

CAROLINA FOOT GOMES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO CURATIVA E PREVENTIVA DE
PUNICA GRANATUM EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS
POR ETANOL**



2011

CAROLINA FOOT GOMES DE MOURA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO CURATIVA E PREVENTIVA DE *PUNICA*
GRANATUM EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia
prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da
FOSJC. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

M865a Moura, Carolina Foot Gomes de.

Avaliação da ação curativa e preventiva de Punica granatum em lesões
gástricas induzidas por etanol / Carolina Foot Gomes de Moura. - São José
dos Campos: [s.n.], 2011.
70 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de
Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista,
2011.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão.

1. Punica granatum. 2. Gastrite. 3. Antiinflamatório. 4. Antiulcerogênico.
5. Fitoterapia. 6. Ranitidina. I. Brandão, Adriana Aigotti Haberbeck. II.
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ
Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita
Filho". IV. Título

tD691

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a
fonte.

São José dos Campos, 25 de julho de 2011.

Assinatura:

E-mail: carolinafoot@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Dra. Elena Malpezzi-Marinho

Área de Ciências da Saúde

Faculdades Integradas Torricelli

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 30 de agosto de 2011.

DEDICATÓRIA

*aos meus pais Amy e Sidnei
e ao meu amor, André.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter permitido que eu cumprisse mais essa etapa de minha vida.

Aos meus pais, Amy e Sidney, pelo carinho, apoio e incentivo. Dificilmente conseguirei encontrar palavras para traduzir toda minha gratidão.

Ao André pelo amor, dedicação, compreensão, paciência e cumplicidade ao longo dos anos. Amo muito você.

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão por ter me aceito como sua orientada. Obrigada por me acolher, me orientar, pelo companheirismo e por toda ajuda durante todo o período de estágio e de mestrado. Profa., obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Rosilene Rocha Fernandes pela ajuda e conselhos durante o período de estágio e mestrado. Obrigada!

À Dra. Cristina Werkman pela amizade, incentivo e ajuda durante os experimentos. Ah! Pelas caronas, almoços, cafés, conversas... tudo isso foi muito importante pra mim!

À amiga Mestre Michelle Cardoso por toda a ajuda durante a fase experimental. Mi, com certeza você faz parte desta minha conquista!

Ao Prof. Dr. Sigmar de Melo Rode pelo apoio, incentivo e ajuda. Obrigada, professor.

Ao Prof. Dr. Fabio Sampaio pela confiança e pelo extrato de romã, tão importante para este trabalho.

À amiga Sueny S. Tatibana pelo incentivo à pós-graduação. Talvez sem seu "empurrão" eu não tivesse chegado até aqui.

Às queridas amigas Camila Carrião M. Garcia e Tathiane Graziela Cipullo pela sincera amizade de toda uma vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa pelo convívio, amizade e ajuda em tantos momentos.

À Profa. Dra. Yasmin R. Carvalho pela dedicação e aprendizagem.

À Dra. Karina Bortolin Lodi pela amizade e ajuda para a melhoria deste trabalho.

Ao casal Elena Lucia A. Malpezzi-Marinho e Eduardo A. Villela Marinho pela amizade e carinho tanto nos momentos de alegria como os de maior turbulência. Elena, obrigada por ter aceito tão prontamente meu convite para compor a banca de avaliação deste trabalho.

A todos os amigos de pós graduação, em especial a Ana Paula, Gisele, Mario e Luana pela companhia.

Aos meus irmãos Mariana e Sidney, avós Dayse e Teresa, avôs Djalma e Pedro, a todos os meus tios, tias e primos por fazerem parte de minha vida.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

À Capes pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE QUADROS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Defesa e Agressão Gástricas	19
2.2 Tratamentos para lesões gástricas	23
2.2.1 Cloridrato de Ranitidina	24
2.2.2 Fitoterápicos	25
2.2.3 <i>Punica granatum</i>	26
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Preparação do extrato hidroalcoólico de frutos de <i>Punica granatum</i>	31
4.3 Extrato hidroalcoólico de casca de <i>Punica granatum</i>	33
4.4 Suco comercial industrializado de <i>Punica granatum</i>	33
4.5 Cloridrato de Ranitidina	33
4.6 Indução de lesão gástrica	33
4.7 Grupos experimentais	34
4.8 Eutanásia e coleta de material	36
4.9 Análise do pH gástrico	37
4.10 Análise histopatológica.....	37
4.11 Análise estatística	40

5 RESULTADOS.....	41
5.1 Análise do pH gástrico	41
5.1.1 Efeito das substâncias utilizadas no tratamento curativo de lesões gástricas	41
5.1.2 Efeito das substâncias utilizadas no tratamento preventivo de lesões gástricas	43
5.2 Análise histopatológica	45
5.2.1 Área ulcerada e porcentagem de inibição de ulceração no tratamento curativo de lesões gástricas.....	45
5.2.2 Área ulcerada e porcentagem de inibição de ulceração no tratamento preventivo de lesões gástricas.....	47
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	55
8 REFERÊNCIAS	56
ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - Tratamento Curativo	67
ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - Tratamento Preventivo	68
ANEXO C - Certificado de Análise Bioquímica e Microbiológica do Extrato seco de PG (Pomegranate®) - frente	69
ANEXO D - Certificado de Análise Bioquímica e Microbiológica do Extrato seco de PG (Pomegranate®) - verso	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica. Modificado de Tullasay; Herszényi (2010)	20
Figura 2 -	Fruto de <i>Punica granatum</i> (romã)	27
Figura 3 -	Esquema utilizado no tratamento curativo	35
Figura 4 -	Esquema utilizado no tratamento preventivo	36
Figura 5 -	Mensuração do pH do conteúdo gástrico com pHmetro.....	37
Figura 6 -	Imagem de estômago antes da fixação em formol 10% e indicação da região selecionada para inclusão (*).....	38
Figura 7 -	Determinação da área ulcerada (AU) utilizando-se o <i>Software Image Tool 3.0</i>	39
Figura 8 -	Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento curativo de cada subgrupo terapêutico. a - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos, exceto POM500; b - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, Sc, PG500; c - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, POM500, Sc, PG500; d - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, POM500, Sc, PG500; e - $p < 0,0001$ comparado aos grupos Ad, Sc, PG500; e - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos; f - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, Et, Sc, PG500; g - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos (ANOVA seguido de Bonferroni).....	43
Figura 9 -	Média do pH gástrico mensurado com o pHmetro no tratamento preventivo de cada subgrupo terapêutico. a -	

	$p < 0,0001$ comparado grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Sc; c - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Ral (ANOVA seguido de Bonferroni).....	45
Figura 10 -	Área ulcerada (AU) de cada subgrupo terapêutico no tratamento curativo. a - $p < 0,0001$ comparado ao grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo PG250; c - $p < 0,0001$ comparado ao grupo PG500 (ANOVA seguido de Tukey).....	46
Figura 11 -	Área ulcerada (AU) de cada subgrupo terapêutico no tratamento preventivo. a - $p < 0,0001$ comparado ao grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Ad (ANOVA seguido de Tukey).....	48

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica	20
Tabela 1 -	Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento curativo de cada subgrupo terapêutico.....	42
Tabela 2 -	Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento preventivo de cada subgrupo terapêutico.....	44
Tabela 3 -	Área ulcerada e índice de inibição de ulceração de acordo com os subgrupos terapêuticos no tratamento curativo.....	47
Tabela 4 -	Área ulcerada e índice de inibição de ulceração de acordo com os subgrupos terapêuticos no tratamento preventivo.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	=	Antiinflamatórios Não Esteroidais
Ad	=	Água destilada
AU	=	Área ulcerada
CO	=	Controle
COX-1	=	Cicloxygenase tipo 1
COX-2	=	Cicloxygenase tipo 2
EROs	=	Espécies Reativas de Oxigênio
Et	=	Etanol
EUA	=	Estados Unidos da América
H ₂	=	Receptor de Histamina tipo 2
HCO ₃ ⁻	=	Bicarbonato
HE	=	Hematoxilina-Eosina
IU%	=	Índice de ulceração
OMS	=	Organização Mundial da Saúde
PG	=	<i>Punica granatum</i>
PG250	=	Extrato hidroalcoólico de casca de <i>Punica granatum</i> em dosagem de 250mg/kg
PG500	=	Extrato hidroalcoólico de casca de <i>Punica granatum</i> em dosagem de 500mg/kg
POM250	=	Extrato hidroalcoólico de casca de <i>Punica granatum</i> em dosagem de 250mg/kg – extrato seco
POM500	=	Extrato hidroalcoólico de casca de <i>Punica granatum</i> em dosagem de 500mg/kg – extrato seco
Ral	=	Cloridrato de ranitidina em dosagem alométrica
R150	=	Cloridrato de ranitidina em dosagem de 150mg/kg
Sc	=	Suco comercial industrializado concentrado
Sd	=	Suco comercial industrializado diluído
TGI	=	Trato Gastrointestinal
TNF-α	=	Fator de Crescimento Tumoral Alfa

