F_{(3,23)} = 5,48$ para Início da diarreia. Teste de Dunnett ** $p < 0.01$. Pra classificação das evacuações e cálculo de IE, Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. *** $p < 0.001$ # Em relação ao IE.

Em vista destes resultados, foi realizado um novo experimento com o que seriam as doses complementares de AcoAq e AcoEt no extrato. A partir dos resultados do rendimento de cada partição, verificou-se que AcoAq corresponderia a 70,67% do extrato BiMeOH. Assim, nos 500 mg de extrato de BiMeOH, 353,35 mg corresponderia à partição AcoAq e 146,65 mg, à partição AcoEt. Na **tabela 11** é possível observar que apenas a partição AcoAq foi capaz de apresentar redução no início da diarreia e também de reduzir de modo significativo o efeito do agente catártico, reduzindo significativamente as evacuações líquidas. Com este resultado foi possível verificar que os compostos que apresentam efeito antidiarrêico estão presentes apenas na partição AcoAq.

Tabela 11. Efeito das partições AcoEt e AcoAq de *B. intermedia* no modelo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Início da diarreia (min)	Classificação da Evacuação			Inibição [#] (%)
			Sólido	Semi-Sólido	Líquido	
Veículo	-	74.1 ± 16.3	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.4	4.1 ± 0.5	-
Loperamida	5	220.8 ± 19.2 **	0.0 ± 0.0 *	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.5 **	87,8
AcoEt	146.65	66.1 ± 16.4	1.1 ± 0.14	1.6 ± 0.4	3.7 ± 1.1	9,7
AcoAq	353.35	169.6 ± 23.6 *	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5 **	87,8

ANOVA $F_{(3,26)} = 8,55$ para Início da diarreia. Teste de Dunnett $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$. Pra classificação das evacuações e calculo de IE, Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ # Em relação ao IE.

A partir destes resultados, foi realizado novo ensaio experimental com a partição AcoAq, na tentativa de encontrar a menor dose efetiva com atividade antidiarrêica (tabela 12). Os resultados demonstram, que, apesar da dose de 180

mg/kg conseguir retardar o início das fezes líquidas, a mesma dose não foi capaz de diminuir o número de evacuações aquosas ou semi-sólidas observado nos animais tratados com loperamida. Já a dose de 250 mg/kg retardou o início das fezes aquosas bem como diminuiu o número das mesmas de forma significativa quando comparada ao controle.

Tabela12. Efeito de AcoAq em diferentes doses no modelo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Início da diarreia (min)	Classificação da Evacuação			Inibição [#] (%)
			Sólido	Semi-Sólido	Líquido	
Veículo	-	71.0 ± 8.5	1.1 ± 0.5	1.4 ± 0.4	4.4 ± 0.3	-
Loperamida	5	238.9 ± 0.9 **	0.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0**	0.3 ± 0.2 ***	93,2
AcoAq	180	131.9 ± 16.3 **	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.3	2.4 ± 0.5	45,5
AcoAq	250	198.13 ± 10.8 **	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.4 **	70,5

ANOVA F(3,27)=37,1 para Início da diarreia **p<0.001, Teste de Dunnet. Pra classificação das evacuações e calculo de IE, Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 # Em relação ao IE.

4.5.2. Avaliação da Motilidade Intestinal

Na **Figura 51** foram apresentados os dados de trânsito intestinal dos animais previamente tratados com BiMeOH e as porções AcoEt e AcoAq. Os resultados indicam que não houve interferência desse extrato e de suas partições na motilidade intestinal quando comparado com o grupo controle negativo tratado com o veículo. Somente os animais tratados com morfina reduziram de modo significativo o trânsito intestinal.

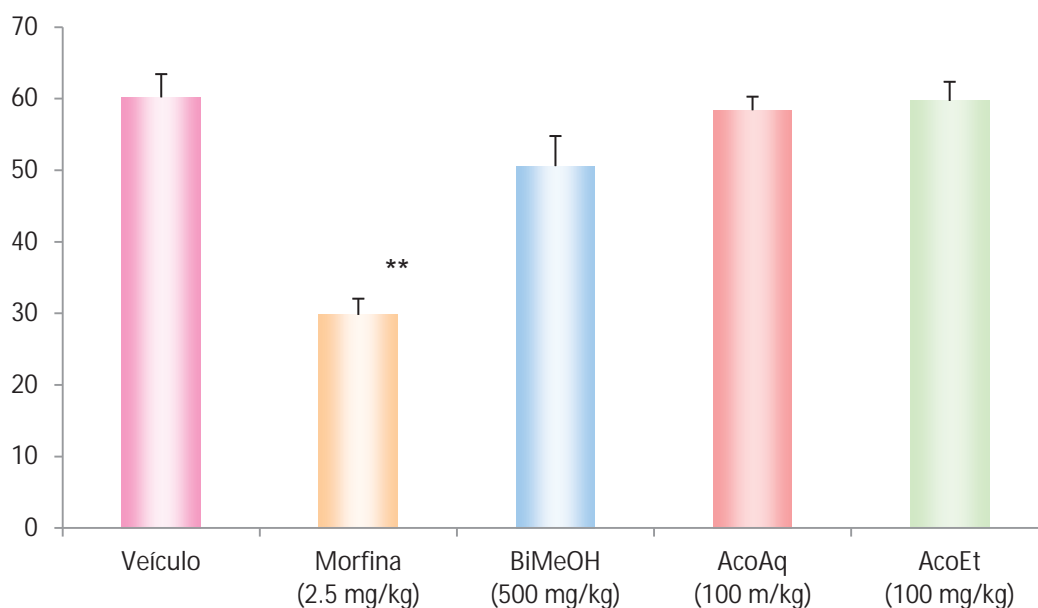


Figura 51. Efeito do extrato metanólico de *B. intermedia* e das porções Acetato de Etila (AcoEt) e Aquosa (AcoAq) sobre a motilidade intestinal de camundongos com a utilização de carvão ativado. ANOVA: $F_{(4,31)}=8,79$. Teste de Dunnett. ** $p<0.01$. As barras transversais representam os valores de média \pm erro padrão da média.

4.5.3. Avaliação do acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino em camundongos.

Neste modelo, verificou-se que BiMeOH (500 mg/kg) foi capaz de reverter o acúmulo de fluido intestinal promovido pela administração do óleo de rícino. (Tabela 13).

Tabela 13. Efeito do extrato BiMeOH e da partição AcoAq de *B. intermedia* no acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino.

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Fluido Acumulado (g)	Inibição (%)
Veículo	-	1.48 \pm 0.1	-
Morfina	10	0.77 \pm 0.7**	47.9
BiMeOH	500	1.09 \pm 0.1*	26.3

ANOVA $F_{(2,19)}=9,44$ para salina; Teste de Dunnett * $p<0.05$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$

Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação antidiarrêico de *B. intermedia*, o extrato BiMeOH foi avaliado no modelo de acúmulo intestinal na presença do antagonista opioide naloxona (**tabela 14**). É possível observar que BiMeOH é capaz de reduzir o acúmulo de fluido intestinal de modo significativo (36%) quando comparado ao grupo controle. Ao pré-tratar os animais com naloxona, um antagonista competitivo opioide não-seletivo, é possível verificar que ocorreu reversão total do efeito de BiMeOH.

Tabela 14. Efeito do extrato metanólico de *B. intermedia* no modelo de acúmulo de fluido intestinal em camundongos.

Pré-tratamento (i.p.)	Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Fluido intestinal (g)	Inibição (%)
	Veículo	-	1.45 ± 0.1	-
Salina	Morfina	10	0.75 ± 0.6 **	48%
	BiMeOH	500	0.93 ± 0.1 **	36%
Naloxona (30 mg/kg)	Veículo	-	1.36 ± 0.1	-
	Morfina	10	1.37 ± 0.1 ^{##}	0%
	BiMeOH	500	1.61 ± 0.1 ^{##}	0%

Resultados expressos em média ± epm. ANOVA seguido por teste de Dunnett. Fluido intestinal **p<0.01 representa diferença em relação ao grupo controle tratado com veículo; ## p<0.01 representa diferença em relação aos pré-tratamentos salina + tratamento e naloxona + tratamento.

Na **tabela 15** estão os resultados da análise da partição aquosa AcoAq no acúmulo de fluido intestinal de camundongos tratados com óleo de ricino. AcoAq reduziu o acúmulo de fluido intestinal de modo significativo. Verifica-se que a prévia administração de naloxona também é capaz de reverter a atividade da partição aquosa, bem como foi observado para o extrato metanólico.

Tabela 15. Efeito do tratamento com a partição AcoAq de *B. Intermedia* no modelo de acúmulo de fluido intestinal em camundongos

Pré-tratamento (i.p.)	Tratamento (v.o.)	Dose (mg/kg)	Fluido intestinal (g)	Inibição (%)
Salina	Veículo	-	1.47 ± 0.1	-
	Morfina	10	0.83 ± 0.0 **	44%
	AcoAq	250	1.01 ± 0.1 **	31,6%
Naloxona (30 mg/kg)	Veículo	-	1.73 ± 0.2	-
	Morfina	10	1.26 ± 0.0 ##	27,2%
	AcoAq	250	1.54 ± 0.1 ##	11,1%

Resultados expressos em média ± epm. ANOVA seguido por teste de Dunnett. Fluido intestinal: **p<0.01 representa diferença em relação ao grupo controle tratado com veículo; ## p<0.01 representa diferença em relação aos pré-tratamentos salina + tratamento e naloxona + tratamento.

