

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

Vinícius Peixoto Rodrigues

**Avaliação da atividade cicatrizante gástrica do extrato
hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva*
(Allemão) Engl.**

Botucatu – SP
2014

Vinícius Peixoto Rodrigues

Avaliação da atividade cicatrizante gástrica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof^a Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Botucatu – SP
2014

AGRADECIMENTOS

A minha família. Meus pais Luís Gonzaga e Cristina e minhas irmãs Natália e Tamires, pelo apoio, preocupação e carinho ao longo de toda a minha vida sem eles eu não estaria onde eu estou hoje.

A minha grande orientadora, professora Clélia, pela confiança, paciência e oportunidade.

A professora Lúcia Rocha, por sempre franca e pertinente.

A equipe do “Lab”, em especial a Larissa (a “Sargenta”), a Stefanni (Waka com um k só), a Julia (que eu nunca vou me acostumar a chamar de Vitamina) e a Raquel (promovendo uma aventura gastronômica por experimento), por todas as explicações, pelo trabalho em equipe e por me ensinar que não precisamos trabalhar apenas com colegas.

Aos meus amigos, Arthur (Pó) e Vitor (Passarinho) por aliviar a carga de um árduo caminho.

A todos que contribuíram positivamente à minha formação os meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Estudos anteriores já realizados em nosso laboratório, comprovaram a ação gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* na dose de 250 mg/kg porém não existem relatos de sua ação cicatrizante da mucosa gástrica. Estes estudos acerca da propriedade cicatrizante desta espécie são essenciais para fundamentar a indicação desta espécie como potencial fitoterápico para uso no combate às úlceras gástricas. Portanto, esta proposta visa avaliar a atividade cicatrizante do extrato hidroalcoólico de suas folhas e elucidar os mecanismos de ação cicatrizantes do extrato sobre a mucosa gástrica através do estudo de fatores e enzimas como as COX1, COX-2, PDGF e as metaloproteinases de matriz 2 e 9 que estão relacionados com a reestruturação da mucosa lesionada. O extrato de *A. urundeuva* não apresentou indícios de toxicidade aguda, no *screening* hipocrático não foi observada nenhuma alteração comportamental nos animais e no modelo de toxicidade subaguda, nenhuma alteração foi encontrada, tanto nas análises macroscópicas (peso corporal e peso dos órgãos) como nas análises bioquímicas, isto é, GGT, ALT, AST, ureia, creatinina, e glicose. A análise das áreas de lesões não diferiram significativamente entre o grupo trata com com extrato e o grupo tratado com salina. As análises moleculares (COXs, MMPs e PDGF) confirmaram a ausência do efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva*. Este projeto é um subprojeto do Projeto temático Biotá/FAPESP “Fitoterápicos padronizados como alvo para o tratamento de doenças crônicas” de Nº 2009/52237-9.

Palavras-chaves: plantas medicinais, cicatrização, *Astronium urundeuva*, ulcera gástrica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto.....	13
Figura 2 – Estômagos de ratos com lesões induzidas por etanol absoluto.....	13
Figura 3 – Evolução de massa corporal dos camundongos machos, ao longo de 14 dias no modelo de toxicidade aguda.	17
Figura 4 – Evolução de massa corporal dos camundongos fêmeas, ao longo de 14 dias no modelo de toxicidade aguda	18
Figura 5 – Evolução de massa corporal dos ratos, ao longo dos 14 dias de administrações no modelo de toxicidade subaguda.....	20
Figura 6 – Áreas de lesão, medidas com paquímetro digital, dos animais tratados por sete dias.....	22
Figura 7 – Áreas de lesão, medidas com o ImageJ, dos animais tratados por sete dias.....	22
Figura 8 – Áreas de lesão, medidas com paquímetro digital, dos animais tratados por 14 dias.....	23
Figura 9 – Áreas de lesão, medidas com o ImageJ, dos animais tratados por 14 dias.....	23
Figura 10 – Expressão de COX-1 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias.....	24
Figura 11 – Expressão de COX-2 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias.....	25
Figura 12 – Expressão de MMP-2 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias.....	26
Figura 13 – Expressão de MMP-9 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias.....	27
Figura 14 – Expressão de PDGF no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do Extrato hidroalcoólico de <i>A. urundeuva</i> sobre os órgãos de camundongos fêmeas.....	18
Tabela 2 - Efeito do Extrato hidroalcoólico de <i>A. urundeuva</i> sobre os órgãos de camundongos machos.	18
Tabela 3 – Efeito dos tratamentos administrados durante 14 dias sobre os órgãos de ratos..	19
Tabela 4 – Efeito dos tratamentos administrados durante 14 dias sobre parâmetros bioquímicos dosados a partir do sangue de ratos.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – micrograma

μL – microlitro

ALT – alanina aminotransferase

ANOVA – análise de variância

AST – aspartato aminotransferase

CaCl_2 – cloreto de cálcio

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CO_2 – dióxido de carbono

EtOH – etanol

g – grama

GGT – gama glutamiltransferase

H_2O – água

HCl – ácido clorídrico

kDa – quilo-Dalton

kg – quilograma

M – molar

mM – micro molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

mm^2 – milímetro quadrado

MMP – metaloproteinase de matriz

MMP-2 – metaloproteinase de matriz-2

MMP-9 – metaloproteinase de matriz-9

NaCl – cloreto de sódio

ns – diferença não significativa

°C – grau Celsius

OECD – Organization for economic cooperation and development

pH – potencial Hidrogeniônico

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RPM – Rotações por Minuto

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Tris-HCl – Trizma-HCl

U/L – unidades por litro

V - Volt

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	12
3.	JUSTIFICATIVA	12
4.	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1.	MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO	14
4.2.	ANIMAIS.....	14
5.	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	14
5.1.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE - ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.....	14
5.2.	TOXICIDADE AGUDA E SCREENING HIPOCRÁTICO.....	15
5.3.	BIOLOGIA MOLECULAR	16
5.3.1.	EXPRESSÃO DE CICLOXIGENASES 1 E 2, METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9; E FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS	16
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
8.	CONCLUSÃO.....	28
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

As úlceras gástricas são lesões necróticas na mucosa que podem variar em profundidade, elas podem atingir apenas o epitélio ou danificando estruturas mais profundas da mucosa gástrica como a camada muscular (Kumar *et al.*, 2010). As úlceras são um resultado de diversas anomalias no trato gastrointestinal, como defeitos em sua motilidade, fatores protetores (secreção de muco, produção de bicarbonato) e fluxo sanguíneo local; além disso fatores externos como fumo, bebidas alcoólicas, estresse e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) também contribuem para a formação de dessas lesões na parede gástrica (McPhee & Hammer, 2010).

A cicatrização das úlceras consiste em processos complexos e bem regulados, de preenchimento do local lesionado, sendo eles a inflamação, angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos, formação do tecido de granulação e remodelamento do tecido conjuntivo (Tarnawski, 2005; Kumar *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2013). Esses processos são controlados por fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que atua principalmente nos eventos relacionados ao tecido conectivo em formação; o PDGF estimula a migração e proliferação de fibroblastos, miofibroblastos, células de musculatura lisa e células endoteliais, sendo assim um fator importante, junto com outros fatores de crescimento, na cicatrização ordenada do tecido gástrico (Milani & Calabrò, 2001).