UFPB = Universidade Federal da Paraíba

USP = Universidade de São Paulo

μm = Micrômetro

Moura CFG. Avaliação da ação curativa e preventiva de *Punica granatum* em lesões gástricas induzidas por etanol [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Lesões gástricas inflamatórias e ulcerativas tem aumentado em frequência mundialmente. Em decorrência do estilo de vida, tais lesões tendem a apresentar recidivas. Por isso, a busca por novas alternativas de tratamento, com poucos efeitos adversos, acessíveis e de baixo custo é interessante. A espécie vegetal *Punica granatum* (romã) é utilizada como suplemento alimentar e como meio alternativo popular no auxílio ao tratamento de várias doenças. Propriedades antiinflamatórias e cicatrizantes estimulam a pesquisa da ação farmacológica desta planta em lesões gástricas. Neste trabalho, foi analisada a ação curativa e preventiva de extratos hidroalcoólicos de *P. granatum* (POM e PG) nas concentrações de 250mg/kg e 500mg/kg e do suco concentrado industrializado de romã, concentrado e diluído (Sc e Sd), em comparação ao Cloridrato de Ranitidina, através de um modelo experimental de gastrite aguda induzida por etanol em ratos. Foram avaliados a alteração do pH intragástrico, a área da mucosa gástrica ulcerada (AU) e o índice de inibição de ulceração (IU%) de cada substância terapêutica empregada. No tratamento curativo, demonstrou-se que PG250 e PG500 elevaram o pH e não diminuíram os efeitos lesivos do etanol e POM250 e POM500 apresentaram pH e redução de danos similares aos promovidos pelo cloridrato de ranitidina. Quando analisadas as AU e o IU%, os tratamentos com POM250, POM500, Sc e Sd foram eficazes na inibição de úlceras gástricas, em diferentes graus de intensidade. O Sc apresentou diminuição do pH e baixo grau de lesões, sendo eficaz tanto na cura quanto na prevenção de lesões gástricas. No tratamento preventivo, os animais tratados com PG500 apresentaram os melhores resultados quanto à inibição de ulceração. Desta forma, concluiu-se que no combate à lesões gástricas induzidas por etanol, o tratamento curativo com POM250, POM500 e Sc foi eficaz e, no tratamento preventivo, todas as substâncias empregadas foram capazes de prevenir a ulceração da mucosa gástrica, sendo o PG500 e Sc os mais eficazes. Tais respostas devem-se provavelmente à ação de prostaglandinas responsáveis pela inibição de secreção do ácido gástrico. Maiores estudos devem ser realizados a fim de determinar a quantidade e quais os compostos químicos ativos estão presentes em cada uma das substâncias utilizadas

que podem estar envolvidas no mecanismo de proteção contra a formação de lesões gástricas.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Gastrite. Antiinflamatório. Antiulcerogênico. Fitoterapia. Ranitidina.

Moura CFG. Evaluation of preventive and curative action of *Punica granatum* in ethanol-induced gastric lesions [dissertation]. Sao Jose dos Campos School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Paulista State Univ; 2011.

ABSTRACT

Inflammatory and ulcerative gastric lesions has been increasing in frequency worldwide. As a result of lifestyle, such lesions tend to relapse. Therefore, the search for new treatment alternatives, with few adverse effects, accessible and low cost is interesting. The plant species *Punica granatum* (pomegranate) is used as a food supplement and as a popular alternative means to aid in the treatment of various diseases. Anti-inflammatory and healing properties stimulate research of the pharmacological action of this plant in gastric lesions. In this paper, we analyzed the preventive and curative action of hydroalcoholic extracts of *P. granatum* (PG and POM) in the concentrations of 250mg/kg and 500mg/kg and industrialized pomegranate juice, concentrated and diluted (Sc and Sd), compared with Ranitidine Hydrochloride, through an experimental model of acute gastritis induced by ethanol in rats. We evaluated alterations of intragastric pH, the area of ulcerated gastric mucosa (AU) and the inhibition of ulcer index (UI%) of each therapeutic substance used. In curative treatment, it was shown that PG250 and PG500 increased the pH, but didn't decrease the harmful effects of ethanol and POM250 and POM500 showed pH and reduction of gastric lesions similar to those promoted by Ranitidine Hydrochloride. In analyzing the AU and IU%, treatment with POM250, POM500, Sc and Sd were effective in the inhibition of gastric ulcers in different degrees of intensity. Sc reduced pH and developed milder lesions, and was effective both in curing and prevention of gastric lesions. In the preventive treatment, the animals treated with PG500 had the best results on the inhibition of ulceration. Thus, it was concluded that against ethanol-induced gastric lesions, curative treatment with POM250, POM500 and Sc was effective, and in the preventive treatment, all substances used were able to prevent gastric mucosal ulceration, and the PG500 and Sc were the most effective. Such responses are probably due to the action of prostaglandins which is responsible for the inhibition of gastric acid secretion. Further studies should be conducted to determine the amount and what active compounds are present in each of the substances used that might be involved in the mechanism of protection against the formation of gastric lesions.

Keywords: Punica granatum. Gastritis. Anti-inflammatory. Antiulcerogenic. Phytotherapy. Ranitidine.

1 INTRODUÇÃO

Eventos adversos e negativos que ocorrem ao longo da vida contribuem para o aparecimento de desordens e doenças. A complexidade da sociedade moderna vem apresentando um crescente número de indivíduos com baixa qualidade de vida, quase sempre relacionada ao estresse, que pode culminar na geração de inúmeras doenças, muitas vezes envolvendo o sistema digestório (Scalon, Fernandes, 2010; Monroe, 2008; Moraes, Colla, 2006).

Na tentativa de compensar o estresse, a população vem fazendo uso excessivo e/ou prolongado de substâncias como medicamentos como tabaco e bebidas alcoólicas; fato este que tem aumentado progressivamente ao longo dos anos (Birdane et al., 2007; Naseri, Mard, 2007; Carrillo, Mauro, 2004).

O álcool é a substância mais amplamente utilizada, e também a mais antiga droga de abuso (Vonghia et al., 2008). Segundo Jora et al. (2010), a literatura tem relatado a complexa relação entre o consumo do etanol e o estresse; e, não somente situações estressoras podem induzir o consumo de bebidas alcoólicas como este também tem sido considerado como um meio imediato de enfrentamento e alívio para muitas situações estressantes. Evidências indicam que a ingestão excessiva de etanol possui um importante papel na etiologia de diversas lesões no trato gastrointestinal (TGI) além de ser apontado como uma substância com potencial carcinogênico (Shimazu et al., 2008; Twardoschy, 2007).

A exposição do TGI ao etanol promove alterações morfológicas e funcionais, interferindo nas células epiteliais assim como

na microbiota local, prejudicando a absorção e a proteção imunológica de todo o sistema (Melo-Junior et al., 2006). No estômago, influencia na secreção ácida, no esvaziamento gástrico e no aparecimento de doenças como gastrite e úlceras (Bujanda, 2000).

A terapia de úlceras gástricas enfrenta um grande problema nos dias de hoje devido aos efeitos colaterais provenientes do uso em longo prazo dos medicamentos disponíveis no mercado (Ajaikumar et al., 2005). Os tratamentos atuais são, em sua maioria, dirigidos para a redução dos fatores agressivos e para o fortalecimento das defesas do estômago e duodeno. Entre os fármacos mais utilizados estão os antagonistas de receptores histamina tipo 2 (H_2) e os inibidores da bomba de prótons da célula parietal que reduzem a secreção gástrica de ácidos e promovem a cicatrização (Donattini et al., 2009; Schroeter et al., 2008; Saul et al., 2007). Porém, a população frequentemente faz uso de diversos métodos alternativos ou caseiros, muitas vezes associados a estes medicamentos, antes de buscar orientação médica.

Doenças envolvendo o TGI vêm se tornando um problema de saúde pública mundial haja vista que, em decorrência do estilo de vida, tendem a apresentar várias recidivas. Como cerca de 5% da população mundial apresenta tais distúrbios, o tratamento destas doenças e sua prevenção tem se tornado um dos problemas mais desafiadores de hoje (Ajaikumar et al., 2005). Assim, a busca de novas alternativas de tratamento com poucos efeitos adversos, acessíveis e de baixo custo têm se tornado importante na comunidade científica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Defesa e Agressão Gástricas

A mucosa gástrica está constantemente exposta a diversos agentes nocivos; entretanto, o estômago mantém seu equilíbrio - tanto estrutural como funcional - devido à secreção de bicarbonato (HCO_3^-) que neutraliza tais substâncias (Zhao et al., 2009; Ham, Kaunitz, 2008; Laine et al., 2008).

A patogênese das lesões gástricas é multifatorial, resultante do desequilíbrio entre os fatores agressivos e defensivos à mucosa (Quadro 1, Figura 1). Na tentativa de inibir ferimentos causados por estresse fisiológico intenso, ácido clorídrico altamente concentrado, infecção por *Helicobacter pylori*, álcool, antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), radicais livres e produtos alimentares, o organismo lança mão de diversos fatores protetores naturais (Khalefa et al., 2010; Gustafson, Welling, 2010; Scalon, Fernandes, 2010; Silva et al., 2010; Tulassay, Herszényi, 2010; Martineau et al., 2009; Ham, Kaunitz, 2008; Birdane et al., 2007; Naseri, Mard, 2007; Saul et al., 2007; Hamaishi et al., 2006).

A primeira linha de defesa consiste em ácidos, muco, HCO_3^- , fosfolipídios e substâncias antibacterianas que são secretados no lúmen gástrico. A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e importante no mecanismo de digestão de alimentos, absorção de ferro e na defesa contra patógenos ingeridos (Cui, Waldum, 2007; Hoogerwerf, Pasricha, 2007).