4.5.4. Modelo de reversão de diarreia por óleo de rícino

Uma vez que extrato e partição apresentaram atividade frente ao agente catártico, diminuindo a ação do mesmo, foi desenvolvido outro protocolo experimental a fim de desafiar BiMeOH e AcoAq quanto à sua efetividade na diarreia após a instalação da mesma com o óleo de rícino. Na **tabela 16** estão apresentados os resultados do modelo curativo de diarreia. Pode-se verificar que BiMeOH não foi capaz de retardar de modo significativo o início da diarreia, no entanto, reduziu o número de evacuações líquidas promovidas pelo agente catártico. Resultado semelhante foi verificado para AcoAq (**tabela 17**), que foi capaz de inibir a formação de fezes líquidas sem conseguir retardar o seu surgimento.

Tabela 16. Efeito do extrato metanólico (BiMeOH) de *B. intermedia* no modelo curativo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Início da diarreia (min)	Classificação da Evacuação			Inibição [#] (%)
			Sólido	Semi-Sólido	Líquido	
Veículo	-	71.1 ± 5.7	1.5 ± 0.3	0.9 ± 0.3	5.0 ± 0.4	-
Loperamida	5	187.0 ± 28.7 **	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	86 ***
BiMeOH	500	103.4 ± 18.8	1.8 ± 0.4	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.4	56 *

ANOVA $F_{(2,23)} = 8,20$ para Início da diarreia. Teste de Dunnett $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$. Pra classificação das evacuações e calculo de IE, Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. $*p < 0.05$ $***p < 0.001$ [#] Em relação ao IE.

Tabela 17. Efeito da partição AcoAq de *B. intermedia* no modelo curativo de indução de diarreia por óleo de rícino em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Início da diarreia (min)	Classificação da Evacuação			Inibição [#] (%)
			Normal	Semi-Sólido	Líquido	
Veículo	-	58.8 ± 5.7	0.8 ± 0.3	1.7 ± 0.3	5.1 ± 0.3	-
Loperamida	5	140.6 ± 20.4 **	0.2 ± 0.1	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.4	68,6 ***
AcoAq	250	88.5 ± 2.5	0.8 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.3	52,9 **

ANOVA $F_{(2,28)} = 11.73$ para Início da diarreia. Teste de Dunnett $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$. Pra classificação das evacuações e calculo de IE, Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ [#] Em relação ao IE.

4.5.5. Discussão

A diarreia pode ser classificada como aguda ou crônica, sendo a diarreia aguda a forma mais comum da doença, causada geralmente por agentes infecciosos, embora alguns medicamentos, venenos (incluindo toxinas bacterianas)

ou reações inflamatórias possam contribuir para seu desenvolvimento (Thapar e Sanderson, 2004). O óleo de rícino induz a diarreia por causar aumento da secreção de fluídos e eletrólitos no lúmen intestinal através da mucosa intestinal, resultando um acúmulo de fluído e num conteúdo luminal aquoso que flui rapidamente através do intestino (Gaginella, Stewart *et al.*, 1975). A liberação do ácido ricinolêico produz mudanças no transporte de água e eletrólitos, resultando numa resposta hipersecretória e num trânsito intestinal rápido (Hardman e Limbird, 2001). O óleo de rícino aumenta a produção ou liberação de prostaglandinas (Saito *et al.*, 2002), causa mudança na permeabilidade, injúrias na mucosa e estimula a biossíntese de PAF (fator de agregação plaquetário) (Izzo, Gaginella *et al.*, 1998) que pode resultar numa inflamação na mucosa intestinal.

Neste modelo, o extrato BiMeOH e AcoAq apresentaram efeito antidiarrêico. Já AcoEt não foi capaz de inibir as evacuações líquidas causadas pelo agente catártico. Resultados fitoquímicos indicam que AcoAq apresenta em sua constituição química os taninos condensados. Os taninos, bem como flavonóides apresentam atividade antidiarrêica (Galvez, Crespo *et al.*, 1993) e tem como ação a redução da secreção intestinal (Mukherjee, Saha *et al.*, 1998)

A partir dos resultados obtidos no modelo de indução de diarreia, verificou-se que o extrato metanólico de *B. intermedia* foi capaz de diminuir as evacuações aquosas após tratamento com agente catártico e que o mesmo extrato e partição alteraram o início das evacuações aquosas. Optou-se então por realizar o modelo de trânsito intestinal para avaliar a motilidade intestinal destes animais submetidos aos diferentes tratamentos. A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico, a contínua contração, relaxamento e secreção. Essas funções são controladas pelo sistema neuromotor, que é regulado por vários sistemas de receptor, entre eles o opioidérgico, bem como o colinérgico,

adrenérgico e serotoninérgico (Kamm, 2000). Várias drogas afetam o trânsito gastrointestinal pela ação de agonistas ou antagonistas no receptor celular específico (Ghosh, 2005). A atropina, antagonista de receptor muscarínico, tem ação sobre a região antral do estômago, podendo assim reduzir a contratilidade e o esvaziamento gástrico (Parkman, Trate *et al.*, 1999). Neste trabalho não foi observada alteração da motilidade intestinal após administração de BiMeOH, AcoAq ou AcoEt em nenhuma das doses avaliadas. Portanto, a ausência de alterações no trânsito intestinal, juntamente com a ação antidiarrêica do extrato e partição aquosa, justificam a utilização da espécie na medicina popular para o tratamento das diarreias e disenterias.

Propriedades antidiarrêicas e anti-disentéricas de plantas medicinais tem sido sugeridas devido aos taninos, alcalóides, saponinas, flavonóides, esteróis e triterpenos presentes em sua constituição (Longanga Otshudi, Vercruysse *et al.*, 2000); Havagiray *et al.*, 2004). Taninos presentes em plantas antidiarrêicas desnaturam proteínas na mucosa intestinal resultando na redução da secreção (Jia *et al.*, 2008). Outro resultado observado neste trabalho foi a redução do acúmulo de fluido intestinal por parte de BiMeOH e AcoAq. Neste modelo, tanto extrato quanto a partição foram eficientes ao reduzir a formação do acúmulo. Dessa forma, os resultados da diminuição do acúmulo do fluido intestinal após a administração do óleo de rícino no grupo tratado com BiMeOH indicam a participação dos taninos como responsáveis por essa atividade. AcoAq também foi capaz de reduzir o acúmulo de fluido intestinal e sabe-se que essa partição é majoritariamente composta por taninos condensados, o que confirmam os dados de literatura que indicam os taninos como os principais responsáveis por essa atividade em BiMeOH. Ao administrar previamente o antagonista opióide (naloxona) a atividade tanto do extrato quanto da partição foram revertidas. Em vista de recentes

publicações (Moreira *et al.*, 2011; Orlandi *et al.*, 2011) com a espécie *B. intermedia* ressaltando seu potencial antiinflamatório mediado pelo sistema opióide, nossos resultados estão em acordo com esses achados. Uma vez que a hipersecreção intestinal do modelo de acúmulo de fluido envolve uma resposta inflamatória (Izzo, Gagarella *et al.*, 1998), os resultados apontam a via opioidérgica como participante desta ação do extrato BiMeOH e partição AcoAq. Além de inibir a diarreia pela ação do óleo de rícino, tanto BiMeOH quanto AcoAq foram capazes de reverter sua ação no modelo em que foram administrados após o agente catártico. Estes resultados indicam, portanto que BiMeOH e AcoAq são efetivas tanto na prevenção da instalação da diarreia quanto na sua reversão, conferindo assim a *B. intermedia* atividade curativa frente a diarreias agudas, dados que corroboram com a indicação popular desta espécie vegetal.

4.6. Ensaios *in vitro*

4.6.1. Crescimento em *Giardia duodenalis*

Na **Figura 52** estão apresentados os resultados da ação giardicida obtidos com o extrato BiMeOH. Verifica-se que a presença do extrato polar nas diferentes concentrações, foi capaz de inibir o crescimento dos trofozoitos de *G. duodenalis* já a partir da menor concentração do extrato incubado ao meio de cultura. BiMeOH na concentração 500 µg/ml apresentou redução de mais de 99% no crescimento dos trofozoitos já nas primeiras 24h de incubação.