Um dos maiores problemas relativo à farmacoterapia do tratamento da úlcera gástrica consiste na recidiva da doença após o período de tratamento. Embora a taxa de cicatrização com os uso dos inibidores da secreção gástrica, como o omeprazol e lansoprazol, seja de 80-100% após uma terapia de quatro semanas, a recidiva da úlcera, dentro de um ano após o tratamento, é de 40-80%. Acredita-se que uma das razões da recorrência da lesão deve-se ao fato de que as úlceras cicatrizadas são precariamente vascularizadas e têm de duas a três vezes menos densidade de vasos sanguíneos novos ao redor do que o tecido normal (Szabo & Vincze, 2000). O fluxo sanguíneo na mucosa gástrica é um fator importante para manter a sua integridade, por fornecer o suprimento adequado de nutrientes, oxigênio, hormônios e, também, por participar da regulação de produção de muco, secreção de ácido e de bicarbonato, remoção dos produtos de degradação e

retrodifusão de íons hidrogênio (Kawano & Tsuji, 2000). O suprimento de sangue na mucosa é regulado por sistemas e fatores metabólicos locais, como prostaglandina, leucotrieno e outros mediadores químicos endógenos (Kawano & Tsuji, 2000). A integridade da mucosa gástrica depende da geração contínua de prostaglandina E_2 e prostaciclina por parte das ciclooxigenases (COX). As prostaglandinas ativam a proliferação celular, promovem angiogênese e ao mesmo tempo outros eventos envolvidos na proteção e na restauração da mucosa (Poonam *et al.*, 2005; Laine *et al.*, 2008; Tarnawski *et al.*, 2013). A COX-1 é expressa constitutivamente no tecido gástrico, porém tem sua expressão diminuída durante respostas inflamatórias (Kemmerly & Kaunitz, 2013); esta forma da enzima está envolvida em funções fisiológicas relacionada com a manutenção e proteção da mucosa gástrica, possuindo, portanto, um papel importante na manutenção da homeostase. Em contrapartida, a expressão da COX-2 que normalmente é baixa sob condições normais, pode apresentar uma elevação dos seus níveis em certas condições fisiopatológicas como a inflamação (Kemmerly & Kaunitz, 2013). No processo de cicatrização e na defesa da mucosa a participação da COX-2 está cada vez mais bem definida, o que pode ajudar no desenvolvimento de novas terapias, pois sua expressão está envolvida no controle de mecanismos protetores da mucosa como re-epitelização, angiogênese e citoproteção adaptativa (Wallace, 2005);

Outros fatores importantes na reestruturação da mucosa gástrica são as metaloproteinases de matriz (MMP). As MMPs constituem uma família de enzimas que têm em comum um domínio zinco-protease; elas são responsáveis pela degradação do colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, passo importante na remodelação do tecido conjuntivo. As gelatinases (MMP-2 e 9) degradam o colágeno amorfo e as fibronectinas presentes na área lesionada e a expressão dessas duas enzimas se eleva pelo processo de inflamação (Kumar *et al.*, 2010).

A úlcera gástrica é uma enfermidade que acomete um número considerável de pessoas no mundo inteiro e é considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade. Segundo os autores Ramakrishnan & Salinas (2007), nos Estados Unidos aproximadamente 4 milhões de pessoas têm úlceras pépticas sendo que quase 500.000 indivíduos as desenvolvem a cada ano. Além disso, anualmente, 350 mil novos casos são diagnosticados e cerca de 100 mil pacientes são hospitalizados, sendo que pelo menos 3.000 pessoas morrem em decorrência dessa

enfermidade (Crawford & White, 2002). No Brasil, a prevalência de úlcera péptica ainda não é conhecida, mas estima-se que sua incidência varia de 1 a 20%, sobre a população (D'acampora, 2008).

Sabe-se que no Brasil, uma grande parte da população não tem acesso à medicamentos modernos para a cura de enfermidades como a úlcera gástrica, principalmente pelo seu custo elevado, o que leva a preferência pelo uso de plantas medicinais (Lima *et al.*, 2008). No ano de 2006, houve a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006) e foi divulgado o Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006 que aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. A partir de então, novos incentivos estão sendo realizados no intuito de implementar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos como opção do SUS no tratamento de doenças para a assistência primária a saúde (Brasil, 2010). Dessa forma, os estudos sobre os efeitos terapêuticos de plantas medicinais têm adquirido a devida importância por constituírem uma das principais ferramentas para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados com eficácia e comprovação do uso seguro. Os fitoterápicos também se constituem como uma ferramenta importante para elevar o acesso da população aos medicamentos, assim como oferecer novas opções terapêuticas para as diversas doenças, se possível, com redução dos efeitos colaterais que muitas vezes ocorre com o uso contínuo de fármacos de origem sintética.

Estudos mostram a existência de uma grande variedade de plantas medicinais com atividade gastroprotetora, indicando que as plantas medicinais constituem uma importante fonte de novas moléculas farmacologicamente ativas para o tratamento da úlcera gástrica (Schmeda-Hirschmann & Yesilada, 2005). Dentre as espécies vegetais do cerrado com potencial terapêutico, encontra-se a *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. popularmente conhecido como Aroeira-do-sertão cujo uso popular inclui o controle de úlceras de pele, reumatismo (Almeida *et al.*, 1998; Desmarchelier *et al.*, 1999) e diarreia (Viana *et al.*, 1997), além do uso para doenças do trato respiratório e urinário (Lorenzi & Matos, 2002). As propriedades antiinflamatória (Rao *et al.*, 1987; Viana *et al.*, 1997), analgésica (Viana *et al.*, 1997) e antioxidante (Desmarchelier *et al.*, 1999) desta árvore nativa do Nordeste, São Paulo e Mato Grosso do Sul já foram comprovadas. Estudos químicos com esta

espécie mostraram a presença de diversos compostos fenólicos, chalconas diméricas e outros flavonóides biologicamente ativos. O óleo essencial obtido das folhas da planta contém cerca de 16 componentes, tendo como principais terpenos o alfa-pineno, gama-terpineno e o beta-cariofileno (Sousa *et al.*, 1991; Mors *et al.*, 2000). A espécie *Astronium urundeuva* (Allemão) faz parte do Projeto Biota/FAPESP (Proc. 2009/52237-9) intitulado “*Fitoterápicos padronizados como alvo para o tratamento de doenças crônicas*” e está sendo estudada sob o ponto de vista fitoquímico pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Wagner Villegas que vem realizando a caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas. Estudos realizados por Rao e colaboradores em 1987 caracterizaram preliminarmente a ação protetora gástrica desta espécie em modelos experimentais *in vivo* no qual os fatores lesivos são implantados antes do tratamento. Porém, não existem relatos dos prováveis mecanismos de ação da espécie bem como do efeito cicatrizante gástrico do extrato através do tratamento em longo prazo. Considerando que os modelos experimentais *in vivo* que melhor caracterizam uma ação antiulcerogênica são aqueles em que mimetizam a implantação da lesão e a realizam do tratamento pós-lesão (Okabe *et al.*, 1971), este trabalho se propõe a avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* na lesão ulcerosa gástrica implantada no estomago de ratos e tratados durante 7 e 14 dias consecutivos.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito cicatrizante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* e caracterizar os mecanismos de ação envolvidos na cicatrização da mucosa gástrica de ratos Wistar machos.

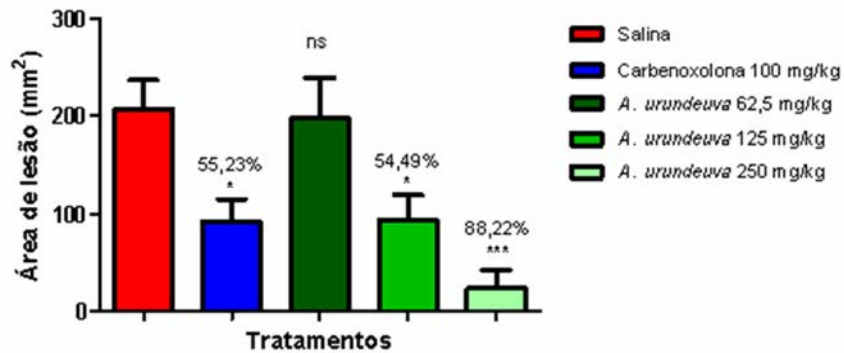
3. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios realizados em nosso laboratório – Laboratório de Ensaio Biológicos com Produtos Naturais – comprovou a atividade gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. urundeuva* no modelo de etanol absoluto (Figuras 1 e 2), no qual o extrato promoveu efeito gastroprotetor de 88% frente as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em ratos quando comparado ao grupo

tratado com veículo ($p < 0.001$). Levando em consideração os estudos anteriores que caracterizam a menor dose efetiva do extrato como sendo de 250 mg/kg, esta foi a dose selecionada para caracterizar o efeito cicatrizante do extrato no modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético.