Quadro 1 - Fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica

Fatores Agressivos	Fatores Defensivos
Ácido gástrico Estresse Drogas e Toxinas (AINEs e etanol) Radicais livres Microorganismos (<i>H. pylori</i>) Alimentação	Barreira de muco-bicarbonato Barreira de células epiteliais Transporte alcalino (HCO_3^-) Microcirculação Produção de Prostaglandinas

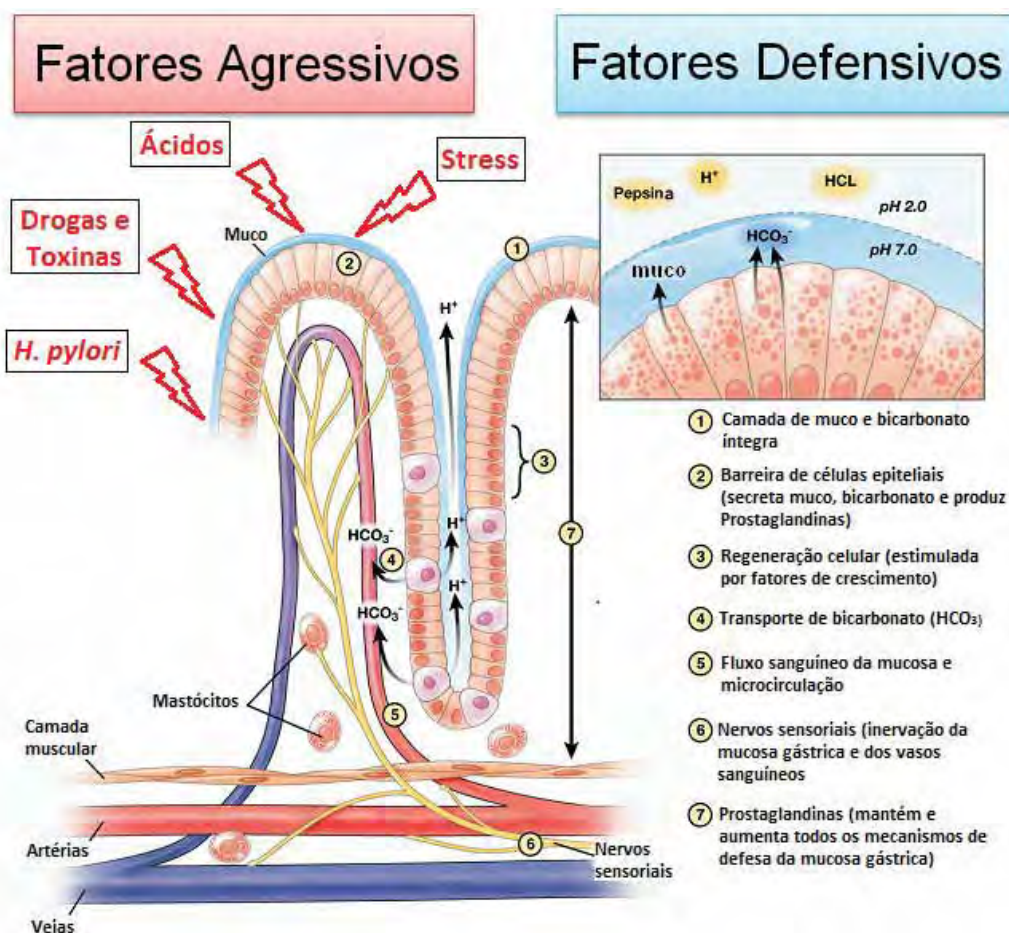


Figura 1 - Fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica. Modificado de Tullasay, Herszényi (2010).

O muco secretado em todo o TGI forma um gel insolúvel aderente à superfície formando uma barreira protetora contra agentes nocivos, enzimas e microorganismos, além de manter o gradiente de pH próximo à neutralidade, impedindo danos à mucosa gástrica. Sua produção é estimulada pelas prostaglandinas que também inibem diretamente a secreção de ácido gástrico pelas células parietais (Tulassay, Herszényi, 2010; Laine et al., 2008; Hoogerewerf, Pasricha, 2007). Esta camada de muco retém o HCO_3^- secretado pelas células epiteliais mantendo um "microambiente" neutro ($\text{pH} \approx 7$) na superfície da mucosa, evitando o contato direto com o ácido (Laine et al., 2008).

Secundariamente, age o epitélio, cujas células superficiais responsáveis pela secreção de muco, HCO_3^- e prostaglandinas, formando uma barreira que impede a retrodifusão de ácido. Caso sofra uma agressão, esta camada celular é capaz de regenerar-se rapidamente (Laine et al., 2008; Wallace, Granger, 1996). Segundo Tulassay, Herszényi (2010) e Wallace (2008), o epitélio gástrico humano é capaz de reparar-se a cada 2 a 4 dias, favorecendo a substituição celular sem prejudicar a continuidade epitelial ou as funções das barreiras protetoras. De acordo com os mesmos autores, este mecanismo ocorre por um processo de extrusão das células antes de as mesmas sofrerem apoptose.

A microcirculação é terceira linha de defesa. Quando há danos à mucosa gástrica, ocorre aumento no fluxo sanguíneo, na tentativa de inibir ou diluir o retorno do ácido secretado pela mucosa. Este mecanismo é essencial para limitar os danos e facilitar a reparação celular (Twardowschy, 2007; Penissi et al., 2003; Wallace, Granger, 1996).

As células do sistema imunológico também contribuem no mecanismo de defesa da mucosa gástrica. Mastócitos e macrófagos reconhecem os agentes agressores, liberando uma grande quantidade de

mediadores químicos que ativam a resposta inflamatória (Twardowschy, 2007; Wallace, Granger, 1996).

Outros agentes apontados como importantes fatores na patogênese da lesão gástrica aguda são as espécies reativas de oxigênio (EROs), radicais livres envolvidos no desenvolvimento da úlcera gástrica, induzidas por: etanol, AINEs, estresse e isquemia e reperfusão (Hamaishi et al., 2006).

A gastrite é a lesão que mais frequentemente afeta o estômago. Segundo Rugge e colaboradores (2011), o termo gastrite define qualquer inflamação (histologicamente confirmada) da mucosa gástrica. Sua forma aguda possui características transitórias e, dificilmente, são observadas em exames de rotina. Na gastrite crônica as lesões podem apresentar-se desde um processo inflamatório superficial até a atrofia do epitélio. Segundo César et al. (2002), cerca de 10% dos pacientes que apresentam atrofia gástrica desenvolvem carcinoma e 60% a 80% destes estão associados com gastrite e úlcera gástrica.

Em lesões gástricas induzidas por etanol, o contato direto deste agente com a mucosa gástrica causa a solubilização do muco protetor deixando-a suscetível às ações do ácido clorídrico e da pepsina, além de elevar a secreção do ácido gástrico que, por contato direto, altera a vascularização local rompendo vasos sanguíneos e desencadeando processos de necrose local (Paula, 2003; Teyssen, Singer, 2003).

Este mecanismo envolve, ainda, a superprodução de radicais livres que desempenham um importante papel na patogênese da lesão gástrica aguda induzida pelo etanol, resultando em danos à mucosa, morte celular, esfoliação e erosão epitelial (Birdane et al., 2007; Hamaishi et al., 2006). O etanol danifica diretamente as células da mucosa gástrica através da hiperoxidação de lipídeos e da formação de radicais livres, provocando uma acentuada diminuição de ácido no lúmen gástrico, morte celular, esfoliação e erosão epitelial (Romão et al., 2010; Birdane et al., 2007; Allem, Flemstrom, 2005). Este fato infere a ação

antiulcerogênica de compostos antioxidantes em modelos de úlcera gástrica induzida por etanol.

O etanol é um composto comumente empregado como agente ulcerogênico capaz de atravessar rapidamente as membranas celulares e, após sua ingestão, cerca de 70% é absorvido no estômago (Vonghia et al., 2008; Birdane et al., 2007). A administração de etanol absoluto causa edema no tecido, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (Ferreira, 2005).

Segundo Glavin e Szabo (1992), dependendo da quantidade e concentração de etanol administrado experimentalmente a animais, a formação de lesões hemorrágicas e ulcerosas ocorrem dentro de 1 a 2 horas após a ingestão. Os mesmos autores revelam que importantes danos gástricos tais como alterações vasculares caracterizadas pela presença de hiperemia focal e hemorragia nas porções lesionadas, ocorrem de 1 a 3 minutos após a indução de lesão gástrica.

2.2 Tratamentos para lesões gástricas

Anteriormente ao desenvolvimento de medicamentos capazes de curar lesões na mucosa gástrica, a ingestão de conchas marinhas moídas era o recurso utilizado para o alívio dos sintomas provocados cujo uso é justificado pela presença de carbonato de cálcio, responsável pela neutralização do ácido gástrico. A partir deste princípio, houve um grande progresso na terapêutica de gastropatias, levando ao desenvolvimento de diversos fármacos (Aihara et al., 2003). Nas afecções do estômago, o controle efetivo da acidez gástrica alivia os sintomas, promove a cura e reduz as recorrências ulcerosas (Giglio et al., 1993).

Atualmente, os agentes mais comumente utilizados na terapêutica de lesões gástricas são os inibidores da bomba de próton, como o omeprazol, e os antagonistas dos receptores de H_2 , como o cloridrato de ranitidina (Gustafson, Welling, 2010; Hoogerwerf, Pasricha, 2007).

A eficácia dos medicamentos é controversa. Segundo Gustafson e Welling (2010) tais medicamentos apresentam 100% de eficácia no tratamento de úlceras gástricas, enquanto que, de acordo com Silva et al. (2006), nenhum fármaco é totalmente eficaz na remissão de tais lesões.