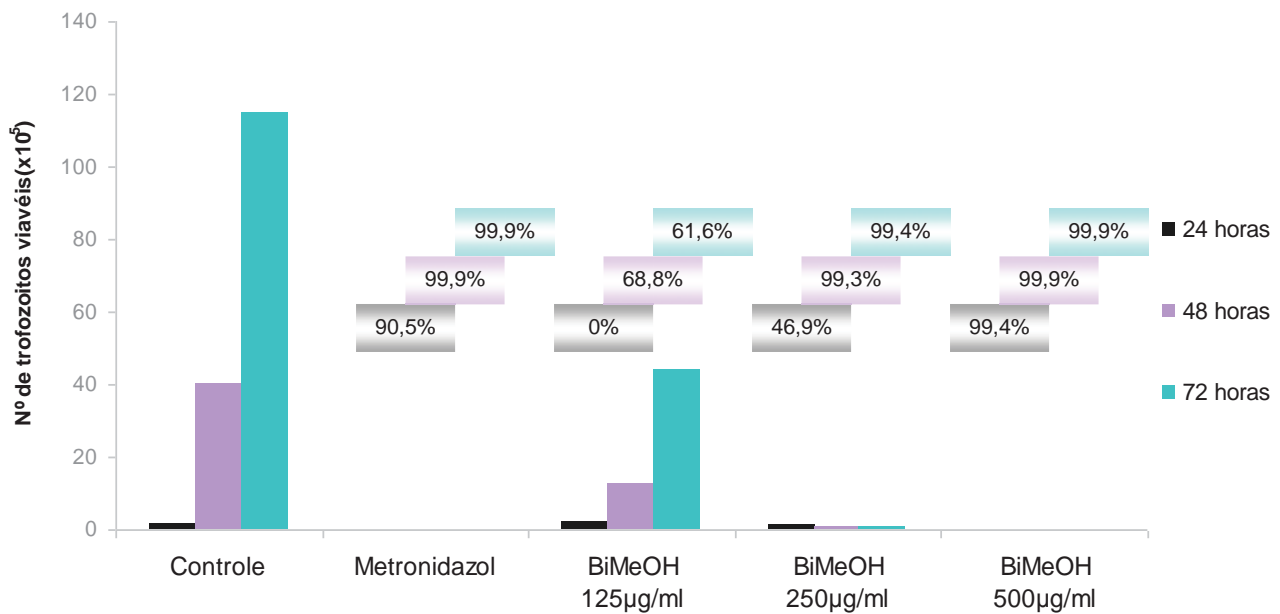


Figura 52. Efeito do extrato BiMeOH de *B. intermedia* no crescimento de trofozoítos de *G. duodenalis*. Os números em porcentagem representam a inibição em relação ao controle.

4.6.2. Avaliação da ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*

Neste modelo, (**tabela 18**) pode-se verificar que ambos os extratos apresentaram reduzidos valores de MIC (concentração inibitória mínima) quando avaliados na presença de *E. coli*. No entanto, BiMeOH mostrou-se mais eficiente ao inibir o crescimento de *S. aureus* com a concentração de 250 µg/ml. BiMeOH também inibiu o crescimento de *H. pylori*, já na menor dose avaliada.

Tabela 18. Efeito do extrato BiMeOH sobre o crescimento em *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*

Espécie	BiMeOH ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	250
<i>Escherichia coli</i>	500
<i>Helicobacter pylori</i>	125

Os números indicam o MIC do extrato nas diferentes avaliações

4.6.3. Discussão

No mundo, a diarreia causa 3,2% de todas as mortes, segundo a Organização Mundial de Saúde (2004). É contínua uma batalha entre o microbiota da flora intestinal normal e invasora. Quando os invasores predominam na microbiota intestinal, infecções podem alterar a barreira intestinal e funções absorptivas podem conduzir para uma rápida diarreia, desidratação, toxicidade no megacolon ou choque podendo ainda, ser fatal. Infecções assintomáticas têm consequências duradouras para crianças em crescimento e desenvolvimento (Guerrant *et al.*, 2002; (Checkley, Buckley *et al.*, 2008). A patogênese da diarreia infecciosa tem sido extensivamente estudada sendo causada por uma variedade de patógenos entéricos incluindo bactérias como as *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholera* e *Campylobacter jejuni*, viroses como os rotavirus, astrovirus, adenovirus e calicivirus e por protozoários, como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium parvum* (Martines *et al.*, 1993; Guerrant & Bobaby, 1991; Bhattacharya, 2000).

A giardíase é causada pelo parasita *Giardia lamblia* (protozoário também conhecido como *G. intestinalis* ou *G. duodenalis*), considerada uma infecção muito comum em humanos, ocorrendo frequentemente em países industrializados ou em desenvolvimento (Eckmann e Gillin, 2001). Acredita-se que a incidência mundial é de 20-60% (Tripathi *et al.*, 1999) com 2-7% de incidente em nações industrializadas (Uperoft *et al.*, 2001). O parasita existe em duas formas, cistos infecciosos, que são resistentes aos fatores ambientais e os trofozoítos que causam a doença, pela colonização do lúmen intestinal, mas sem invadir a mucosa (Eckmann, Laurent *et al.*, 2000). Esta última forma é a responsável pela replicação no trato gastrointestinal bem como pelos sintomas da doença (Adam, 2001), que incluem dor abdominal, náusea, anorexia, diarreia, vômito, flatulência e fadiga (Langford *et al.*, 2002). Uma vez que encistação acontece, o trofozoíto usa seu flagelo para nadar para os microvilos da superfície do duodeno e jejuno (Gardner e Hill, 2001). O mecanismo pelo qual o trofozoíto da *Giardia* induz a diarreia não está bem caracterizado, no entanto, acredita-se que uma combinação de fatores estejam envolvidas como: a) uma perda de eletrólitos no jejuno, água e absorção de 3-O-metil-D-glicose, levando a uma má absorção de fluidos, solutos e eletrólitos (Faubert, 2000); b) danos na borda escovada do intestino e correspondente diminuição da atividade da dissacaridase que pode levar a uma diminuição da quantidade de dissacarídeos no lúmen intestinal, podendo resultar numa diarreia osmótica (Nain *et al.*, 1991); c) aceleração do trânsito intestinal e diminuiu a contratilidade do músculo liso (Hawrelak, 2003); d) uma glicoproteína localizada na superfície de trofozoitos de *Giardia* tem sido responsável pela indução de acúmulo de fluido em íleo de coelho (Kaur *et al.*, 2001). Protozoários, como a *G. duodenalis* rompem a arquitetura absorptiva das vilosidades do intestino delgado (Pawlowski *et al.*, 2009) pela direta infecção ou pela ativação do epitélio ou por respostas

inflamatórias (Dionisio, Manneschi *et al.*, 2000). No modelo experimental *in vitro* com trofozoitos de *G. duodenalis*, BiMeOH apresentou uma redução no crescimento dos trofozoitos de *G. duodenalis* em todas as doses utilizadas. Os resultados obtidos indicam, efeito giardicida de BiMeOH ao inibir o crescimento dos trofozoitos.

Como já mencionado anteriormente, *E.coli* apresenta importante papel em diarréias infecciosas e os resultados obtidos com extrato BiMeOH, mostraram que BiMeOH apresenta atividade inibidora do crescimento de *E.coli*, fortalecendo a indicação popular de *B. intermedia* para diarréia e disenterias.

O gênero *Staphylococcus* é amplamente difundido na natureza fazendo parte da micoflora indígenas da pele e da mucosa dos animais e pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em animais e humanos (Nostro *et al.*, 2004). *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* são as espécies mais importantes, pois são os principais agentes causadores de infecções hospitalares. Além de causar diferentes tipos de intoxicações, *S. aureus* foi o agente etiológico mais comum de infecções purulentas que podem atacar diferentes tecidos e/ou órgãos (por exemplo, furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite, artrite bacteriana) (Verhoff *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2004). Portanto, a inibição do crescimento de *S. aureus* por *B. intermedia* é importante indicativo de ação bactericida desta espécie vegetal.

A *H. pylori* apresenta papel importante em distúrbios gastrintestinais. A *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa que apresenta papel importante para o aparecimento de úlceras, tanto gástrica quanto duodenal. A infecção de seres humanos resulta numa gastrite persistente, que pode evoluir para úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma (Blaser, 1990); Marshal & Warren, 1984; Cover

& Blaser, 1999). A prevalência de *H. pylori* é elevada em países em desenvolvimento e segundo Go (2002) esta bactéria coloniza o estômago de pelo menos metade da população mundial. No modelo experimental *in vitro*, BiMeOH foi capaz de inibir o crescimento de *H. pylori* na menor dose testada. Este resultado aumenta ainda mais o potencial terapêutico de *B. intermedia* frente a distúrbios gastrintestinais.

5. CONCLUSÕES

A espécie medicinal *Byrsonima intermedia* possui comprovada ação possui atividade protetora e cicatrizante sobre a mucosa gástrica e duodenal de roedores e também apresenta ação antidiarrêica em modelos experimentais *in vivo*;

A propriedade gastroprotetora da espécie tem a atuação efetiva de duas partições (AcoAq-aquosa e AcoEt- acetato de etila) que exercem sua gastroproteção através da atuação dos grupamentos sulfidrilas, participação do NO, ação da glutatona total e também por ativação dos neurônios sensitivos à capsaicina apenas para AcoEt;

A capacidade de *B. intermedia* em inibir as lesões duodenais pela cisteamina está relacionada com a presença dos taninos condensados em AcoAq apenas;

Em diferentes modelos experimentais verificou-se a importância da glutatona total do tecido gastrointestinal como um importante fator protetor da mucosa;

Tanto os compostos presentes em AcoAq com em AcoEt contribuem efetivamente para a cicatrização da mucosa gástrica e duodenal;

A AcoEt apresentou uma efetiva capacidade de reduzir as lesões provocadas pela isquemia-reperfusão e esta ação está relacionada com a redução dos níveis de MPO, TNF- α e IL-1 β e aumento nos níveis de glutatona total e IL-10;

A atividade antidiarrêica (mediada pela via opioide) do extrato e da AcoAq envolve principalmente a diminuição do acúmulo de fluido intestinal porém associada com a ação antimicrobiana e giardicida potencializa o efeito a sua ação terapêutica no combate e prevenção das diarreias.