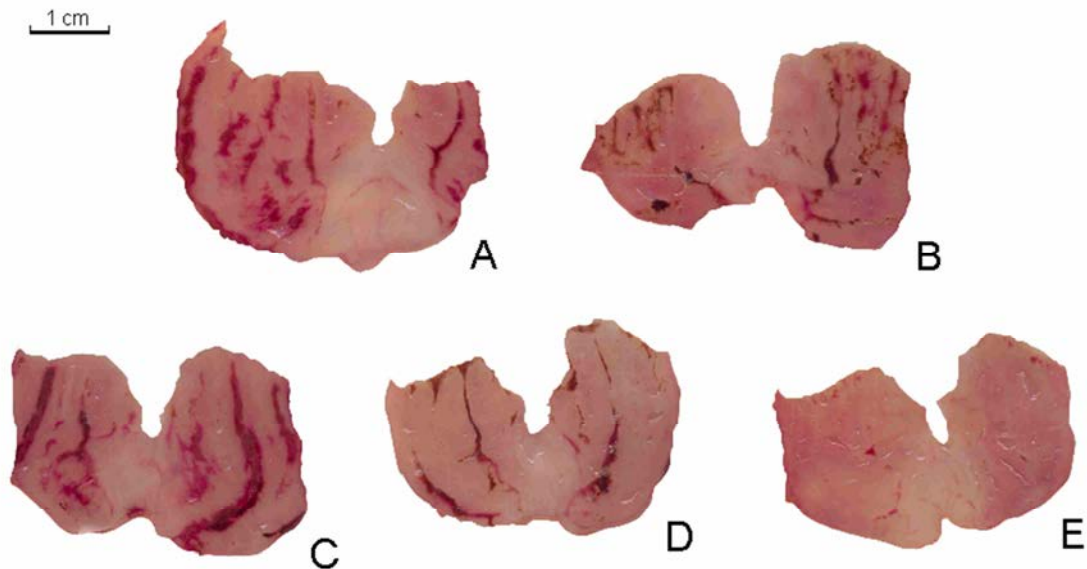
Figura 1 – As porcentagens indicam a proteção gástrica nos grupos tratados em relação ao grupo veículo. Os resultados estão expressos na forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. (ns = diferença não significativa)

Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto
(Robert *et al.*, 1979 com modificações)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Estômagos de ratos lesionados por etanol absoluto; Tratamentos: A – Salina; B – Carbenoxolona 100 mg/kg; C – A. urundeuva 62,5 mg/kg; D – A. urundeuva 125 mg/kg; E – A. urundeuva 250 mg/kg.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi obtido a partir da separação das partes das folhas da espécie, que foram secas e trituradas. Cada parte foi extraída com etanol e água (80 EtOH:20 H₂O), a partir de maceração com o solvente por um mês. O extrato foi armazenado em freezers, em frascos vedados, no Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Este processo foi repetido tantas vezes quantas necessárias para a obtenção das quantidades adequadas para a realização dos ensaios biológicos.

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-250g), provenientes do Biotério Anilab (Paulínia-SP), para o experimento de cicatrização e para o modelo de toxicidade aguda foram utilizados camundongos Swiss, machos (45-65g) e fêmeas (32-45g), provenientes do biotério central da UNESP-Botucatu. Os animais foram aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP-Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlados. Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha e alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais submetidos e aprovados previamente pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP- Botucatu sob os nº 501 e 635 - CEUA.

5. MODELOS EXPERIMENTAIS

5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE - ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

Após 12 horas de jejum, os ratos (n=7) foram anestesiados com Ketamina 0,08 mL/100 g + Xilasina 0,04 mL/100 g por via intramuscular e tiveram o abdômen aberto para exposição do estômago. Um tubo plástico de 4,2 mm de diâmetro interno foi posicionado na superfície serosa da parede do estômago. Um volume

equivalente a 70 µL de ácido acético a 80% foram aplicados por 20 segundos na superfície serosa e removido completamente, então o abdômen foi suturado. Este processo resulta em uma ulceração crônica da mucosa e submucosa, com área aproximada de 13,8 mm². Os tratamentos, Salina (10 mL/kg), Lansoprazol (30 mg/kg) e do extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* (250 mg/kg), foram administrados oralmente por sete e 14 dias consecutivos a partir do primeiro dia após a cirurgia. Decorrido o período de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, o estômago removido para análise macroscópica da lesão com a utilização de paquímetro digital. A área total da lesão foi quantificada após os estômagos serem escaneados para análise através do programa ImageJ. Órgãos como coração, fígado, baço, rins e pulmões, dos ratos tratados com o extrato de *Astronium urundeuva* (250 mg/kg), por 14 dias, foram coletados para pesagem e análises macroscópicas, assim como o peso corporal, o sangue e soro para a realização de análises bioquímicas (GGT, uréia, creatinina, AST – aspartato aminotransferase, ALT -alanina aminotransferase e glicose). Tiras do tecido gástrico serão pesadas e armazenadas para determinações bioquímicas e western blotting para caracterização da expressão de COX-1, COX-2, MMP2, MMP-9 e PDGF (Okabe *et al.*, 1971, modificado por Konturek *et al.*, 1988).

5.2. TOXICIDADE AGUDA E SCREENING HIPOCRÁTICO

Os camundongos, fêmeas e machos (n=10) foram submetidos a jejum de 12 horas e, posteriormente, receberam o extrato de *A. urundeuva* (2000 mg/kg) e veículo (salina 10 mL/kg) oralmente. A dose do extrato utilizada para esse experimento segue as diretrizes para testes de substâncias químicas da OECD (2002). Após as administrações o *screening* hipocrático foi realizado através de avaliações de parâmetros como aparência, agressividade, reflexos auriculares e palpebrais, capacidade locomotora, analgesia, micção, defecação dentre outros sinais clínicos evidentes de efeitos depressores ou estimulantes centrais, miorrelaxante e sedativo (ver anexo) Essas avaliações foram feitas 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após as administrações orais. Os animais retornam ao biotério com ração e água à vontade e tiveram seus pesos aferidos, diariamente, nos 14 dias subsequentes. Esta avaliação do peso corporal diário é importante porque muitos

compostos derivados de plantas podem ser metabolizados no fígado e após este processo se tornarem ativos tóxicos para o organismo. Ao final do período de observação, os animais foram eutanasiados e tiveram os seguintes órgãos retirados e pesados: coração, pulmão, fígado, baço, rins, ovários, útero e testículos para realizar uma determinação analítica e comparativa em relação aos animais submetidos ao tratamento com o veículo indicando ou não efeito tóxico agudo do extrato vegetal (Malone & Robichaud, 1962; Souza Brito, 1994).