2.2.1 Cloridrato de Ranitidina

Os bloqueadores de receptores H_2 tornaram-se os fármacos mais populares para o tratamento de lesões gástricas, tendo sido introduzidos na década de 70 (Giglio et al., 1993) e se tornaram uma das principais drogas utilizadas na prática clínica no Brasil devido aos leves efeitos colaterais que podem provocar (Coelho et al., 2009).

Nesta classe, formada por drogas análogas à histamina, encontra-se o cloridrato de ranitidina que promove bloqueio seletivo, competitivo e reversível da secreção de ácido gástrico ao impedir a ligação da histamina aos receptores H_2 sem interferir nas demais ações deste mediador químico, sendo capaz de inibir a secreção basal e age na supressão da produção ácida que se encontra estimulada, reduzindo tanto o volume quanto o conteúdo de ácido e pepsina da secreção (Pinho, Romãozinho, 2008; Koda-Kimble et al., 2005; Maranhão et al., 1993).

Este fármaco é indicado para a promoção da cura de úlceras gástricas e duodenais, tratamento da doença de refluxo

gastroesofágico, profilaxia das úlceras de estresse e de estados hipersecretores patológicos (DEF, 2010; Hoogerwerf, Pasricha, 2007).

2.2.2 Fitoterápicos

Apesar de a prática fitoterápica datar de séculos, produtos oriundos de plantas medicinais estão sendo retomados por áreas de conhecimento científico que almejam desvendar as concentrações e constituintes químicos responsáveis por seus efeitos medicinais. As plantas medicinais têm uma grande importância na manutenção da saúde das pessoas e representam parte importante da cultura popular, utilizada e difundida ao longo de várias gerações, sendo muito utilizadas como alternativa à cura de doenças e sintomas, proporcionando uma melhoria na qualidade de vida e oferecendo outra forma de tratamento além dos medicamentos alopáticos (Taufner et al., 2006). Além disso, populações inteiras, muitas vezes, encontram nas plantas o único recurso terapêutico para tratamento e cura de enfermidades (Tomazzoni et al., 2006; Souza-Formigoni et al., 1991).

Atualmente, o mercado mundial de fitoterápicos cresce gradativamente (Yunes et al., 2001). Cerca de 25 a 45% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal (Carvalho, 2006; Castro, Ferreira, 2001). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente 90% da população mundial já fez uso de alguma planta para tratamento de doenças e/ou alívio de sintomas (Brasil, 2006).

Em diversos países, as propagandas desenfreadas relacionadas ao consumo de produtos à base de fontes naturais aumentam a cada dia (Veiga-Junior et al., 2005). O surgimento do conceito de “produto natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas, esse

termo significa a “ausência de produtos químicos” e que, conseqüentemente, estariam livres da possibilidade de provocar qualquer tipo de intoxicação. Este conceito é totalmente equivocado, pois as plantas podem ser fonte de diversas substâncias tóxicas que podem, inclusive, provocar a morte (Oliveira, Gonçalves, 2006; Mengue et al., 2001).

2.2.3 *Punica granatum*

A *Punica granatum* (PG), popularmente conhecida como romã (Figura 2), é uma planta muito utilizada na medicina popular da Europa, Irã, Indo-China, Ilhas Filipinas e América do Sul no tratamento de inúmeras doenças como úlceras, estomatites, problemas hepáticos, acidoses, infecções microbianas, diarreias, vômitos, febre, hemorragias, diabetes, cardiopatias e patologias respiratórias. Empregada como anti-helmíntico, antiviral e antiofídico, é um ótimo adstringente gastrointestinal, por provocar um aumento no nível de secreção biliar. Tem ação antiinflamatória, hemostática, antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, anti-aterosclerótica e contra a queda e embranquecimento dos cabelos. Seu extrato tem se mostrado eficaz no tratamento contra o vírus do herpes e o vírus *Influenza*. Esta planta pode ser consumida na forma de suco da fruta e de extratos de diferentes partes, desde a polpa dos frutos à sua casca, com exceção de suas raízes e casca de seu arbusto que são tóxicas (Lee et al., 2010; Jurenka, 2008; Werkman et al., 2008; Lansky, Newman, 2007; Adams et al., 2006; Wang et al., 2006; Ajaikumar et al., 2005; Lei et al., 2003; Vidal et al., 2003).



Figura 2 - Fruto de *Punica granatum* (Fonte: <http://www.art.com/products/p13061377-sa-i2261895/reinhard-pomegranate-fruit-punica-granatum.htm>).

A romãzeira é um arbusto sazonal nativa da Pérsia e cultivada inicialmente no Irã e Afeganistão. Foi introduzida na China no século II a.C. e levada para o mediterrâneo pelos fenícios de onde se difundiu para as Américas (Wang et al., 2006). As partes deste fruto são ricas em polifenóis que conferem uma atividade antioxidante; três vezes maior que vinho tinto e chá verde. É rica em fibras, pectina, açúcares e flavonóides como taninos (punicalina, pedunculagina, punicalagina, ácido gálico e ácido elágico) que conferem 92% da atividade antioxidante à fruta e antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina) responsáveis pela cor avermelhada da fruta e por diminuir a permeabilidade dos vasos sanguíneos em processos inflamatórios (Lee et al., 2010; Jurenka, 2008; Ebadi, 2007; Wang et al., 2006; Hidaka et al., 2005; Afaq et al., 2005; Alcaraz, Carvalho, 2004; Vidal et al., 2003; Cerdá et al., 2003; Noda et al., 2002). Entretanto, suas concentrações podem variar de acordo com a

variedade do fruto assim como das condições agro-climáticas e ambientais (Al-Maiman, Ashmad, 2002).

O suco da romã é uma importante fonte de compostos fenólicos, sendo as antocianinas a mais importante. Esses componentes, quando associados a taninos do tipo gálico, derivados do ácido elágico e outros taninos hidrolisáveis, contribuem para a atividade antioxidante da fruta (Miguel et al., 2004). O ácido fenólico e o ácido tânico, presentes em extratos de plantas, promovem proteção na mucosa gástrica contra vários agentes necrotizantes. O primeiro é responsável por promover ação anti-secretora de ácido e o segundo inibe a secreção de enzimas como a pepsina, entretanto, se associado à mucina, prejudica a ação dos mecanismos de defesa gástrica (Khenouf et al., 2003).

O composto mais abundante dentre os polifenóis é a punicalagina, presente na casca do fruto e no suco comercial industrializado de PG. É considerado o constituinte bioativo responsável por mais de 50% da atividade antioxidante da romã, estando presente em uma quantidade superior a 2g para cada litro de suco (Adams et al., 2006; Seeram et al., 2005; Cerdá et al., 2003).

Segundo Schubert (1999) citado por Afaq et al. (2005) e Seeram et al. (2006), a fermentação e a extração a frio do suco de romã pode reduzir a formação de prostaglandinas e leucotrienos pela inibição da atividade da cicloxigenase e lipoxigenase.

As prostaglandinas são responsáveis por sintetizar, basicamente, as isoformas de ciclooxigenase (COX) do tipo 1 e 2 (COX-1 e COX-2). A primeira é responsável pela produção de prostaglandinas, que é fisiologicamente importante para funções homeostáticas, como a manutenção da integridade da mucosa e o fluxo sanguíneo da mucosa. A COX-2 não é expressa constitutivamente em alguns tecidos, mas sua regulação torna-se elevada no organismo durante o processo patológico (Aguiar-Jr et al., 2011; Zhao et al., 2009; Adams et al., 2006).

De acordo com Lansky e Newman (2007), o suco de PG promove uma maior expressão de prostaglandinas após 20 minutos a 6 horas após o consumo. Segundo estudo realizado por Adams et al. (2006) em cultura de células cancerígenas, a dose de 50mg/L de punicalagina é capaz de suprimir a expressão da enzima COX-2 em 48%, enquanto a administração de suco comercial industrializado concentrado de romã diminui em 79% quando comparados ao grupo controle tratado somente com Fator de Crescimento Tumoral Alfa (TNF- α).

Com incentivo da OMS para o estudo de plantas medicinais e, tendo em vista as evidências sobre as propriedades terapêuticas da PG, o presente trabalho avaliou a ação antiulcerogênica da romã, qualificando sua atividade curativa e preventiva em lesões gástricas.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho avaliou a ação de diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* e do suco comercial industrializado de *Punica granatum* quanto à sua atividade curativa e preventiva em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais desta Universidade sob os protocolos 036/2009 e 043/2009 (Anexos A e B).

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus*, variação *albinus*, adultos, machos, com idade média de seis meses, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente média de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os mesmos foram alimentados com ração padrão e água potável, fornecidos *ad libitum*.

4.2 Extrato hidroalcoólico de casca de *Punica granatum*

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) foi responsável pelo preparo do extrato de PG. Os frutos foram adquiridos em mercado público na cidade de João Pessoa, Paraíba e identificados botanicamente no Herbário Lauro Xavier do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (nº. JPB 36702), onde também foi realizada toda a preparação do extrato hidroalcoólico de frutos de *Punica granatum* Linn.

Para o preparo do extrato, os frutos foram lavados em água corrente e a casca do fruto foi separada e mantida em estufa (Marconi[®], Piracicaba, SP, Brasil) a 33°C, durante uma semana, para secagem do material e consequente estabilização do conteúdo enzimático. Posteriormente, o material foi triturado em pó em moinho elétrico (Solab[®], Piracicaba, SP, Brasil) e submetido ao processo de extração dos princípios ativos através do método de lixiviação - ou percolação - em fluxo contínuo à temperatura ambiente. Não foi utilizada a extração a quente a fim de se manter a estabilidade do material uma vez que a matéria é rica em polifenóis que podem sofrer fácil modificação estrutural se submetida a mudanças de temperatura.