Desta forma, a *Byrsonima intermedia* mostra-se promissora na prevenção e remissão de úlceras gástricas e duodenais e da diarreia aguda.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAIKUMAR, K. B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by Punicagranatum L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 171-6, Jan 4 2005.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 288, n. 1, p. C1-19, Jan 2005.

ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1704, n. 1, p. 1-10, Jul 6 2004.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 548-55, 1985.

ARAKI, H. et al. The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomach. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 14 Suppl 1, p. 116-24, Apr 2000.

ASANO, S. et al. The roles of carbohydrate chains of the beta-subunit on the functional expression of gastric H(+),K(+)-ATPase. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8324-30, Mar 24 2000.

ASHWORTH, N. L. et al. A population based historical cohort study of the mortality associated with nabumetone, Arthrotec, diclofenac, and naproxen. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 5, p. 951-6, May 2004.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 61, n. 3-4, p. 105-24, May 2000.

AWOUTERS, F. et al. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 41-5, Jan 1978.

BANICK, P. D. et al. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. **Journal of cellular physiology**, v. 172, n. 1, p. 12-24, Jul 1997.

BAYIR, Y. et al. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 13, n. 8, p. 584-90, Sep 2006.

BEALES, I. L. Gastrin and interleukin-1beta stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. **Life sciences**, v. 75, n. 25, p. 2983-95, Nov 5 2004.

BELAICHE, J. et al. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. **Acta gastro-enterologica Belgica**, v. 65, n. 2, p. 65-73, Apr-Jun 2002.

BOUGHTON-SMITH, N. K. et al. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. **British journal of pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1189-95, Nov 1993.

BRZOZOWSKI, T. et al. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 56 Suppl 5, p. 33-55, Sep 2005.

BRZOZOWSKI, T. et al. Involvement of cyclooxygenase (COX)-2 products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 51, n. 4 Pt 1, p. 751-73, Dec 2000.

BRZOZOWSKI, T. et al. Importance of nitric oxide and capsaicin-sensitive afferent nerves in healing of stress lesions induced by epidermal growth factor. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 25 Suppl 1, p. S28-38, 1997.

CHAN, F. K.; LEUNG, W. K. Peptic-ulcer disease. **Lancet**, v. 360, n. 9337, p. 933-41, Sep 21 2002.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M.; SINGH, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 29, n. 3, p. 173-80, Mar 2002.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of physiology, Paris**, v. 95, n. 1-6, p. 253-6, Jan-Dec 2001.

CLAESSENS, A. A. et al. Characteristics of diarrhoea in 10,008 users of lansoprazole in daily practice: which co-factors contribute? **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 11, n. 8, p. 703-8, Dec 2002.

CRABTREE, J. E. et al. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. **Scandinavian journal of immunology**, v. 37, n. 1, p. 65-70, Jan 1993.

CROWE, S. E. et al. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. **Gastroenterology**, v. 108, n. 1, p. 65-74, Jan 1995.

DAMMANN, H. G. et al. [Single evening administration of a new antimuscarinic agent telenzepine in therapy of acute duodenal ulcer. Results of a randomized double-blind comparative study versus pirenzepine]. **Zeitschrift fur Gastroenterologie**, v. 27, n. 4, p. 203-6, Apr 1989.

DI CARLO, G. et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 45, n. 12, p. 1054-9, Dec 1993.

DIXON, M. F. Patterns of inflammation linked to ulcer disease. **Bailliere's best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 27-40, Feb 2000.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 4, n. 3, p. 265-7, 1969.

DORNONVILLE DE LA COUR, C. et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. **Regulatory peptides**, v. 99, n. 2-3, p. 141-50, Jun 15 2001.

FAN, T. Y. et al. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 11, n. 8, p. 1204-9, Feb 28 2005.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980.

GABRIEL, S. E.; JAAKKIMAINEN, L.; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v. 115, n. 10, p. 787-96, Nov 15 1991.

GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; BARREALES TOLOSA, L. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. **Gastroenterology**, v. 132, n. 2, p. 498-506, Feb 2007.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 3, p. 825-31, Feb 1 1992.

GOWER, W. R., JR. et al. Gastric atrial natriuretic peptide regulates endocrine secretion in antrum and fundus of human and rat stomach. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 284, n. 4, p. G638-45, Apr 2003.

GRAHAM, D. Y.; OSATO, M. S. H. pylori in the pathogenesis of duodenal ulcer: interaction between duodenal acid load, bile, and H. pylori. **The American journal of gastroenterology**, v. 95, n. 1, p. 87-91, Jan 2000.

GUIDOBONO, F. et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **British journal of pharmacology**, v. 120, n. 4, p. 581-6, Feb 1997.

GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. **Digestive diseases**, v. 5, n. 1, p. 21-32, 1987.

GUSTAFSON, J.; WELLING, D. "No acid, no ulcer"--100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 210, n. 1, p. 110-6, Jan 2010.

GUTH, P. H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 65, n. 6, p. 677-88, Nov-Dec 1992.

HALTER, F. et al. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, n. 3, p. 443-53, Sep 2001.

HAM, M.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal defense. **Current opinion in gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 607-16, Nov 2007.

HAWKEY, C. J.; RAMPTON, D. S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? **Gastroenterology**, v. 89, n. 5, p. 1162-88, Nov 1985.

HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C.; VAZQUEZ-MARTINEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 80, n. 8, p. 1161-9, Aug 2000.

HOLZER, P. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 823-39, Apr 1998.

_____. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. **Current opinion in pharmacology**, v. 7, n. 6, p. 563-9, Dec 2007.

HUANG, J. Q.; SRIDHAR, S.; HUNT, R. H. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. **Lancet**, v. 359, n. 9300, p. 14-22, Jan 5 2002.

JADESKI, L. C.; LALA, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 4, p. 1381-90, Oct 1999.

JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 3, p. 1181-205, Feb 1 2007.

JAIN, R. N.; SAMUELSON, L. C. Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 291, n. 5, p. G762-5, Nov 2006.

JAMA. NIH Consensus Conference. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on Helicobacter pylori in Peptic Ulcer Disease. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 272, n. 1, p. 65-9, Jul 6 1994.

JOSEPH, I. M. et al. A model for integrative study of human gastric acid secretion. **Journal of applied physiology**, v. 94, n. 4, p. 1602-18, Apr 2003.

KARTTUNEN, R. Blood lymphocyte proliferation, cytokine secretion and appearance of T cells with activation surface markers in cultures with Helicobacter pylori. Comparison of the responses of subjects with and without antibodies to H. pylori. **Clinical and experimental immunology**, v. 83, n. 3, p. 396-400, Mar 1991.

KATO, S. et al. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 289, n. 1, p. G64-9, Jul 2005.

KO, J. K.; CHO, C. H. The role of non-protein sulfhydryl compounds in gastric adaptive cytoprotection against ethanol-induced mucosal damage in rats. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 44, n. 6, p. 242-4, Jun 1995.

KO, J. K.; CHO, C. H.; LAM, S. K. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 10, n. 17, p. 2503-8, Sep 1 2004.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 21 Suppl 1, p. S12-7, 1995.

KONTUREK, P. C. et al. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 35, n. 5, p. 452-63, May 2000.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **European journal of pharmacology**, v. 499, n. 1-2, p. 15-27, Sep 19 2004.

KONTUREK, P. K. et al. Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. **Gastroenterology**, v. 99, n. 6, p. 1607-15, Dec 1990.

KONTUREK, S. J. et al. Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. **Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1300-7, Jun 1988.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-50, Dec 1984.

KRISTJANSSON, G. et al. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. **Gut**, v. 54, n. 6, p. 769-74, Jun 2005.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **The American journal of medicine**, v. 109, n. 2, p. 150-8, Aug 1 2000.

KURATA, J. H. What in the world is happening to ulcers? **Gastroenterology**, v. 84, n. 6, p. 1623-5, Jun 1983.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 1, p. 39-50, Mar 2002.

LA VECCHIA, C.; TAVANI, A. A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs. **European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation**, v. 11, n. 2, p. 117-23, Apr 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, Jul 2008.

LANAS, A.; PANES, J.; PIQUE, J. M. Clinical implications of COX-1 and/or COX-2 inhibition for the distal gastrointestinal tract. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 27, p. 2253-66, 2003.

MAJUMDAR, S. R. et al. Chronic acid-related disorders are common and underinvestigated. **The American journal of gastroenterology**, v. 98, n. 11, p. 2409-14, Nov 2003.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K.; MCCOLL, K. E. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449-61, Oct 24 2009.

MALFERTHEINER, P. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut**, v. 56, n. 6, p. 772-81, Jun 2007.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life sciences**, v. 65, n. 2, p. PL27-32, 1999.

MERCHANT, J. L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 6-12, Jan 2007.

MONK, J. P.; CLISSOLD, S. P. Misoprostol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, v. 33, n. 1, p. 1-30, Jan 1987.

MORIMOTO, Y. et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese journal of pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 495-505, Dec 1991.

MUKHERJEE, P. K. et al. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 85-9, Feb 1998.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 30, n. 6, p. 517-31, Sep 15 2009.