5.3. BIOLOGIA MOLECULAR

5.3.1. EXPRESSÃO DE CICLOXIGENASES 1 E 2, METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 E 9; E FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

Tiras dos tecidos gástrico obtidos a partir de animais submetidos ao processo de cicatrização. As tiras foram homogeneizadas e então centrifugadas a 1200 RPM, a 4 °C, por 15 minutos. A concentração de proteínas será quantificada pelo método de Bradford (1976). Valores determinados de proteínas (50 µg) foram aplicados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidos à eletroforese, com solução tampão (Trisma base 25 mM, glicina 1,92 mM, SDS 1%). O SDS-PAGE foi submetido a 40 V, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento das proteínas (stacking) e 120 V, até o final do gel de resolução (resolving). As membranas foram lavadas em solução tampão básico e incubadas a 4 °C durante a noite, utilizando anticorpo específico para COX-1 e COX-2 (Cayman) e PDGF (Santa Cruz). As densidades das bandas das amostras sobre filme foram capturadas para quantificação densiométrica ótica, usando o software Scion Image.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados serão expressos na forma de média \pm erro padrão da média, e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e seguidos pelo teste de Dunnet e/ou Tukey, com nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

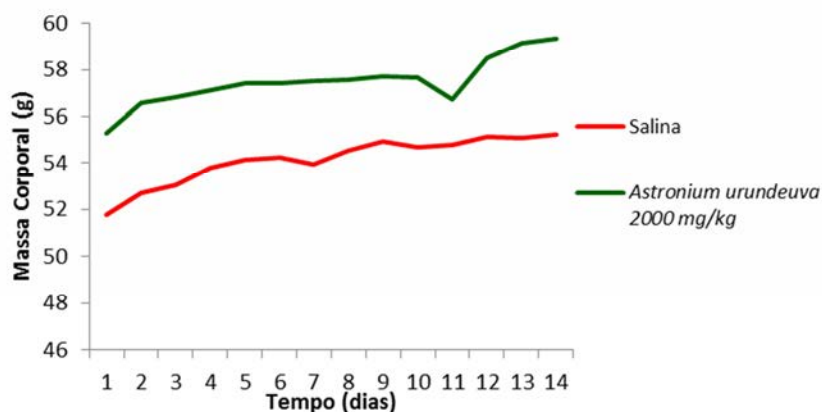
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma etapa importante dos estudos para garantir o uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos é a análise dos possíveis efeitos toxicológicos do extrato padronizado, pois a utilização das plantas e seus derivados nem sempre é segura como se acredita. Portanto, a utilização de plantas medicinais e produtos naturais pode ser prejudicial quando não se conhece seus possíveis efeitos colaterais (Nweze, 2012). Apesar de serem consideradas seguras, em geral, muitas plantas medicinais utilizadas com fins terapêuticos se mostraram capazes de causar intoxicação em doses altas ou quando usadas durante um período prolongado (Poornima *et al.*, 2012).

Neste trabalho, através do *screening* hipocrático não foi observada nenhuma alteração comportamental nos animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *A. urundeuva* na dose de 2000 mg/kg quando comparado ao grupo que recebeu o veículo salina. Ao longo dos 14 dias de observação pós-tratamento, não foi registrada nenhuma morte de ambos os grupos (tanto em machos quanto em fêmeas tratados com o extrato).

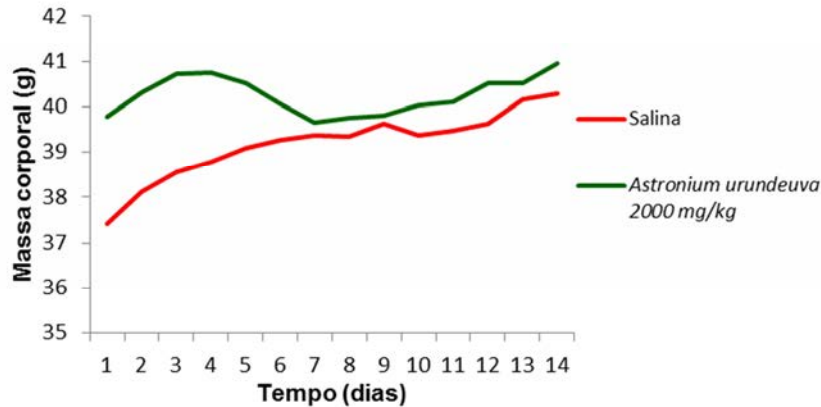
A evolução do peso corporal diário dos animais submetido aos diferentes tratamentos, não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos como demonstram as figuras 3 e 4.

Figura 3 – O gráfico indica a evolução de massa corporal dos camundongos machos, ao longo dos 14 dias após as administrações. Os valores apresentados estão sob a forma da média resultante da pesagem em cada dia. Teste t de Student.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 – O gráfico indica a evolução de massa corporal dos camundongos fêmeas, ao longo dos 14 dias após as administrações. Os valores apresentados estão sob a forma da média resultante da pesagem em cada dia. Teste t de Student.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro parâmetro analisado 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. A análise estatística deste parâmetro dos diferentes grupos não revelou diferença significativa em nenhum dos órgãos, tanto em fêmeas como em machos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Efeito do Extrato hidroalcoólico de *A. urundeuva* sobre os órgãos de camundongos fêmeas. Os resultados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. Teste t de Student.

Tratamento	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Ovários	Útero
<i>A.urundeuva</i> 2000 mg/kg	3,648 \pm 0,284	4,341 \pm 0,083	13,450 \pm 0,303	3,597 \pm 0,099	6,146 \pm 0,120	1,308 \pm 0,059	3,202 \pm 0,536
Salina	3,597 \pm 0,312	4,395 \pm 0,118	13,550 \pm 0,190	3,848 \pm 0,078	6,251 \pm 0,067	1,152 \pm 0,073	2,355 \pm 0,212

Tabela 2 - Efeito do Extrato hidroalcoólico de *A. urundeuva* sobre os órgãos de camundongos machos. Os resultados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. Teste t de Student.

Tratamento	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Testículos
<i>A.urundeuva</i> 2000 mg/kg	3,873 \pm 0,081	4,216 \pm 0,095	13,64 \pm 0,233	3,416 \pm 0,099	6,652 \pm 0,110	4,122 \pm 0,115
Salina	4,032 \pm 0,078	4,321 \pm 0,117	14,000 \pm 0,215	3,428 \pm 0,351	6,880 \pm 0,148	4,066 \pm 0,111

Este modelo avalia o peso dos animais, que é um indicador importante no estudo de toxicidade de uma substância (Jahn & Günzel, 1997), além disso, o *screening* hipocrático é muito útil e comumente usado na detecção de atividades farmacológicas e toxicológicas (Lucio *et al.*, 2000). Os resultados não indicam nenhum sinal de toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Astronium urundeuva* na dose de 2000 mg/kg.

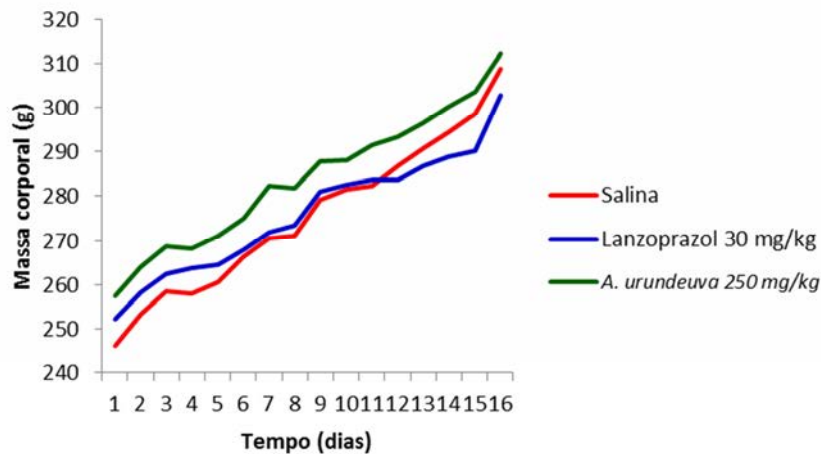
Além desses resultados, outro parâmetro que foi avaliado neste trabalho foi o possível efeito tóxico do extrato no modelo de ulcera gástrica induzida por ácido acético. Neste modelo o tratamento dos animais durante 14 dias consecutivos pode indicar eventuais efeitos tóxicos que não poderiam ser detectados no experimento anterior no qual foi utilizada uma única dose do extrato (*screening* hipocrático). Na tabela 3 estão presentes os pesos dos órgãos dos animais tratados com veículo (salina), lansoprazol (medicamento antiulcerogenico padrão) e extrato hidroalcoólico de *A. urundeuva* (250 mg/kg) durante 14 dias consecutivos. Não foram observadas alteração significativas no peso dos diferentes órgãos destes animais ($p>0.05$) bem como na evolução do peso corporal dos diferentes grupos (figura 5).