No método empregado, foram utilizados cerca de oito litros de solução hidroalcoólica a 80% v/v (Vetec[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil), renovada constantemente, para cada quilo de matéria-prima (casca do fruto) seca e pulverizada durante um período de vinte e quatro horas. Decorrido este tempo, houve a extração total dos princípios ativos.

Ao final, foram recuperados 6.600mL do extrato que foi filtrado em papel poro de 0,7µm de diâmetro (Mellita[®], Avaré, SP, Brasil) para retirada de impurezas e acondicionados em frascos âmbar limpos, secos e estocados em câmara fria.

A etapa seguinte teve por objetivo a concentração da solução extrativa em nível de extrato fluido 1:1 (p/v). Procedeu-se à concentração do extrato em rota-vapor (IKA-WERK[®], Breisgau, Alemanha), a uma temperatura constante de 45°C para se preservar a estabilidade do material e promover a total evaporação do etanol.

Posteriormente, o material foi enviado à Universidade de São Paulo, onde foi liofilizado.

4.3 Extrato hidroalcoólico de casca de *Punica granatum* industrializado

O extrato hidroalcoólico de casca de PG (Pomegranate – extrato seco), denominado "extrato seco" pelo fabricante, foi obtido em Farmácia de Manipulação (Becker Pharmacia de Manipulação - São José dos Campos, SP, Brasil) através de importador (Xian Acetar Bio Tech[®], China). O produto veio acompanhado de certificado de análise bioquímica e microbiológica (Anexo C e D).

4.4 Suco comercial industrializado de *Punica granatum*

O suco comercial industrializado de PG (Sadaf[®] – Pomegranate Concentrate) foi obtido em comércio de Nova York, EUA. O produto é livre de conservantes e/ou aditivos.

4.5 Cloridrato de Ranitidina

A droga Cloridrato de Ranitidina (Medley[®], Campinas, SP, Brasil) foi obtida em drogaria local (São José dos Campos, SP, Brasil).

4.6 Indução de lesão gástrica

As lesões gástricas foram induzidas pela administração de solução de etanol a 99,5% (LabSynth[®], Diadema, SP, Brasil), na

quantidade de 1mL por animal, por via orogástrica, através da técnica de gavagem.

4.7 Grupos experimentais

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em um grupo controle (CO) (n=08) – sem indução de lesão gástrica e sem a administração de qualquer substância terapêutica; em grupo etanol (Et) (n=08) – que recebeu somente etanol para indução de lesões gástricas, porém sem tratamento e os animais restantes foram divididos em dois grandes grupos experimentais: o de tratamento curativo e o de tratamento preventivo. Cada grande grupo foi dividido em subgrupos (n=08) que receberam uma das seguintes substâncias terapêuticas:

- o Água destilada - (Ad)
- o Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg - (R150)
- o Cloridrato de Ranitidina em dosagem alométrica 4,13mg/kg - (Ralm)
- o Suco industrializado de PG concentrado - (Sc)
- o Suco industrializado de PG diluído (1:9, v/v) - (Sd)
- o Extrato seco de PG 250mg/kg - (POM250)
- o Extrato seco de PG 500mg/kg - (POM500)
- o Extrato hidroalcoólico de PG 250mg/kg - (PG250)
- o Extrato hidroalcoólico de PG 500mg/kg - (PG500)

Todas as substâncias foram administradas em um volume de 1mL, diluídas em água destilada, quando necessário. A dosagem alométrica utilizada para a administração da ranitidina é uma equivalência

entre a dosagem dada aos animais e a dosagem utilizada usualmente em humanos, segundo tabela de alometria – uma escala de parâmetros fisiológicos que comparam animais de vários tamanhos, sendo esta mesma escala utilizada para parâmetros farmacocinéticos (Felippe, 2005). Assim, a dosagem alométrica de ranitidina utilizada para ratos comparada à do homem foi de 4,13mg/kg. O suco industrializado de PG concentrado consiste na administração do produto como foi adquirido, sem quaisquer diluições; enquanto que o suco industrializado de PG diluído foi preparado conforme instruções do fabricante, ou seja, uma parte de suco foi diluída em 9 partes de água destilada (1:9, v/v). As dosagens de 250 e 500mg/kg dos extratos hidroalcoólico de casca e de frutos de PG seguiram o protocolo proposto por Ajaikumar e colaboradores (2005).

No grupo de tratamento preventivo, os animais foram tratados com uma das substâncias terapêuticas supracitadas para, após duas horas, ser administrado etanol e após uma hora serem sacrificados (Figuras 3). O grupo de tratamento curativo recebeu primeiramente etanol para indução de lesão gástrica e, após uma hora, foi administrado uma das substâncias terapêuticas utilizadas neste protocolo para, duas horas depois, serem sacrificados (Figura 4).

Doze horas antes do início dos tratamentos, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas anticoprofágicas, com quatro animais cada, privados de alimentação sólida e água.

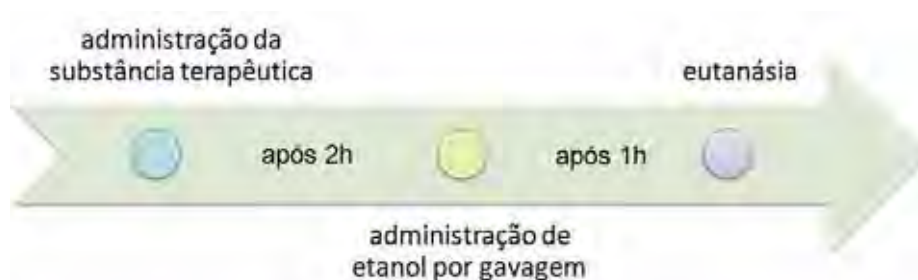


Figura 3 - Esquema utilizado no tratamento preventivo.



Figura 4 - Esquema utilizado no tratamento curativo.

4.8 Eutanásia e coleta de material

Todos os animais foram anestesiados com administração intramuscular de solução anestésica de xilazina (Anasedam[®]) – 2,3g/100mL – e ketamina (Dopalen[®]) – 1,16g/10mL, na proporção de 0,8mL/0,5mL, na dose de 0,1mL/100g. Após este procedimento, os animais foram colocados em decúbito dorsal e foi realizada uma incisão tóraco-abdominal, seguida de sangramento por secção cardíaca.

O estômago de cada animal foi pinçado na altura do esôfago e do duodeno, para se evitar extravasamento do conteúdo gástrico, e removido. Foi realizada uma pequena perfuração na região da grande curvatura a fim de coletar o conteúdo gástrico para a determinação do pH. Através de uma incisão ao longo da grande curvatura, o órgão foi aberto para, posteriormente, ser fixado em formol 10% e enviado para preparo da análise histológica.

4.9 Análise do pH gástrico

Imediatamente após a remoção do estômago, o conteúdo gástrico foi coletado - através de perfuração na região da grande

curvatura - em recipiente individual, para cada animal (Figura 5). O pH do conteúdo estomacal foi mensurado com o auxílio de pHmetro portátil (modelo HI 9224, Hanna Instruments®, Itália).



Figura 5 - Mensuração do pH do conteúdo gástrico com pHmetro.

4.10 Análise histopatológica

Os estômagos removidos e abertos através da grande curvatura foram fixados em formol a 10% por pelo menos 48 horas e encaminhados para processamento histológico. A região de corpo do estômago foi selecionada para a inclusão em parafina e posterior coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) de forma que todas as amostras seguissem uma mesma padronização (Figura 6).



Figura 6 - Imagem de estômago antes da fixação em formol 10% e indicação da região selecionada para inclusão (*)

A análise histopatológica avaliou a área ulcerada (AU) e o índice de inibição de ulceração (IU%) de cada substância terapêutica empregada.

Para cada corte histológico, de cada animal, as lesões gástricas foram fotografadas utilizando-se microscópio de luz Axioskop 40 (Carl Zeiss®, Göttingen, Alemanha) e máquina fotográfica *Power Shot A640* (Cannon®, China).

A determinação da AU possibilitou obter o cálculo da IU% de cada substância terapêutica empregada utilizando-se metodologia de Abdulla et al. (2009). Desta forma, todas as áreas lesionadas do epitélio foram fotografadas e a AU foi determinada, em micrômetros (μm) através do *Software Image Tool 3.0* (Figura 7). A soma de todas as AU, de cada animal, determinou a média aritmética para cada subgrupo terapêutico.