OKABE, S.; ROTH, J. L.; PFEIFFER, C. J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. **The American journal of digestive diseases**, v. 16, n. 3, p. 277-84, Mar 1971.

PAN, J. S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 14, n. 38, p. 5857-67, Oct 14 2008.

PAPATHEODORIDIS, G. V.; ARCHIMANDRITIS, A. J. Role of Helicobacter pylori eradication in aspirin or non-steroidal anti-inflammatory drug users. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 11, n. 25, p. 3811-6, Jul 7 2005.

PAPATHEODORIDIS, G. V.; SOUGIOULTZIS, S.; ARCHIMANDRITIS, A. J. Effects of Helicobacter pylori and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on peptic ulcer disease: a systematic review. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 4, n. 2, p. 130-42, Feb 2006.

PESKAR, B. M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 52, n. 4 Pt 1, p. 555-68, Dec 2001.

PFEIFFER, A. et al. Muscarinic receptors in gastric mucosa are increased in peptic ulcer disease. **Gut**, v. 36, n. 6, p. 813-8, Jun 1995.

PHILLIPSON, M. et al. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 282, n. 2, p. G211-9, Feb 2002.

PONGPIRIYADACHA, Y. et al. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 5, p. 651-7, May 2003.

RAFATULLAH, S. et al. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 25-34, Apr 1990.

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 = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, v. 35, n. 5, p. 523-34, May 2002.

REYNOLDS, I. J.; GOULD, R. J.; SNYDER, S. H. Loperamide: blockade of calcium channels as a mechanism for antidiarrheal effects. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 231, n. 3, p. 628-32, Dec 1984.

ROBERT, A. et al. Enteropooling assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 11, n. 5, p. 809-28, May 1976.

ROBINSON, M. Review article: current perspectives on hypergastrinaemia and enterochromaffin-like-cell hyperplasia. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 13 Suppl 5, p. 5-10, Oct 1999.

ROULEAU, A. et al. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **Journal of neurochemistry**, v. 90, n. 6, p. 1331-8, Sep 2004.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current opinion in gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 636-43, Nov 2005.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842-60, Jun 2008.

SCHUBERT, M. L.; SHAMBUREK, R. D. Control of acid secretion. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 19, n. 1, p. 1-25, Mar 1990.

SENER-MURATOGLU, G. et al. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 46, n. 2, p. 318-30, Feb 2001.

SHIOTANI, A.; GRAHAM, D. Y. Pathogenesis and therapy of gastric and duodenal ulcer disease. **The Medical clinics of North America**, v. 86, n. 6, p. 1447-66, viii, Nov 2002.

SMITH, V. C.; DHATT, N.; BUCHAN, A. M. The innervation of the human antro-pyloric region: organization and composition. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 79, n. 11, p. 905-18, Nov 2001.

SONNENBERG, A. Causes underlying the birth-cohort phenomenon of peptic ulcer: analysis of mortality data 1911-2000, England and Wales. **International journal of epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 1090-7, Aug 2006.

SPICER, Z. et al. Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha -subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21555-65, Jul 14 2000.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 101, n. 3, p. 582-3, Jul 1959.

STROFF, T. et al. Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide. **Gastroenterology**, v. 109, n. 1, p. 89-97, Jul 1995.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. Helicobacter pylori infection. **The New England journal of medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-86, Oct 10 2002.

SUSSER, M.; STEIN, Z. Civilisation and peptic ulcer. **Lancet**, v. 1, n. 7221, p. 115-9, Jan 20 1962.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 13 Suppl 2, p. S21-34, 1991.

SZABO, S.; PIHAN, G. Development and significance of cysteamine and propionitrile models of duodenal ulcer. **Chronobiology international**, v. 4, n. 1, p. 31-42, 1987.

SZABO, S. et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. **Gastroenterology**, v. 88, n. 1 Pt 2, p. 228-36, Jan 1985.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. **Science**, v. 214, n. 4517, p. 200-2, Oct 9 1981.

TAKAHASHI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 12, p. 1997-2002, Dec 15 1999.

TAKEUCHI, K. et al. Gastric ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP1 receptors. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 16 Suppl 2, p. 74-82, Apr 2002.

TAKEUCHI, K. et al. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 248, n. 2, p. 836-41, Feb 1989.

TAKEUCHI, K. et al. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3). **Gastroenterology**, v. 117, n. 5, p. 1128-35, Nov 1999.

TAKEUCHI, K. et al. Factors involved in upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat small intestine following administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Digestive diseases and sciences**, v. 51, n. 7, p. 1250-9, Jul 2006.

TARIQ, M. et al. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 36, p. 5798-804, Sep 28 2006.

TARNAWSKI, A. et al. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement**, v. 210, p. 9-14, 1995.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences**, v. 50 Suppl 1, p. S24-33, Oct 2005.

UEDA, S. et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement**, v. 162, p. 55-8, 1989.

VENKATARANGANNA, M. V. et al. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL-409, a herbal preparation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 63, n. 3, p. 187-92, Dec 1998.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 691-703, Oct 2001.

WALLACE, J. L. et al. Nitric oxide-releasing NSAIDs: GI-safe antithrombotics. **IDrugs : the investigational drugs journal**, v. 2, n. 4, p. 321-6, Apr 1999.

WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. **Experimental biology and medicine**, v. 226, n. 11, p. 1003-15, Dec 2001.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512-20, Aug 2000.

WHITTLE, B. J. Nitric oxide in physiology and pathology. **The Histochemical journal**, v. 27, n. 10, p. 727-37, Oct 1995.

YU, P. L. et al. Mechanisms in regulating the release of serotonin from the perfused rat stomach. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 280, n. 6, p. G1099-105, Jun 2001.

YUAN, Y. et al. [Clinical phenotype of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families]. **Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]**, v. 28, n. 1, p. 36-8, Jan 2006.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 319-26, Jun 13 2007.

SANTOS, R. C. et al. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 203-12, Mar 27 2012.

ADAM, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-75, Jul 2001.

AJAIKUMAR, K. B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 171-6, Jan 4 2005.

AL-SHAFI, S. M. Toxic effect of tannic and related compounds on human plasma proteins. Saudi medical journal, v. 23, n. 2, p. 221-5, Feb 2002.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. American journal of physiology. Cell physiology, v. 288, n. 1, p. C1-19, Jan 2005.

ALLEN, S. J. et al. Probiotics for treating infectious diarrhoea. Cochrane database of systematic reviews, n. 2, p. CD003048, 2004.

ALMEIDA, C. E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. Revista de saude publica, v. 29, n. 6, p. 428-33, Dec 1995.

ALVAREZ, A. et al. Gastric antisecretory drugs induce leukocyte-endothelial cell interactions through gastrin release and activation of CCK-2 receptors. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 323, n. 1, p. 406-13, Oct 2007.

ALVAREZ, A. et al. Gastrin induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo and contributes to the inflammation caused by Helicobacter pylori. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 20, n. 13, p. 2396-8, Nov 2006.

ALVES, T. M. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 3, p. 367-73, May-Jun 2000.

AMANN, R.; MAGGI, C. A. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. Life sciences, v. 49, n. 12, p. 849-56, 1991.

ANCHA, H. et al. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. Regulatory peptides, v. 110, n. 2, p. 107-13, Jan 31 2003.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods in enzymology, v. 113, p. 548-55, 1985.

APPLEYARD, C. B. et al. Tumor necrosis factor mediation of NSAID-induced gastric damage: role of leukocyte adherence. *The American journal of physiology*, v. 270, n. 1 Pt 1, p. G42-8, Jan 1996.

ARAKI, H. et al. The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomach. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 14 Suppl 1, p. 116-24, Apr 2000.

ARTHUR, M. J. Reactive oxygen intermediates and liver injury. *Journal of hepatology*, v. 6, n. 1, p. 125-31, Feb 1988.

ASHWORTH, N. L. et al. A population based historical cohort study of the mortality associated with nabumetone, Arthrotec, diclofenac, and naproxen. *The Journal of rheumatology*, v. 31, n. 5, p. 951-6, May 2004.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins & other lipid mediators*, v. 61, n. 3-4, p. 105-24, May 2000.

AWOUTERS, F. et al. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 30, n. 1, p. 41-5, Jan 1978.

BANICK, P. D. et al. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *Journal of cellular physiology*, v. 172, n. 1, p. 12-24, Jul 1997.

BAYIR, Y. et al. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, v. 13, n. 8, p. 584-90, Sep 2006.

BELAICHE, J. et al. Observational survey of NSAID-related upper gastro-intestinal adverse events in Belgium. *Acta gastro-enterologica Belgica*, v. 65, n. 2, p. 65-73, Apr-Jun 2002.

BEND, J. R.; SERABJIT-SINGH, C. J.; PHILPOT, R. M. The pulmonary uptake, accumulation, and metabolism of xenobiotics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 25, p. 97-125, 1985.

BLAKE, D. R.; ALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems--a review orientated to inflammatory processes. *British medical bulletin*, v. 43, n. 2, p. 371-85, Apr 1987.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *The Journal of infectious diseases*, v. 161, n. 4, p. 626-33, Apr 1990.

BLEAKMAN, D.; BRORSON, J. R.; MILLER, R. J. The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *British journal of pharmacology*, v. 101, n. 2, p. 423-31, Oct 1990.