Tabela 3 – Efeito dos tratamentos administrados durante 14 dias sobre os órgãos de ratos. Os resultados estão sob a forma média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

Tratamento (14 dias)	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins
Salina	3,30 \pm 0,01	3,86 \pm 0,05	11,57 \pm 0,09	2,52 \pm 0,04	5,13 \pm 0,28
Lanzoprazol 30 mg/kg	3,37 \pm 0,05	4,05 \pm 0,13	11,84 \pm 0,15	2,59 \pm 0,07	4,91 \pm 0,05
<i>A. urundeuva</i> 250 mg/kg	3,33 \pm 0,03	3,84 \pm 0,11	11,64 \pm 0,16	2,52 \pm 0,08	4,92 \pm 0,05

Além das análises macroscópicas (peso corporal e peso dos órgãos) foram analisados também alguns parâmetros bioquímicos que pudessem indicar alguma alteração hepática, renal ou metabólica relevante através da quantificação dos níveis de: glicose, creatinina, ureia, gama-glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Figura 5 – O gráfico indica a evolução de massa corporal dos ratos, ao longo dos 14 dias de administrações. Os valores apresentados estão sob a forma da média resultante da pesagem em cada dia. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nesse modelo foi possível avaliar, além do peso dos animais e de seus órgãos, indicativos da atividade e integridade hepática e renal. O fígado é o órgão no qual substâncias exógenas são metabolizadas e posteriormente excretadas, essas funções podem ser prejudicadas devido a exposições agudas ou crônicas de substâncias tóxicas (Jaeschke, 2013). As aminotransferases (AST e ALT) são encontradas normalmente no citoplasma de hepatócitos e o aumento sérico dessas enzimas indica necrose do fígado (Panteghini & Bais, 2012; Khalili & Burman, 2014). A presença sérica de GGT tem como principal origem o fígado; o aumento dessa enzima no sangue se dá por doenças hepáticas independentemente de sua etiologia, daí sua importância como marcador hepático (Panteghini & Bais, 2012). A excreção de ureia e creatinina são importantes indicadores da função renal. Produtos do metabolismo de proteínas como a creatinina é um importante indicativo para medir a taxa de filtração glomerular, enquanto a ureia é um indicador menos confiável quando avaliado sozinho, tendo em vista que a flutuação é afetada por variáveis independentes da taxa de filtração glomerular (Corwin, 2008; Renke & Denker, 2013). Acompanhar o nível sérico de glicose também é muito importante. Seu nível se mantém, através de hormônios, em um valor de pequena variação mesmo sob diversas situações (Sacks, 2012). Porém disfunções na manutenção da

glicose sérica, como a hipoglicemia podem causar sérios danos ao sistema nervoso central, tendo em vista que este sistema utiliza a glicose como fonte primária de energia, mas é incapaz de sintetizá-la (Shamoon, 2001). Os resultados apresentados na tabela 4 corroboram com os resultados anteriores no qual não se observou nenhuma alteração bioquímica nos diferentes grupos durante os 14 dias de tratamento. Todos os resultados em conjunto, contribuem para assegurar a ausência de efeito tóxico do extrato hidroalcolico de *A. urundeuva* administrado pela via oral nas doses testadas.

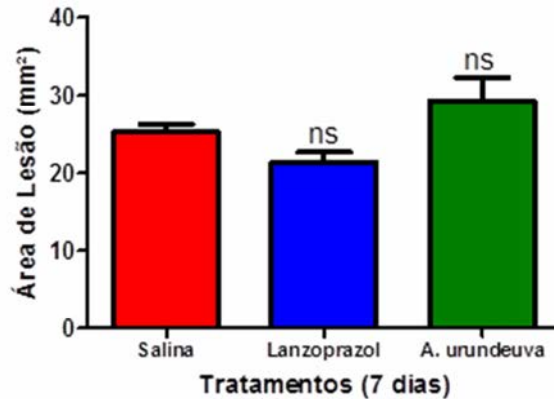
Tabela 4 – Efeito dos tratamentos administrados durante 14 dias sobre parâmetros bioquímicos dosados a partir do sangue de ratos. Os resultados estão sob a forma média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett.

Enzima/ Substância	Glicose (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	GGT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
Salina	147,9 \pm 2,8	0,33 \pm 0,02	41,55 \pm 0,88	2,86 \pm 0,22	125,5 \pm 5,5	63,87 \pm 1,95
Lanzoprazol 30 mg/kg	154,4 \pm 3,5	0,34 \pm 0,02	38,18 \pm 1,93	2,69 \pm 0,38	121,0 \pm 6,7	65,88 \pm 3,79
<i>A. urundeuva</i> 250 mg/kg	145,9 \pm 4,5	0,29 \pm 0,02	40,50 \pm 2,03	2,50 \pm 0,45	125,8 \pm 7,3	64,06 \pm 5,72

Após a instalação da lesão gástrica induzida por ácido acético e subsequente tratamento com duração de sete dias, não foram observadas diferenças significativas na área de lesão entre os tratamentos tanto nas medições realizadas através do paquímetro digital bem como através do programa Image J (Figuras 6 e 7).

Figura 6 – O gráfico mostra as áreas de lesão (paquímetro digital) dos animais tratados por sete dias. Os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett. (ns = diferença não significativa)

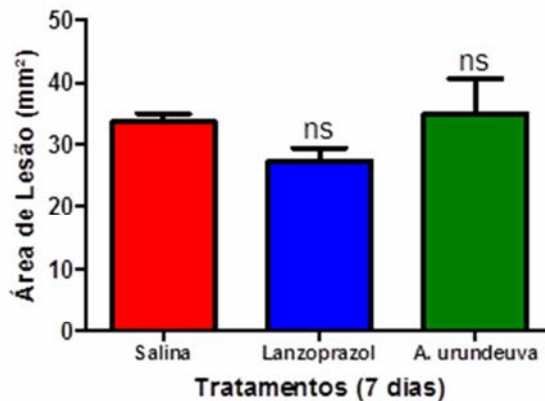
Modelo de úlceras gástricas induzidas por ácido acético
(Okabe *et al*, 1971 modificado por Konturek *et al*, 1988)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – O gráfico mostra as áreas de lesão (ImageJ) dos animais tratados por sete dias. Os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett. (ns = diferença não significativa)

Modelo de úlceras gástricas induzidas por ácido acético
(Okabe *et al*, 1971 modificado por Konturek *et al*, 1988)



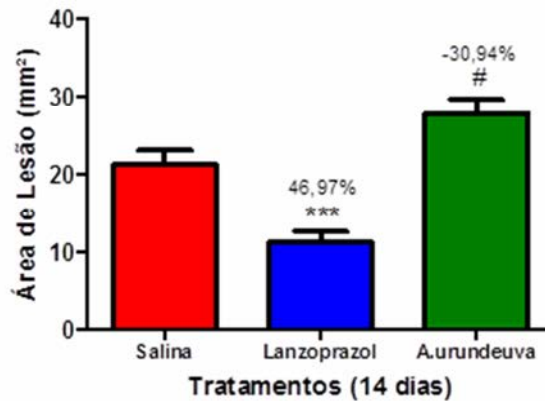
Fonte: Elaborado pelo autor.

As medições das áreas de lesão também foram avaliadas de duas maneiras, primeiramente com um paquímetro digital e posteriormente com um software (ImageJ). nos animais tratados durante 14 dias após a lesão implantada. Nesse estágio de cicatrização, os resultados apontam que somente o grupo tratado com Lanzoprazol apresentou redução significativa na área de lesão gástrica quando comparado ao grupo tratado com veículo. Em contrapartida, o tratamento dos

animais com o extrato de *A. urundeuva* promoveu aumento da área de lesão (Figura 8).