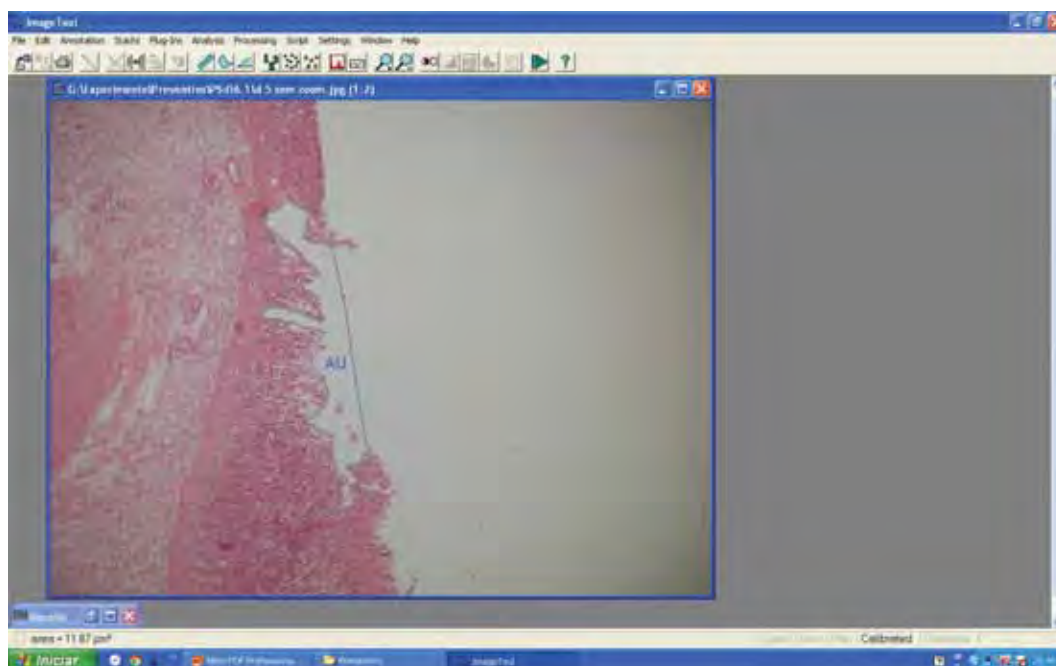


Figura 7: Determinação da área ulcerada (AU) utilizando-se o *Software Image Tool 3.0*

A partir deste dado, o IU% de cada substância terapêutica foi calculado considerando-se a seguinte fórmula:

$$IU\% = [AU_{\text{controle}} - AU_{\text{tratamento}}] \div AU_{\text{controle}} \times 100$$

Onde, o IU% é igual à diferença entre as médias das AUs do grupo controle e do grupo tratado, dividida pela média da AU do grupo controle, multiplicada por cem (Abdulla et al., 2009). Para este cálculo, considerou-se como grupo controle para o tratamento curativo aquele que promoveu 100% de ulceração, isto é, o grupo tratado com etanol. Para o tratamento preventivo foi considerado o grupo tratado com água destilada como grupo controle, isto é, o grupo tratado com substância sem efeito terapêutico.

4.11 Análise Estatística

Os dados obtidos na análise do pH e na determinação da AU e índice de IU% foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de Bonferroni ou de Tukey através do *Software GraphPad Prism 5 Project*, onde também foram obtidas as médias aritméticas de cada análise estatística, com seus respectivos erros padrão da média para cada grupo de tratamento. Foi considerado resultado estatisticamente significativo para intervalo de confiança menor ou igual a 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise do pH gástrico

5.1.1 Efeito das substâncias utilizadas no tratamento curativo de lesões gástricas

De acordo com os resultados (Tabela 1 e Figura 8), somente o grupo tratado com POM500, após a indução da lesão gástrica, não foi capaz de alterar pH do conteúdo gástrico mensurado com o pHmetro quando comparado ao grupo controle.

O grupo tratado com Sc foi estatisticamente diferente de todos os demais grupos experimentais, sendo o único que apresentou acentuada redução do pH. Efeito oposto ocorreu com os animais tratados com PG500, pois apresentaram significativo aumento do pH mensurado quando comparados aos outros subgrupos de tratamento.

O grupo Ad apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos CO, POM500, Sc e PG 500; o grupo POM500 foi estatisticamente diferente dos grupos Ad, Sc e PG 500 e o grupo Sd diferenciou-se dos grupos CO, Et, Sc e PG500. Os grupos Et, Ral, R150, POM250 e PG250 não apresentaram diferenças entre si.

Tabela 1 - Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento curativo de cada subgrupo terapêutico

Subgrupo Terapêutico	pH
CO	5.10 ± 0.33 a
Et	7.41 ± 0.09 b
Ad	7.14 ± 0.12 c
Ral	7.23 ± 0.03 b
R150	7.24 ± 0.08 b
POM250	7.01 ± 0.06 b
POM500	6.04 ± 0.23 d
Sc	3.54 ± 0.15 e
Sd	6.98 ± 0.17 f
PG250	7.01 ± 0.58 b
PG500	8.99 ± 0.31 g

Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento curativo de cada subgrupo terapêutico. a - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos, exceto POM500; b - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, Sc, PG500; c - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, POM500, Sc, PG500; d - $p < 0,0001$ comparado aos grupos Ad, Sc, PG500; e - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos; f - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, Et, Sc, PG500; g - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos (ANOVA seguido de Bonferroni).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

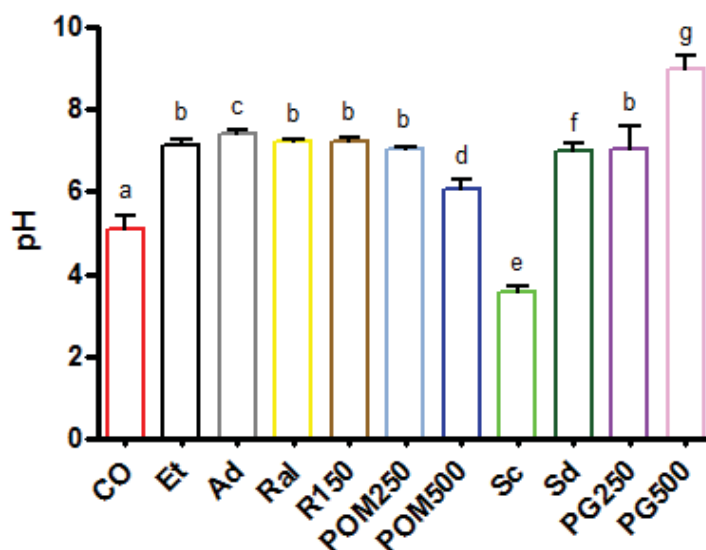


Figura 8 - Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento curativo de cada subgrupo terapêutico. a - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos, exceto POM500; b - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, Sc, PG500; c - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, POM500, Sc, PG500; d - $p < 0,0001$ comparado aos grupos Ad, Sc, PG500; e - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos; f - $p < 0,0001$ comparado aos grupos CO, Et, Sc, PG500; g - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos (ANOVA seguido de Bonferroni).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

5.1.2 Efeito das substâncias utilizadas no tratamento preventivo de lesões gástricas

No tratamento preventivo, o grupo CO mostrou-se estatisticamente diferente dos grupos Et, Ral, R150, POM250 e PG500. Somente o grupo tratado com Sc apresentou significativa diminuição do pH do conteúdo gástrico quando comparado aos demais subgrupos terapêuticos, exceto o grupo CO. Os grupos CO, Ad, POM500, Sc e Sd apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo Ral (Tabela 2 e Figura 9).

Tabela 2 - Média do pH do conteúdo gástrico mensurado com pHmetro no tratamento preventivo de cada subgrupo terapêutico

Subgrupo Terapêutico	pH
CO	5.10 ± 0.33 - c
Et	7.14 ± 0.12 - a
Ad	6.08 ± 0.49 - c
Ral	8,57 ± 0,12 - a
R150	7.41 ± 0.02 - a
POM250	7.12 ± 0.63 - a
POM500	6.64 ± 0.34 - c
Sc	3.73 ± 0.08 - b,c
Sd	6.60 ± 0.21 - c
PG250	6.77 ± 0.51
PG500	7.22 ± 0.58 - a

Média do pH gástrico mensurado com o pHmetro no tratamento preventivo de cada subgrupo terapêutico. a - $p < 0,0001$ comparado grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos, exceto CO; c - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Ral (ANOVA seguido de Bonferroni).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

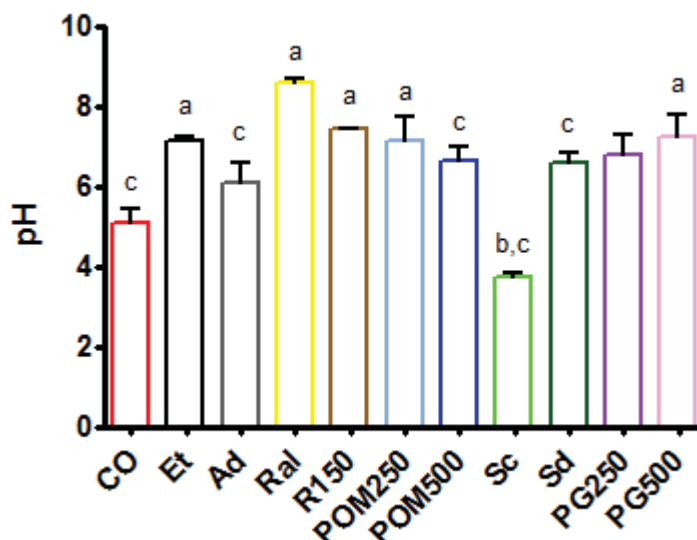


Figura 9 - Média do pH gástrico mensurado com o pHmetro no tratamento preventivo de cada subgrupo terapêutico. a - $p < 0,0001$ comparado grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos, exceto CO; c - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Ral (ANOVA seguido de Bonferroni).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

5.2 Análise histopatológica

5.2.1 Área ulcerada e porcentagem de inibição de ulceração no tratamento curativo de lesões gástricas

No tratamento curativo, somente o grupo tratado com PG500 apresentou elevado aumento na formação de lesões gástricas quando comparado aos demais tratamentos. Os grupos tratados com PG250 e PG500 mostraram-se estatisticamente diferente do grupo CO, e o grupo PG250 também apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos R150, POM500 e PG500 (Figura 10, Tabela 3).