BOSE, M. et al. Antiulcer activity of levcromakalim and nicorandil in albino rats: a comparative study. *Polish journal of pharmacology*, v. 55, n. 1, p. 91-5, Jan-Feb 2003.

BOUGHTON-SMITH, N. K. et al. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *British journal of pharmacology*, v. 110, n. 3, p. 1189-95, Nov 1993.

BOYD, M. R. Biochemical mechanisms in chemical-induced lung injury: roles of metabolic activation. *Critical reviews in toxicology*, v. 7, n. 2, p. 103-76, Aug 1980.

BRIJESH, S. et al. Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism(s) of action in infectious diarrhea. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v. 7, n. 8, p. 665-74, Aug 2006.

BRZOZOWSKI, T. et al. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 56 Suppl 5, p. 33-55, Sep 2005.

BRZOZOWSKI, T. et al. Involvement of cyclooxygenase (COX)-2 products in acceleration of ulcer healing by gastrin and hepatocyte growth factor. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 51, n. 4 Pt 1, p. 751-73, Dec 2000.

BRZOZOWSKI, T. et al. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 52, n. 4 Pt 1, p. 583-602, Dec 2001.

BRZOZOWSKI, T. et al. Importance of nitric oxide and capsaicin-sensitive afferent nerves in healing of stress lesions induced by epidermal growth factor. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 25 Suppl 1, p. S28-38, 1997.

BULBUL, M. et al. Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. *Journal of gastroenterology*, v. 43, n. 3, p. 202-7, 2008.

CABEZA, J. et al. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life sciences*, v. 68, n. 12, p. 1405-15, Feb 9 2001.

CALAM, J.; BARON, J. H. ABC of the upper gastrointestinal tract: Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. *BMJ*, v. 323, n. 7319, p. 980-2, Oct 27 2001.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & therapeutics*, v. 106, n. 2, p. 179-208, May 2005.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual review of neuroscience*, v. 24, p. 487-517, 2001.

CHAMOUN, F. et al. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, v. 5, p. E103-9, Nov 1 2000.

CHAN, F. K.; LEUNG, W. K. Peptic-ulcer disease. *Lancet*, v. 360, n. 9337, p. 933-41, Sep 21 2002.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M.; SINGH, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, v. 29, n. 3, p. 173-80, Mar 2002.

CHECKLEY, W. et al. Multi-country analysis of the effects of diarrhoea on childhood stunting. *International journal of epidemiology*, v. 37, n. 4, p. 816-30, Aug 2008.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *Journal of physiology, Paris*, v. 95, n. 1-6, p. 253-6, Jan-Dec 2001.

CLAESSENS, A. A. et al. Characteristics of diarrhoea in 10,008 users of lansoprazole in daily practice: which co-factors contribute? *Pharmacoepidemiology and drug safety*, v. 11, n. 8, p. 703-8, Dec 2002.

CLINCH, D. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulceration. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, v. 21, n. 3, p. 183-7, Jul 1987.

CNUBBEN, N. H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 10, n. 4, p. 141-52, Sep 2001.

COLLINS, P. W. Misoprostol: discovery, development, and clinical applications. *Medicinal research reviews*, v. 10, n. 2, p. 149-72, Apr-Jun 1990.

CORUZZI, G.; MENOZZI, A.; DOBRILLA, G. Novel non-steroidal anti-inflammatory drugs: what we have learned from animal studies. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, v. 3, n. 1, p. 43-61, Mar 2004.

CRABTREE, J. E. et al. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian journal of immunology*, v. 37, n. 1, p. 65-70, Jan 1993.

CROWE, S. E. et al. Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gastroenterology*, v. 108, n. 1, p. 65-74, Jan 1995.

CZINNER, E. et al. The in vitro effect of *Helichrysi flos* on microsomal lipid peroxidation. *Journal of ethnopharmacology*, v. 77, n. 1, p. 31-5, Sep 2001.

DAMMANN, H. G. et al. [Single evening administration of a new antimuscarinic agent telenzepine in therapy of acute duodenal ulcer. Results of a randomized double-blind comparative study versus pirenzepine]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, v. 27, n. 4, p. 203-6, Apr 1989.

DE GUSMAO, F. M. et al. Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity and left ventricular ejection fraction. *International journal of cardiology*, v. 100, n. 3, p. 363-70, Apr 28 2005.

DENGIZ, G. O. et al. Gastroprotective and antioxidant effects of amiodarone on indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Archives of pharmacal research*, v. 30, n. 11, p. 1426-34, Nov 2007.

DERIN, N. et al. Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell biochemistry and function*, v. 24, n. 5, p. 437-42, Sep-Oct 2006.

DERIN, N. et al. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 55, n. 3, p. 595-606, Sep 2004.

DI CARLO, G. et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 45, n. 12, p. 1054-9, Dec 1993.

DIMMITT, R. A. et al. Serum cytosolic beta-glucosidase activity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatric research*, v. 54, n. 4, p. 462-5, Oct 2003.

DIONISIO, D. et al. *Strongyloides stercoralis*: ultrastructural study of newly hatched larvae within human duodenal mucosa. *Journal of clinical pathology*, v. 53, n. 2, p. 110-6, Feb 2000.

DIXON, M. F. Patterns of inflammation linked to ulcer disease. *Bailliere's best practice & research. Clinical gastroenterology*, v. 14, n. 1, p. 27-40, Feb 2000.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scandinavian journal of gastroenterology*, v. 4, n. 3, p. 265-7, 1969.

DORMOND, O. et al. Prostaglandin E2 promotes integrin alpha Vbeta 3-dependent endothelial cell adhesion, Rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling. *The Journal of biological chemistry*, v. 277, n. 48, p. 45838-46, Nov 29 2002.

ECKMANN, L.; GILLIN, F. D. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 280, n. 1, p. G1-6, Jan 2001.

ECKMANN, L. et al. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *Journal of immunology*, v. 164, n. 3, p. 1478-87, Feb 1 2000.

FAN, T. Y. et al. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 11, n. 8, p. 1204-9, Feb 28 2005.

FATOUROS, M. et al. Role of the spleen in lipid metabolism. *The British journal of surgery*, v. 82, n. 12, p. 1675-7, Dec 1995.

FAUBERT, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical microbiology reviews*, v. 13, n. 1, p. 35-54, table of contents, Jan 2000.

FISHER, A. A.; LE COUTEUR, D. G. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H₂ receptor antagonists. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*, v. 24, n. 1, p. 39-57, Jan 2001.

GABRIEL, S. E.; JAAKKIMAINEN, L.; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Annals of internal medicine*, v. 115, n. 10, p. 787-96, Nov 15 1991.

GAGINELLA, T. S. et al. Actions of ricinoleic acid and structurally related fatty acids on the gastrointestinal tract. II. Effects on water and electrolyte absorption in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 195, n. 2, p. 355-61, Nov 1975.

GALVEZ, J. et al. Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 45, n. 2, p. 157-9, Feb 1993.

GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; BARREALES TOLOSA, L. Risk of upper gastrointestinal complications among users of traditional NSAIDs and COXIBs in the general population. *Gastroenterology*, v. 132, n. 2, p. 498-506, Feb 2007.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, v. 14, n. 1, p. 114-28, Jan 2001.

GARNER, A. Adaptation in the pharmaceutical industry, with particular reference to gastrointestinal drugs and diseases. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, v. 193, p. 83-9, 1992.

GAZZIERI, D. et al. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free radical biology & medicine*, v. 43, n. 4, p. 581-9, Aug 15 2007.

GLAVIN, G. B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 6, n. 3, p. 825-31, Feb 1 1992.

GO, M. F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 16 Suppl 1, p. 3-15, Mar 2002.

GONZALEZ, P. et al. Anaphylaxis to proton pump inhibitors. *Allergologia et immunopathologia*, v. 30, n. 6, p. 342-3, Nov-Dec 2002.

GRAHAM, D. Y.; LU, H. Is there a role for sequential in sequential anti-*H. pylori* therapy? *Gastroenterology*, v. 130, n. 6, p. 1930-1; author reply 1931, May 2006.

GRAHAM, D. Y.; OSATO, M. S. *H. pylori* in the pathogenesis of duodenal ulcer: interaction between duodenal acid load, bile, and *H. pylori*. *The American journal of gastroenterology*, v. 95, n. 1, p. 87-91, Jan 2000.

GRIFFIN, M. R.; SCHEIMAN, J. M. Prospects for changing the burden of nonsteroidal anti-inflammatory drug toxicity. *The American journal of medicine*, v. 110, n. 1A, p. 33S-37S, Jan 8 2001.

GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Digestive diseases and sciences*, v. 33, n. 3 Suppl, p. 6S-15S, Mar 1988.

GUIDOBONO, F. et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *British journal of pharmacology*, v. 120, n. 4, p. 581-6, Feb 1997.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*, v. 27, n. 1, p. 1-93, Feb 2006.

GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. *Digestive diseases*, v. 5, n. 1, p. 21-32, 1987.

GUSTAFSON, J.; WELLING, D. "No acid, no ulcer"--100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 210, n. 1, p. 110-6, Jan 2010.

GUTH, P. H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. *The Yale journal of biology and medicine*, v. 65, n. 6, p. 677-88, Nov-Dec 1992.