Figura 8 – O gráfico mostra as áreas de lesão (paquímetro digital) dos animais tratados por 14 dias. Os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett. # $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

**Modelo de úlceras gástricas induzidas por ácido acético
(Okabe *et al*, 1971 modificado por Konturek *et al*, 1988)**

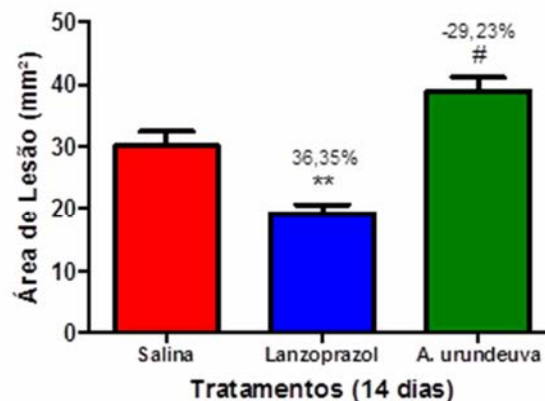


Fonte: Elaborado pelo autor.

As medições realizadas com o software ImageJ (Figura 9) confirmou o que foi observado na análise realizada com o paquímetro, demonstrando maior recuperação nos animais tratados com Lanzoprazol, e aumento da lesão pelo tratamento com o extrato.

Figura 9 – O gráfico mostra as áreas de lesão (ImageJ) dos animais tratados por 14 dias. Os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Dunnett. # $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

**Modelo de úlceras gástricas induzidas por ácido acético
(Okabe *et al*, 1971 modificado por Konturek *et al*, 1988)**



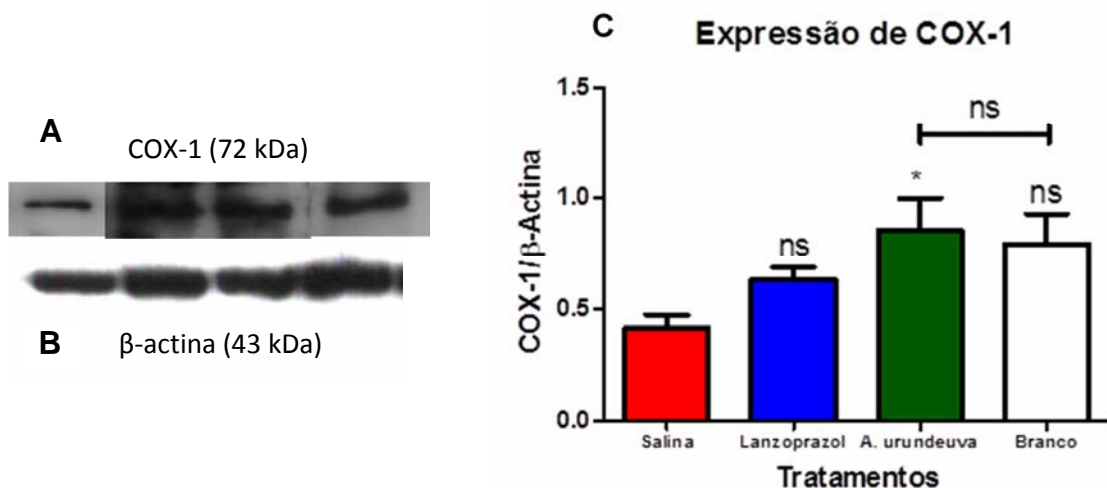
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos a partir dos animais tratados por sete dias nos mostram que os tratamentos não foram capazes de promover uma cicatrização macroscópica satisfatória devido à severidade da lesão induzida pelo ácido acético (Santos *et al.*, 2012) além disso observa-se que não há uma potencialização da lesão por parte do extrato.

Amostras obtidas de tecido gástrico dos diferentes grupos de animais tratados durante 14 dias foram utilizadas para quantificação da expressão das enzimas COX-1 e COX-2

A enzima COX-1 demonstrou-se foi significativamente aumentada no grupo tratado com extrato em relação ao grupo tratado com veículo, porém o grupo branco, isto é, o grupo de animais que não foram submetidos à indução da lesão gástrica não apresenta diferença significativa com o grupo tratado com *A. urundeuva*. (Figura 10).

Figura 10 – Expressão de COX-1 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias. (A e B) Representam as bandas na membrana (C) No gráfico os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. * $p < 0,05$. (ns = diferença não significativa).

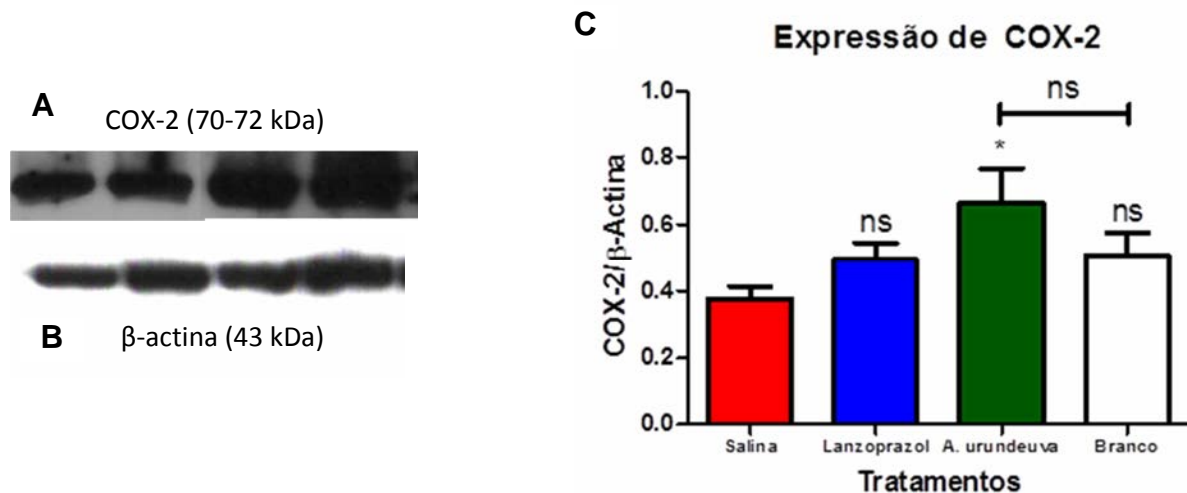


Fonte: Elaborado pelo autor.

O mesmo padrão foi observado com a expressão da COX-2, no qual se observa um aumento significativo na expressão dessa enzima no grupo tratado com o extrato quando comparado aos níveis enzimáticos do grupo tratado com salina.

Novamente não existe diferença significativa entre os grupos tratados com *Astronium urundeuva* e o grupo branco (Figura 11).

Figura 11 – Expressão de COX-2 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias. (A e B) Representam as bandas na membrana. (C) No gráfico os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. * $p < 0,05$. (ns = diferença não significativa).