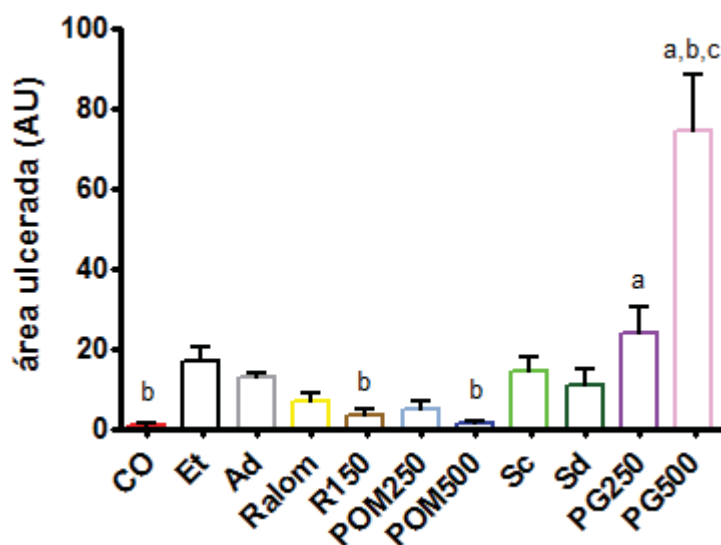


Figura 10 - Área ulcerada (AU) de cada subgrupo terapêutico no tratamento curativo. a - $p < 0,0001$ comparado ao grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo PG250; c - $p < 0,0001$ comparado aos demais subgrupos terapêuticos (ANOVA seguido de Tukey). CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

Os índices de inibição de ulceração (IU%) de cada substância terapêutica podem ser visualizados na Tabela 3. Os grupos tratados com Ral, R150, POM250, POM500, Sc e Sd apresentaram resultados positivos nesta análise, com IU% iguais a 58,47%, 79,83%, 71,91%, 84,47%, 15,33% e 36,04%, respectivamente. Os grupos tratados com PG250 e PG500 não foram capazes de tratar a formação de lesões na mucosa gástrica. O grupo Ad apresentou IU% de 24,54%.

Tabela 3 - Área ulcerada e índice de inibição de ulceração de acordo com os subgrupos terapêuticos no tratamento curativo

Grupo tratado	Área ulcerada (AU)	Índice de inibição de ulceração (IU%)
CO	0,75 ± 0,61 - b	-
Et	16,73 ± 3,79	0
Ad	12,63 ± 1,21	24,54
Ral	6,95 ± 2,13	58,47
R150	3,37 ± 1,69 - b	79,83
POM250	4,69 ± 2,07	71,97
POM500	2,60 ± 0,42 - b	84,47
Sc	14,17 ± 3,47	15,33
Sd	10,70 ± 3,94	36,04
PG250	23,64 ± 6,54 - a	-41,31
PG500	74,46 ± 13,66 - a,b,c	-345,08

a - $p < 0,0001$ comparado ao grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo PG250; c - $p < 0,0001$ comparado ao grupo PG500 (ANOVA seguido de Tukey).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

5.2.2 Área ulcerada e porcentagem de inibição de ulceração no tratamento preventivo de lesões gástricas

No tratamento preventivo, somente os grupos tratados com Ad e PG 250 promoveram significativo aumento de área lesionada significativo quando comparados ao grupo CO. O grupo PG500 preveniu significativamente a formação de lesões gástricas comparado ao grupo Ad (Figura 11, Tabela 4).

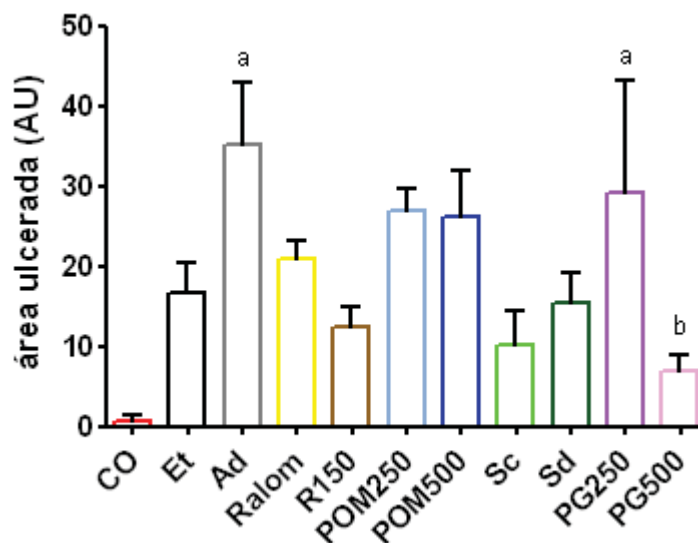


Figura 11 - Área ulcerada (AU) de cada subgrupo terapêutico no tratamento preventivo. a - $p < 0,0001$ comparado ao grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Ad (ANOVA seguido de Tukey).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

Com relação à IU%, os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Área ulcerada e índice de inibição de ulceração de acordo com os subgrupos terapêuticos no tratamento preventivo

Grupo tratado	Área ulcerada (AU)	porcentagem de inibição de ulceração (i%)
CO	0,75 ± 0,61	-
Et	16,73 ± 3,79 - a	-
Ad	35,04 ± 7,89	0
Ral	21,03 ± 2,12	39,98
R150	12,40 ± 2,49	64,61
POM250	26,84 ± 2,87	23,40
POM500	26,19 ± 5,68	25,26
Sc	10,12 ± 4,38	71,12
Sd	15,31 ± 3,9	56,31
PG250	29,13 ± 14,02 - a	16,87
PG500	6,82 ± 2,22 - b	80,53

a - $p < 0,0001$ comparado ao grupo CO; b - $p < 0,0001$ comparado ao grupo Ad (ANOVA seguido de Tukey).

CO = Grupo Controle; Et = Grupo etanol; Ad = Grupo Água destilada; Ral = Grupo Cloridrato de Ranitidina alométrica; R 150 = Grupo Cloridrato de Ranitidina 150mg/kg; POM 250 = Grupo extrato seco de PG a 250mg/kg; POM 500 = Grupo extrato seco de PG a 500mg/kg; Sc = Grupo suco industrializado de PG concentrado; Sd = Grupo suco industrializado de PG diluído; PG250 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 250mg/kg; PG500 = Grupo extrato hidroalcoólico de PG a 500mg/kg.

De acordo com os resultados, todas as substâncias terapêuticas foram capazes de prevenir a formação de lesão gástrica. Os grupos tratados com PG500 e Sc foram que apresentaram os melhores resultados com relação à IU%.

6 DISCUSSÃO

Dentre as inúmeras doenças que incidem na população, as lesões gástricas representam uma das mais importantes, pois afetam um número considerável de pessoas em todo o mundo (Donatini et al, 2009). O álcool é um dos principais agressores do TGI no homem, podendo afetar a estrutura e função de seus órgãos e, também, do sistema nervoso central (Medeiros, 2006).

O modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol é um dos principais modelos utilizado para elucidar a possível ação e efeito de diversos compostos com potencial gastroprotetor, bem como para o estudo de lesões gástricas agudas. Apesar de as lesões em roedores serem mais superficiais e em maior número, este modelo continua sendo de grande valia para estudos experimentais (Potrich, 2009).

Diversas plantas são mencionadas pela cultura popular por suas ações terapêuticas (Lira et al., 2005). A OMS acredita que 80% da população mundial tenham como principal opção terapêutica as plantas medicinais (Tomazzoni et al., 2006). Segundo levantamento realizado por Carvalho e colaboradores (2008), existem 512 medicamentos fitoterápicos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entre os quais *Ginkgo biloba* (ginkgo), *Aesculus hippocastanum* (castanha-da-índia), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Glycine max* (soja), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Panax ginseng* (ginseng), *Cassia angustifolia*, *Cassia senna* e *Senna alexandrina* (sene), *Mikania glomerata* (guaco), *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) e *Peumus boldus* (boldo) são as espécies com maior número de registros.

A romã tem sido empregada há séculos no âmbito nutricional e medicinal, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias (Lee et al., 2010; Bialonska et al., 2009). É considerada um dos frutos medicinais mais antigos descritos na história, sendo

amplamente comercializada e consumida na Europa e Ásia, o que a torna de grande interesse à indústria devido aos seus benefícios (Fadavi et al., 2011; Opara et al., 2008).

Atualmente, a população está cada vez mais consciente da contribuição da dieta para com a saúde e qualidade de vida; e existe um grande interesse mundial em melhorar a qualidade da alimentação e, conseqüentemente, prevenir inúmeras doenças (Mena et al., 2010; Stringheta et al., 2007).

Segundo Johanningsmeier e Harris (2011) e Fadavi e colaboradores (2005), a romã é um fruto que pode ser consumido fresco ou como suco, o que tem levado a um aumento na disponibilidade de produtos como sucos industrializados no comércio. A comercialização de produtos deste gênero deve-se, principalmente, à promessa da proteção contra radicais livres; entretanto, a maioria dos fabricantes não fornece informações sobre sua composição ou dados sobre seu poder antioxidante (Davalos et al., 2003).

O modelo de úlcera gástrica induzida por etanol provoca injúrias ao tecido por solubilização do muco protetor, elevando a secreção de ácido gástrico e aumenta a permeabilidade vascular e o rompimento dos vasos sanguíneos, provocando a formação de erosões e hemorragia gástrica aguda em humanos (Zhao et al., 2009; Ajaikumar et al., 2005; Glavin, Szabo, 1992).