HALTER, F. et al. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut*, v. 49, n. 3, p. 443-53, Sep 2001.

HAM, M.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal defense. *Current opinion in gastroenterology*, v. 23, n. 6, p. 607-16, Nov 2007.

HAWKINS, C.; HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a review of the literature. *Journal of pain and symptom management*, v. 20, n. 2, p. 140-51, Aug 2000.

HERNANDEZ-MUNOZ, R.; MONTIEL-RUIZ, C.; VAZQUEZ-MARTINEZ, O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 80, n. 8, p. 1161-9, Aug 2000.

HIROTA, M. et al. Inhibition of stress-induced gastric injury in the rat by glutathione. *Gastroenterology*, v. 97, n. 4, p. 853-9, Oct 1989.

HOLZER, P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Current opinion in pharmacology*, v. 7, n. 6, p. 563-9, Dec 2007.

HUANG, J. Q.; SRIDHAR, S.; HUNT, R. H. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet*, v. 359, n. 9300, p. 14-22, Jan 5 2002.

IZZO, A. A. et al. Recent findings on the mode of action of laxatives: the role of platelet activating factor and nitric oxide. *Trends in pharmacological sciences*, v. 19, n. 10, p. 403-5, Oct 1998.

JADESKI, L. C.; LALA, P. K. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *The American journal of pathology*, v. 155, n. 4, p. 1381-90, Oct 1999.

JAHN, A. I.; GUNZEL, P. K. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reproductive toxicology*, v. 11, n. 2-3, p. 171-8, Mar-Jun 1997.

JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 15, n. 3, p. 1181-205, Feb 1 2007.

JAIN, R. N.; SAMUELSON, L. C. Differentiation of the gastric mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 291, n. 5, p. G762-5, Nov 2006.

JAMA. NIH Consensus Conference. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on Helicobacter pylori in Peptic Ulcer Disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, v. 272, n. 1, p. 65-9, Jul 6 1994.

KARTTUNEN, R. Blood lymphocyte proliferation, cytokine secretion and appearance of T cells with activation surface markers in cultures with Helicobacter pylori. Comparison of the responses of subjects with and without antibodies to H. pylori. *Clinical and experimental immunology*, v. 83, n. 3, p. 396-400, Mar 1991.

KATO, S. et al. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 289, n. 1, p. G64-9, Jul 2005.

KAWAI, T. et al. Gastric epithelial damage induced by local ischemia-reperfusion with or without exogenous acid. *The American journal of physiology*, v. 266, n. 2 Pt 1, p. G263-70, Feb 1994.

KO, J. K.; CHO, C. H. The role of non-protein sulfhydryl compounds in gastric adaptive cytoprotection against ethanol-induced mucosal damage in rats. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, v. 44, n. 6, p. 242-4, Jun 1995.

KO, J. K.; CHO, C. H.; LAM, S. K. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 10, n. 17, p. 2503-8, Sep 1 2004.

KOBAYASHI, K.; ARAKAWA, T. Arachidonic acid cascade and gastric mucosal injury, protection, and healing: topics of this decade. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 21 Suppl 1, p. S12-7, 1995.

KONTUREK, P. C. et al. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *European journal of pharmacology*, v. 536, n. 1-2, p. 171-81, Apr 24 2006.

KONTUREK, P. C. et al. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. *Scandinavian journal of gastroenterology*, v. 35, n. 5, p. 452-63, May 2000.

KONTUREK, P. K. et al. Role of epidermal growth factor, prostaglandin, and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterology*, v. 99, n. 6, p. 1607-15, Dec 1990.

KONTUREK, S. J. et al. Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. *Gastroenterology*, v. 94, n. 6, p. 1300-7, Jun 1988.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, n. 3, p. 197-204, 2003.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, v. 87, n. 6, p. 1344-50, Dec 1984.

KRISTJANSSON, G. et al. Gut mucosal granulocyte activation precedes nitric oxide production: studies in coeliac patients challenged with gluten and corn. *Gut*, v. 54, n. 6, p. 769-74, Jun 2005.

KROMER, W.; POSTIUS, S.; RIEDEL, R. Animal pharmacology of reversible antagonism of the gastric acid pump, compared to standard antisecretory principles. *Pharmacology*, v. 60, n. 4, p. 179-87, May 2000.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. *The American journal of medicine*, v. 109, n. 2, p. 150-8, Aug 1 2000.

KURATA, J. H. What in the world is happening to ulcers? *Gastroenterology*, v. 84, n. 6, p. 1623-5, Jun 1983.

KVIETYS, P. R. et al. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. *Gastroenterology*, v. 98, n. 4, p. 909-20, Apr 1990.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 53, n. 1, p. 39-50, Mar 2002.

LA VECCHIA, C.; TAVANI, A. A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation*, v. 11, n. 2, p. 117-23, Apr 2002.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*, v. 135, n. 1, p. 41-60, Jul 2008.

LANAS, A.; PANES, J.; PIQUE, J. M. Clinical implications of COX-1 and/or COX-2 inhibition for the distal gastrointestinal tract. *Current pharmaceutical design*, v. 9, n. 27, p. 2253-66, 2003.

LEONARD, T. B.; NEPTUN, D. A.; POPP, J. A. Serum gamma glutamyl transferase as a specific indicator of bile duct lesions in the rat liver. *The American journal of pathology*, v. 116, n. 2, p. 262-9, Aug 1984.

LONGANGA OTSHUDI, A.; VERCRUYSSSE, A.; FORIERS, A. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment

of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of ethnopharmacology*, v. 71, n. 3, p. 411-23, Aug 2000.

LUTTERODT, G. D. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. *Journal of ethnopharmacology*, v. 25, n. 3, p. 235-47, May 1989.

MAIKERE-FANIYO, R. et al. Study of Rwandese medicinal plants used in the treatment of diarrhoea I. *Journal of ethnopharmacology*, v. 26, n. 2, p. 101-9, Sep 1989.

MAJUMDAR, S. R. et al. Chronic acid-related disorders are common and underinvestigated. *The American journal of gastroenterology*, v. 98, n. 11, p. 2409-14, Nov 2003.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K.; MCCOLL, K. E. Peptic ulcer disease. *Lancet*, v. 374, n. 9699, p. 1449-61, Oct 24 2009.

MALFERTHEINER, P. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, v. 56, n. 6, p. 772-81, Jun 2007.

MARQUES, S. B. et al. High prevalence of duodenal ulcer in a tertiary care hospital in the city of Sao Paulo, SP, Brazil. *Arquivos de gastroenterologia*, v. 48, n. 3, p. 171-4, Jul-Sep 2011.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life sciences*, v. 65, n. 2, p. PL27-32, 1999.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual review of biochemistry*, v. 52, p. 711-60, 1983.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of chromatography. A*, v. 897, n. 1-2, p. 177-84, Nov 3 2000.

MONK, J. P.; CLISSOLD, S. P. Misoprostol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. *Drugs*, v. 33, n. 1, p. 1-30, Jan 1987.

MOREIRA, L. Q. et al. Anti-inflammatory effect of extract and fractions from the leaves of *Byrsonima intermedia* A. Juss. in rats. *Journal of ethnopharmacology*, v. 138, n. 2, p. 610-5, Nov 18 2011.

MORIMOTO, Y. et al. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japanese journal of pharmacology*, v. 57, n. 4, p. 495-505, Dec 1991.

MUKHERJEE, P. K. et al. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. *Journal of ethnopharmacology*, v. 60, n. 1, p. 85-9, Feb 1998.

MULLIN, J. M. et al. Proton pump inhibitors: actions and reactions. *Drug discovery today*, v. 14, n. 13-14, p. 647-60, Jul 2009.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 30, n. 6, p. 517-31, Sep 15 2009.

NAITO, Y. et al. Role of oxygen radicals in indomethacin-induced gastric mucosal microvascular injury in rats. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 17 Suppl 1, p. S99-103, 1993.

NAITO, Y. et al. Effect of vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in nitric oxide-depleted rats. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 13, n. 4, p. 553-9, Apr 1999.

OKABE, S.; ROTH, J. L.; PFEIFFER, C. J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. *The American journal of digestive diseases*, v. 16, n. 3, p. 277-84, Mar 1971.

OLIVEIRA, T. C.; LATORRE MDO, R. Trends in hospital admission and infant mortality from diarrhea: Brazil, 1995-2005. *Revista de saude publica*, v. 44, n. 1, p. 102-11, Feb 2010.

ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. *Journal of ethnopharmacology*, v. 137, n. 3, p. 1469-76, Oct 11 2011.

OTSHUDI, A. L. et al. In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhoea in Democratic Republic of Congo (DRC). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, v. 7, n. 2, p. 167-72, Apr 2000.

PACE, V. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer. *Palliative medicine*, v. 9, n. 4, p. 273-86, Oct 1995.

PAN, J. S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 14, n. 38, p. 5857-67, Oct 14 2008.

PARKMAN, H. P. et al. Cholinergic effects on human gastric motility. *Gut*, v. 45, n. 3, p. 346-54, Sep 1999.

PESKAR, B. M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 52, n. 4 Pt 1, p. 555-68, Dec 2001.

PFEIFFER, A. et al. Muscarinic receptors in gastric mucosa are increased in peptic ulcer disease. *Gut*, v. 36, n. 6, p. 813-8, Jun 1995.