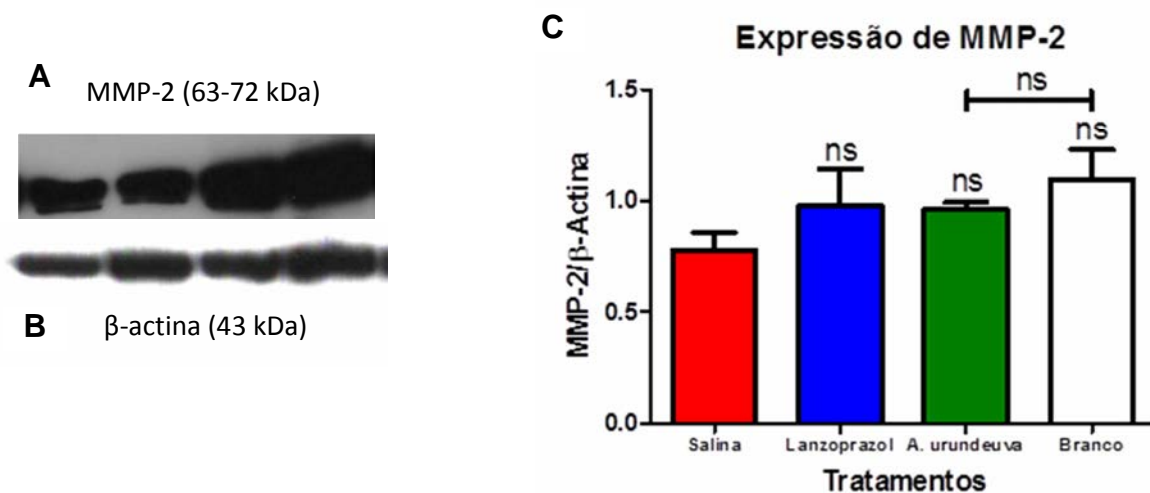


Fonte: Elaborado pelo autor

Ambas as isoformas da enzima cicloxigenase estão envolvidas na proteção da mucosa gástrica (Peskar, 2001) bem como na cicatrização de úlceras gástricas crônicas (Brzozowski *et al*, 2001). Colucci e colaboradores (2012) observaram que a expressão da COX-1, inicialmente, diminui na mucosa ulcerada tendo seus níveis restaurados posteriormente, enquanto a COX-2 se comporta de maneira oposta, isto é tem sua expressão aumentada inicialmente e com o passar do tempo seus níveis diminuem. Os resultados observados pelo tratamento com *A. urundeuva* indicam que a expressão elevada de COX-2 na mucosa gástrica após 14 dias de tratamento, reflete exatamente a permanência do processo inflamatório na mucosa destes animais. Resultados estes confirmados através da observação da área de lesão gástrica aumentada nos animais tratados com o extrato. Entretanto, a elevação na expressão de COX-1 dos animais tratados com o extrato de *A. urundeuva* também pode representar que esta isoforma expressa constitutivamente no tecido esta sendo ativada para o restabelecimento da homeostasia do tecido. Entretanto, esta hipótese necessita ser confirmada com maior tempo de tratamento com o extrato e novas quantificações destes parâmetros.

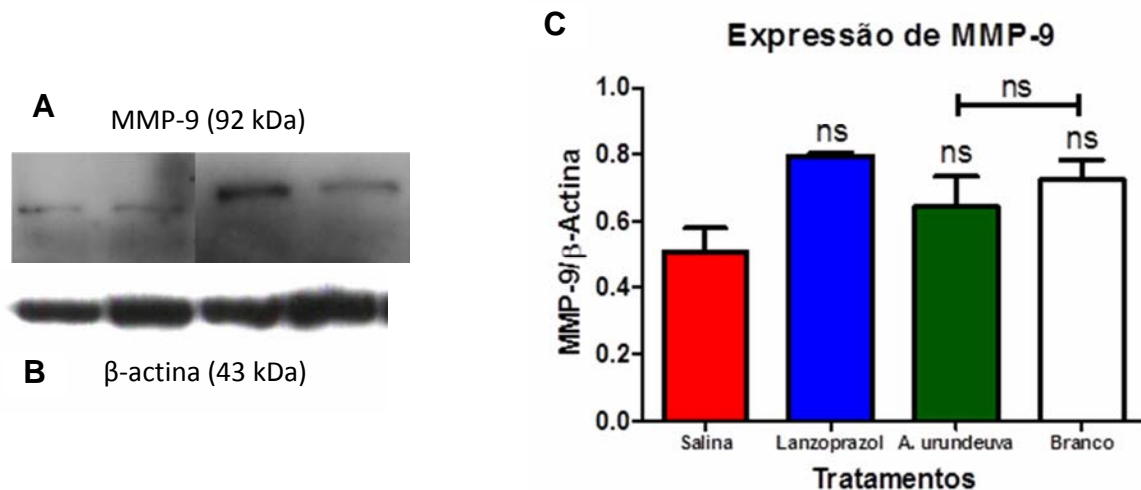
Atribui-se grande relevância às metaloproteinases na fisiopatologia de úlceras na mucosa gastrointestinal devido ao seu envolvimento no processo de cicatrização (Al-Jiboury & Kaunitz, 2012). A MMP-2 é expressa de maneira constitutiva em diversos tecidos do organismo e suas funções estão relacionadas à homeostasia enquanto a MMP-9 é expressa por poucas células em situação normal, porém essa isoforma é altamente indutível em situações inflamatórias, daí a associação de degradação tecidual com a inflamação (Sbardella *et al.*, 2012). O aumento da expressão de MMP-2 é essencial para a manutenção da integridade da matriz extracelular; porém a expressão tanto de MMP-2 como MMP-9 se mostram importantes no processo cicatrizante de úlceras no trato gastrointestinal (Gyenge *et al.*, 2013). Neste estudo, a quantificação da expressão tanto de MMP-2 quanto de MMP-9 revelou que não houve diferença significativa entre os grupos (Figuras 12 e 13).

Figura 12 – Expressão de MMP-2 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias. (A e B) Representam as bandas na membrana (C) No gráfico os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. (ns = diferença não significativa).



Fonte: Elaborado pelo autor.

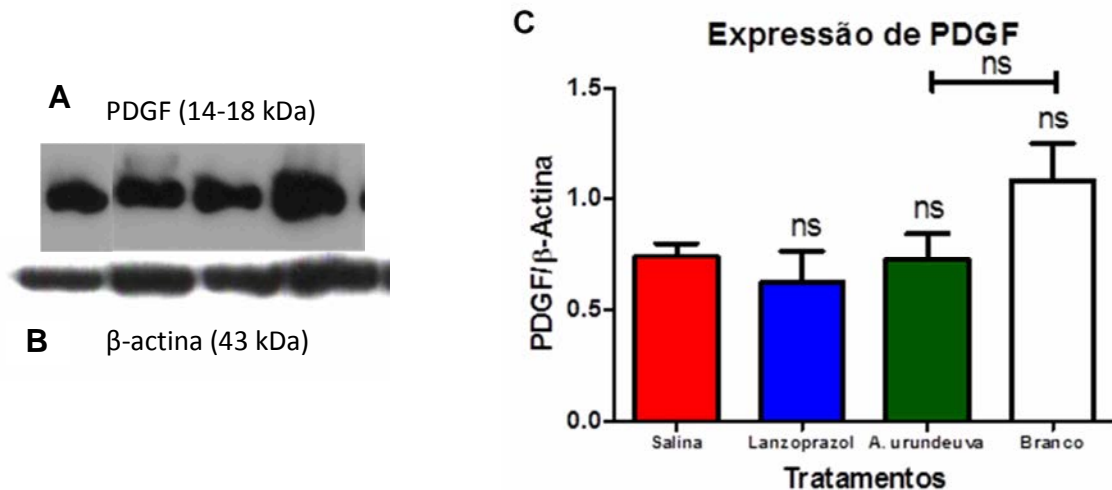
Figura 13 – Expressão de MMP-9 no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias. (A e B) Representam as bandas na membrana (C) No gráfico os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. (ns = diferença não significativa).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os fatores de crescimento como o PDGF desencadeiam a migração e proliferação celular acelerando o processo de cicatrização da úlcera gástrica. Além disso, o PDGF também atua na formação de novos vasos sanguíneos no local lesado o que garante uma maior qualidade a cicatrização (Tarnawski, 2005). As amostras dos tecidos gástricos que foram submetidos aos diferentes tratamentos também foram utilizadas para quantificar a expressão de PDGF. Entretanto, nenhum dos tratamentos realizados promoveu alteração significativa na expressão de PDGF (Figura 14).

Figura 14 – Expressão de PDGF no tecido gástrico dos animais tratados por 14 dias. (A e B) Representam as bandas na membrana (C) No gráfico os valores apresentados estão sob a forma de média \pm erro padrão da média. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. (ns = diferença não significativa).



Fonte: Elaborado pelo autor.

8. CONCLUSÃO

Podemos afirmar que o extrato hidroalcoólico de *Astronium urundeuva* não apresentou sinais de efeitos tóxicos agudos pela administração oral em dose única de 2000 mg/kg. Os resultados apresentados neste trabalho também permitem afirmar que não houve efeito tóxico pelo tratamento oral com o extrato (250 mg/kg) durante 14 dias consecutivos de tratamento;

Macroscopicamente o tratamento com o extrato não se demonstrou eficaz na cicatrização das úlceras induzidas. Estas observações foram corroboradas pelas análises moleculares no qual não se observaram ativação de fatores pró-cicatrizantes decorrentes do tratamento;

De maneira geral o extrato hidroalcoólico das folhas de *Astronium urundeuva* não promove uma cicatrização gástrica de alta qualidade, apesar de seu excelente desempenho em modelos preventivos de indução de úlceras por etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JIBOURY, H.; KAUNITZ, J.; Gastroduodenal mucosal defense, **Current Opinion in Gastroenterology**, v.28, n.6, p.594-601, 2012.

ALMEIDA, S.P.; *et al.* Cerrado: espécies vegetais úteis. **EMBRAPA**, CPAC, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, ano 2010. Acesso em 8 de julho 2011. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>.

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

BRZOZOWSKI, T.; *et al.*; Classic NSAID and Selective Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 Inhibitors in Healing of Chronic Gastric Ulcers, **Microscopy Research and Technique**, v.53, p.343-353, 2001.

COLUCCI, R. *et al.*; Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Gene-1 Plays a Role in the Impairing Effects of Cyclooxygenase Inhibitors on Gastric Ulcer Healing, **JPet**, v.342, n.1, p.140-149, 2012.

CORWIN, E. J.; **Handbook of Pathophysiology**, 3^a ed, Lippincott Williams & Wilkins, p.609, 2008. eBook.

CRAWFORD, A.S.; WHITE, J.G., Celecoxib-induced upper gastrointestinal hemorrhage and ulceration. **Southern Medical Journal** v.95, p.1444-1446. 2002.

D'ACAMPORA, A. J. Perfil Epidemiológico Dos Pacientes Portadores De Úlcera Péptica Perfurada Atendidos No Centro Cirúrgico Do Hospital Florianópolis. **Rev. Med. Res.** Vol., v.10, n.4, p.138, 2008.

DESMARCHELIER, C. *et al.* Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern **Brazil. Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p. 69–77, 1999.

GYENGE, M.; *et al.*; Roles of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors as well as matrix metalloproteinases in healing of NSAID-induced small intestinal ulcers in rats, **Life Sciences**, v.93, p.441-447, 2013.

JAESCHKE, H. Toxic Responses of the Liver, in KLAASSEN, C. D.; **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**; 8^a ed, McGraw-Hill Education, p.639, 2013 eBook

JAHN, A. I.; GÜNZEL, 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? **Reprod. Toxicol.**, v.11, n.2-3, p.171-178, 1997.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v.15, p.D1-6, 2000.

KEMMERLY, T.; KAUNITZ, J. D.; Gastroduodenal Mucosal Defense, **Current Opinion in Gastroenterology**, v.29, n.6, p.642-649, 2013.

KHALILI, M.; BURMAN, B.; **Liver disease in Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine**, 7^a ed, McGraw-Hill Education, p. 394-5, 2014.

KONTUREK, S. J. *et al.*; Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. **Gastroenterology**, v.94, 1300-1307, 1988.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. **Robbins & Cotran Bases Patológicas das Doenças** Tradução Patrícia Dias Fernandes et al, 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.105, 2010.

LIMA Z. P. *et al.*; *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **J. of Ethnopharmacol.**, v.120, n.2, p.149-160, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.52-53, 2002.

LUCIO, E.M.R.A.; *et al.*; Avaliação toxicológica aguda e creening hipocrático da epilsopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev. Bras.Farmacogn.**, V. 9/10, p. 23-25, 2000.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C.; A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Llooydia**, v.25, p.320-322, 1962.

MCPHEE, J. S.; HAMMER, G. D. **Pathophysiology of Disease, An Introduction to Clinical Medicine**, 6 ed,McGraw-Hill, 2010. CD-ROM.

MILANI, S.; CALABRÒ, A.; Role of Growth Factors and Their Receptors in Gastric Ulcer Healing, **Microscopy Research and Technique**, v.53, 360-371, 2001.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. *Medicinal Plants of Brazil*. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan, 2000.

Nweze, N. *et al.*; .Subacute toxicity study of the methanolic seed extract of *Buchholziacoriacea* (Capparaceae) in rats, **Comparative Clinical Pathology**, v.21, n.5, p.967-974, 2012.

OECD, **Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure**, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, OECD Publishing. 2002. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en;jsessionid=7ard0m7kfir2q.x-oecd-live-01>

OKABE, S.; ROTH, J.L.; PFEIFFER, C.J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats.Observations on normal healing. **Am. J. Dig. Dis.** v.16, 277-284, 1971.

PANTEGHINI, M.; BAIS, R.; Serum Enzymes in BURTIS, C. A; ASHWOOD, E. R; BRUNS, D. E., **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, 5^a ed, St. Louis: Saunders, 2012. eBook.

PESKAR, B. M.; Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence, **Journal of Physiology**, v.95, p.3-9, 2001.

POONAM, D.; VINAY, C.S.; GAUTAM, P.; Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 productionin experimental chronic gastric ulcer healing.European **Journal of Pharmacology**, v.519, 277-284, 2005.

POORNIMA, K. *et al.*; Toxicological evaluation of ethanolic extract of Tabernaemontanacoronaria(L) R. Br., **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p.S679-S684, 2012.

RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R.C. Peptic ulcer disease. **American Family Physician.**, v.76, p.1005–1012, 2007.

RAO, V.S. *et al.*; Studies on the anti-ulcerogenic activity of Astronium urundeuva Engl. II. Aqueous extract.Braz. **J. Med. Biol. Res.** v.20. p.803-805, 1987.

RENNKE, H. G.; DENKER, B. M.; **Renal Pathophysiology: The Essentials**, 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins 2013. eBook.

SACKS, D. B.; Carbohydrates in BURTIS, C. A; ASHWOOD, E. R; BRUNS, D. E., **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, 5^a ed, St. Louis: Saunders, 2012. eBook.

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, p.203-212, 2012.

SATO, T; *et al.*; NSAID, aspirin delays gastric ulcer healing with reduced accumulation of CXCR4⁺ VEGFR1⁺ cells to the ulcer granulation tissues, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.67, p.607-613, 2013.

SBARDELLA, D.; *et al.*; Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes, **Molecular Aspects of Medicine**, v.33, p.119-208, 2012.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E.; Traditional medicine and gastroprotective crude drugs, **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.61-66, 2005.

SHAMOON, H.; Hypoglycemia in FELIG, P.; FROHMAN, L. A.; **Endocrinology & Metabolism**, 4^a ed. McGraw-Hill, p. 927-928, 2001, eBook.

SOUZA BRITO, A. R. M. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo: ciências médicas. Campinas**, Ed. Unicamp, p. 15-22, 1994.

SOUSA, M.P. *et al.*; **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Impr. Universitária/UFC, Fortaleza. p.416, 1991.

SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. **Journal of Physiology**, v.94, p.77-81, 2000.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing, **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, n.1, p. S24-S33, 2005.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K., Gastric Cytoprotection Beyond Prostaglandins: Cellular and Molecular Mechanisms of Gastroprotective and Ulcer

Healing Actions of Antacids, **Current Pharmaceutical Design**, V.19, p.126-132, 2013.

VIANA, G. S. *et al.*; Analgesic and anti-inflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva*. **Phytother.Res.**, v.11, p.118-122, 1997.

WALLACE, J.L. Recent advances in gastric ulcers therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**, v.5, p. 573-577, 2005.

ANEXO – PARÂMETROS SCREENING HIPOCRÁTICO

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Droga..... Via de administração.....
 Dosemg/kg; Volume da injeção;.....mL; Concentração da droga.....
 Hora da injeção.....h.....min.;Data...../...../..... Administrador:.....
 Investigador..... Assinatura.....
 Animal..... Sexo(); Peso.....g; Tempo de jejum.....

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

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4
 Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

Observações gerais/comentários

.....