PHILLIPSON, M. et al. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 282, n. 2, p. G211-9, Feb 2002.

PIPER, H. M.; MEUTER, K.; SCHAFER, C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of thoracic surgery*, v. 75, n. 2, p. S644-8, Feb 2003.

PONGPIRIYADACHA, Y. et al. Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 26, n. 5, p. 651-7, May 2003.

RA, A.; TOBE, S. W. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. *The Annals of pharmacotherapy*, v. 38, n. 1, p. 41-5, Jan 2004.

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 = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*, v. 35, n. 5, p. 523-34, May 2002.

ROBERT, A. et al. Enteropooling assay: a test for diarrhea produced by prostaglandins. *Prostaglandins*, v. 11, n. 5, p. 809-28, May 1976.

ROBINSON, M. Review article: current perspectives on hypergastrinaemia and enterochromaffin-like-cell hyperplasia. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 13 Suppl 5, p. 5-10, Oct 1999.

ROZGA, J. The role of reactive oxygen metabolites in the pathogenesis of ulcerative colitis: a speculative synthesis. *Materia medica Polona. Polish journal of medicine and pharmacy*, v. 21, n. 4, p. 263-8, Oct-Dec 1989.

SABESIN, S. M. Safety issues relating to long-term treatment with histamine H₂-receptor antagonists. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 7 Suppl 2, p. 35-40, 1993.

SAKURAI, T. et al. Effects of the acetylene compound from *Atractylodes* rhizome on experimental gastric ulcers induced by active oxygen species. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 17, n. 10, p. 1364-8, Oct 1994.

SALIM, A. S. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion*, v. 47, n. 1, p. 24-8, 1990.

SANNOMIYA, M. et al. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *Journal of ethnopharmacology*, v. 112, n. 2, p. 319-26, Jun 13 2007.

SANNOMIYA, M. et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling of compounds from the infusion of *Byrsonima fagifolia* Niedenzu. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, v. 21, n. 8, p. 1393-1400, 2007.

SANNOMIYA, M. et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of ethnopharmacology*, v. 97, n. 1, p. 1-6, Feb 10 2005.

SANNOMIYA, M. et al. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *Journal of chromatography. A*, v. 1035, n. 1, p. 47-51, Apr 30 2004.

SANTOS, R. C. et al. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *Journal of ethnopharmacology*, v. 140, n. 2, p. 203-12, Mar 27 2012.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 61-6, Aug 22 2005.

SENER-MURATOGLU, G. et al. Protective effect of famotidine, omeprazole, and melatonin against acetylsalicylic acid-induced gastric damage in rats. *Digestive diseases and sciences*, v. 46, n. 2, p. 318-30, Feb 2001.

SHIOTANI, A.; GRAHAM, D. Y. Pathogenesis and therapy of gastric and duodenal ulcer disease. *The Medical clinics of North America*, v. 86, n. 6, p. 1447-66, viii, Nov 2002.

SMITH, G. S. et al. Gastric injury induced by ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. Differing roles for lipid peroxidation and oxygen radicals. *Digestive diseases and sciences*, v. 41, n. 6, p. 1157-64, Jun 1996.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

SONNENBERG, A. Causes underlying the birth-cohort phenomenon of peptic ulcer: analysis of mortality data 1911-2000, England and Wales. *International journal of epidemiology*, v. 35, n. 4, p. 1090-7, Aug 2006.

SONNENBERG, A.; EVERHART, J. E. Health impact of peptic ulcer in the United States. *The American journal of gastroenterology*, v. 92, n. 4, p. 614-20, Apr 1997.

STICHER, O. Natural product isolation. *Natural product reports*, v. 25, n. 3, p. 517-54, Jun 2008.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 101, n. 3, p. 582-3, Jul 1959.

STOLTE, M. et al. Changes in *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the antrum and corpus during 12 months of treatment with omeprazole and lansoprazole in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 12, n. 3, p. 247-53, Mar 1998.

STROFF, T. et al. Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide. *Gastroenterology*, v. 109, n. 1, p. 89-97, Jul 1995.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection. *The New England journal of medicine*, v. 347, n. 15, p. 1175-86, Oct 10 2002.

SUSSER, M.; STEIN, Z. Civilisation and peptic ulcer. *Lancet*, v. 1, n. 7221, p. 115-9, Jan 20 1962.

SUZUKI, M. et al. Treatment with a proton pump inhibitor promotes corpus gastritis in patients with *Helicobacter pylori*-infected antrum-predominant gastritis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 16, n. 1, p. 159-65, Jan 2002.

SZABO, S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 13 Suppl 2, p. S21-34, 1991.

SZABO, S.; PIHAN, G. Development and significance of cysteamine and propionitrile models of duodenal ulcer. *Chronobiology international*, v. 4, n. 1, p. 31-42, 1987.

SZABO, S. et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology*, v. 88, n. 1 Pt 2, p. 228-36, Jan 1985.

SZABO, S.; TRIER, J. S.; FRANKEL, P. W. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*, v. 214, n. 4517, p. 200-2, Oct 9 1981.

TAKAHASHI, S.; TAKEUCHI, K.; OKABE, S. EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochemical pharmacology*, v. 58, n. 12, p. 1997-2002, Dec 15 1999.

TAKEUCHI, K. et al. Gastric ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP1 receptors. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 16 Suppl 2, p. 74-82, Apr 2002.

TAKEUCHI, K. et al. Role of sulfhydryls in mucosal injury caused by ethanol: relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 248, n. 2, p. 836-41, Feb 1989.

TAKEUCHI, K. et al. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3). *Gastroenterology*, v. 117, n. 5, p. 1128-35, Nov 1999.

TAKEUCHI, K. et al. Factors involved in upregulation of inducible nitric oxide synthase in rat small intestine following administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Digestive diseases and sciences*, v. 51, n. 7, p. 1250-9, Jul 2006.

TARIQ, M. et al. Bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor attenuates chemically induced gastroduodenal ulcers in rats. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 12, n. 36, p. 5798-804, Sep 28 2006.

TARNAWSKI, A. et al. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, v. 210, p. 9-14, 1995.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive diseases and sciences*, v. 50 Suppl 1, p. S24-33, Oct 2005.

THAPAR, N.; SANDERSON, I. R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet*, v. 363, n. 9409, p. 641-53, Feb 21 2004.

TRAUB, A. et al. Splenic reticuloendothelial function after splenectomy, spleen repair, and spleen autotransplantation. *The New England journal of medicine*, v. 317, n. 25, p. 1559-64, Dec 17 1987.

UEDA, S. et al. Role of free radicals and lipid peroxidation in gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, v. 162, p. 55-8, 1989.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S. H. pylori infection and the development of gastric cancer. *The Keio journal of medicine*, v. 51 Suppl 2, p. 63-8, Dec 2002.

VENKATARANGANNA, M. V. et al. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL-409, a herbal preparation. *Journal of ethnopharmacology*, v. 63, n. 3, p. 187-92, Dec 1998.

WADA, K. et al. A new gastric ulcer model induced by ischemia-reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life sciences*, v. 59, n. 19, p. PL295-301, 1996.

WALKER, J.; CROWLEY, P.; BARRETT, J. Chemical modification of a cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*: evidence for an essential histidine residue. *Experimental parasitology*, v. 80, n. 4, p. 616-23, Jun 1995.

WALLACE, J. L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology*, v. 112, n. 3, p. 1000-16, Mar 1997.

_____. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, v. 15, n. 5, p. 691-703, Oct 2001.

WALLACE, J. L. et al. Nitric oxide-releasing NSAIDs: GI-safe antithrombotics. *IDrugs : the investigational drugs journal*, v. 2, n. 4, p. 321-6, Apr 1999.

WALLACE, J. L.; MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Experimental biology and medicine*, v. 226, n. 11, p. 1003-15, Dec 2001.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology*, v. 119, n. 2, p. 512-20, Aug 2000.

WARZECHA, Z. et al. The influence of sensory nerves and CGRP on the pancreatic regeneration after repeated episodes of acute pancreatitis in rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 51, n. 3, p. 449-61, Sep 2000.

WHITTLE, B. J. Nitric oxide in physiology and pathology. *The Histochemical journal*, v. 27, n. 10, p. 727-37, Oct 1995.

_____. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *European journal of pharmacology*, v. 500, n. 1-3, p. 427-39, Oct 1 2004.

YOSHIDA, N. et al. Role of neutrophil-mediated inflammation in aspirin-induced gastric mucosal injury. *Digestive diseases and sciences*, v. 40, n. 11, p. 2300-4, Nov 1995.

YUAN, Y. et al. [Clinical phenotype of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*, v. 28, n. 1, p. 36-8, Jan 2006.

ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Oxygen free radicals and the gastrointestinal tract: role in ischemia-reperfusion injury. *Hepato-gastroenterology*, v. 41, n. 4, p. 337-42, Aug 1994.

ZLABEK, J. A.; ANDERSON, C. G. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. *The Annals of pharmacotherapy*, v. 36, n. 5, p. 809-11, May 2002.

WOOLFE, G. and MACDONALD, A.D., The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol), *J. Pharmacol Exp. Ther.*, v. 80, p. 300-307, 1944.

7. ANEXOS