No presente trabalho, por apresentar um delineamento experimental de caráter agudo, as lesões formadas apresentaram-se como estrias hemorrágicas distribuídas ao longo do eixo dos estômagos e os danos só foram detectados microscopicamente. Tais achados sugerem um prejuízo no fluxo sanguíneo local e conseqüente desequilíbrio entre os fatores agressivos e defensivos da mucosa gástrica.

Os resultados obtidos indicam que os grupos tratados com PG250 e PG500, após a indução da lesão gástrica, apesar de elevarem o pH do conteúdo gástrico, não promoveram redução da área

ulcerada; enquanto que no grupo tratado com Sc, observou-se um baixo pH do conteúdo estomacal e inibição da formação de úlceras gástricas em 15,33%. Os grupos tratados com POM250 e POM500 apresentaram resultados semelhantes ao grupo tratado com ranitidina, ou seja, o pH intragástrico destes grupos estava elevado e houve redução dos danos ao órgão.

Em grupos de ratos submetidos ao tratamento preventivo, observou-se que todas as substâncias terapêuticas utilizadas preveniram, em variados graus de intensidade, a formação de lesões nos estômagos, sendo o PG500 e Sc melhores que R150.

O mecanismo de ação dos extratos e do suco comercial industrializado de PG deve estar relacionado à promoção da síntese de prostaglandinas, substâncias estas que possuem a capacidade de inibir a secreção ácida, aumentando a produção de muco e bicarbonato, além de acelerarem o processo de cicatrização (Wallace, 2008; Ajaikumar et al., 2005).

As prostaglandinas são capazes de diminuir ou inibir a intensidade de liberação de mediadores químicos inflamatórios como a histamina, o $\text{TNF-}\alpha$, o fator ativador de plaquetas, dentre outros, uma vez que estes aumentam a susceptibilidade de danos à mucosa gástrica (Wallace, 2008; Eamlamnam et al., 2006; Wallace, Granger, 1996). Desta forma, a síntese de prostaglandinas é crucial para a manutenção da integridade e proteção da mucosa gástrica contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes (Luiz-Ferreira et al., 2010).

Adams et al. (2006) avaliaram os efeitos da PG na sinalização de proteínas presentes em células inflamatórias em cultura de células cancerígenas e observou que o tratamento realizado com suco comercial industrializado de PG, com um concentrado de punicalagina e com um extrato de PG rico em taninos, diminuíram significativamente a expressão de COX-2 induzida por $\text{TNF-}\alpha$.

Al-Yahya e colaboradores (2005) ao utilizarem extrato etanólico da casca de PG (500mg/kg), trinta minutos antes da indução de lesões gástricas por etanol 80%, demonstraram que a romã não inibiu danos à mucosa, porém, reduziu a intensidade das lesões; e que estes resultados revelaram que o extrato etanólico da casca de PG possui um efeito antiinflamatório, com efeito semelhante ao dos AINEs.

Segundo Khenouf (2003) e Gharzouli et al. (1999) polifenóis presentes na PG, como punicalina, punicalagina, ácido elágico e outros, são capazes de inibir a bomba de prótons presente nas células parietais que compõem a mucosa gástrica além de possuírem propriedades antioxidantes. Lee et al. (2010) afirmam que estes compostos apresentam uma atividade antiinflamatória efetiva através da inibição da produção de radicais livres. Desta forma, a presença de flavonóides pode estar associada com a ação preventiva de úlceras gástricas (Stermer, 2002).

O presente estudo confirma a ação da PG na ação contra lesões gástricas. O fato de os extratos de PG250 e PG500 não terem apresentado uma resposta positiva no tratamento curativo, pode ser devido às lesões formadas na mucosa pela potente ação necrotizante do álcool e, uma única dose não tenha sido suficiente para reparar os danos já estabelecidos. Ainda, a inibição da secreção do ácido gástrico pelas prostaglandinas, em roedores, ocorre em doses bem mais elevadas que aquelas requeridas pelo organismo humano quando há contato com agentes nocivos (Wallace, 2008).

Além da ação da PG e sua comparação com a ranitidina, um medicamento alopático com ações e mecanismos bem definidos na literatura, também foi avaliada a ação da ranitidina em dosagem alométrica, uma vez que a dosagem habitual (150mg/kg) utilizada em humanos poderia ser considerada alta para roedores. Desta forma, foi utilizado o sistema alométrico e a dose equivalente para ratos foi de 4,13mg/kg, uma dose 36 vezes menor que a equivalente em humanos.

Os dados referentes ao Cloridrato de Ranitidina mostraram resultados consistentes na comparação das duas dosagens, nos dois tempos de tratamento. O pH intragástrico, a área ulcerada e o índice de inibição de úlcera dos grupos tratados com Ral e R150 apresentaram resultados semelhantes, seja no tratamento curativo, seja no preventivo, mostrando a não necessidade de extrapolação de dosagens entre roedores e humanos para esta droga.

Apesar de muitas lacunas, este estudo sugere que pesquisas mais aprofundadas devem ser realizadas para elucidar quais e qual a quantidade dos compostos ativos em cada um dos extratos e do suco de *Punica granatum* utilizados, a fim de determinar o correto mecanismo de ação de tais substâncias, assim como as possíveis interações que possam ocorrer no organismo.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

a) Para tratamento curativo, o extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* industrializado (extrato seco), assim como o suco comercial industrializado de romã são úteis no combate à lesões gástricas induzidas por etanol;

b) Todas as substâncias terapêuticas utilizadas no tratamento preventivo foram capazes de prevenir a ulceração da mucosa gástrica. O suco comercial industrializado de romã concentrado e o extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* na dosagem de 500mg/kg apresentaram os melhores resultados;

c) O extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* não apresentou ação antiulcerogênica no tratamento curativo;

d) O suco comercial industrializado de romã diluído, o extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* industrializado (extrato seco) e o extrato hidroalcoólico da casca de *Punica granatum* na dosagem de 250mg/kg não preveniram a formação de úlceras gástrica.

8 REFERÊNCIAS*

Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. J Agric Food Chem. 2006;54(3):960-985.

Abdulla MA, Ali HM, Ahmed KAA, Noor SM, Ismail S. Evaluation of the anti-ulcer activities of *Morus alba* extracts in experimentally-induced gastric ulcer in rats. Biomed Research 2009,20(1):35-39.

Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin and hydrolysable Tannin rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B Parthways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer. 2005;113(3):423-433.

Aguiar-Junior O, Gollücke APB, de Moraes BB, Pasquini G, Catharino RR, Riccio MF, et al. Grape Juice concentrate prevents oxidative DNA damage in peripheral blood cells of rats subjected to a high-cholesterol diet. Brt J Nutr. 2011;105(5):694-702.

Aihara T, Nnakamura E, Amagase K, Tomita K, Fujishita T, Furutani K, et al. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present and future. Pharmacol Ther. 2003;98(1):109-127.

Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. J Ethnopharmacol. 2005;96(1-2):171-176.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Alcaraz MJ, Carvalho JCT. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. In: Carvalho JCT. Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd; 2006. p.79-100.

Al-Maiman SA, Ashmad D. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. Food Chem. 2002;76:437-41.

Al-Yahya MA. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on the rind of pomegranate (*Punica granatum* L). Pak J Biol Sci. 2005;8(3):479-81.

Allen A; Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. Am J Physiol Cell Physiol. 2005;288(1):1-19.

Bialonska D; Kasimsetty SG; Schrader KK; Ferreira D. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) by products and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. J Agric Food Chem. 2009;57(18):8344-49.

Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gulçin I, Buyukokoroglu ME. Beneficial of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. World J Gastroenterol. 2007 Jan 28; 3(4):607-11.

Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas medicinais da Central de Medicamentos/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

Bujanda L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. The Am J Gastroenterol. 2000 Dec;95(12):3374-82.

Carrillo PLL, Mauro MYC. O trabalho como fator de risco ou fator de proteção para o consumo de álcool e outras drogas. Texto e contexto Enfermagem. 2004 Abr/Jun;13(2):217-25.

Carvalho JE. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. MultiCiência. 2006 Out; 7: 1-18.

Carvalho ACB; Balbino EE; Maciel A; Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Braz J Pharmacogn. 2008 Abr/Jun;18(2):314-19.

Castro HG, Ferreira FA. A dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. Ver Bras Pl Med. 2001;3(2):19-21.

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA, Espin JC. Repeted oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. J Agric Food Chem. 2003;51(11):3493-501.

César ACG, Silva AE, Tajara EH. Fatores genéticos e ambientais envolvidos na carcinogênese gástrica. Arq Gastroenterol. 2002 Out/Dez; 39(4):253-9.

Coelho CBT; Dragosavac D; Coelho-Neto JSC; Montes CG; Guerrazzi F; Andreollo NA. Ranitidine is unable to maintain gastric pH levels above 4 in septic patients. J Crit Care. 2009;24:627.e7-627.e13.

Cui G; Waldum HL. Physiological and clinical significance of enterochromaffin-like cell activation in the regulation of gastric acid secretion. World J Gastroenterol. 2007 Jan;13(4):493-496.

Davalos A; Gómez-Cordovés C; Bartolomé B. Commercial Dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. J Agric Food Chem. 2003;51(9):2512-9.

Dicionário de Especialidades Farmacêuticas DEF 2010/11. 39ª ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas; 2010.

Donatini RS, Ishikawa T, Barros SBM, Bacchi EM. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). Rev Bras Farmacogn. 2009 Jan/Mar;19(1A):89-94.

Eamlamnam K; Patumraj S; Visedopas N; Thong-Ngam T. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. World J Gastroenterol. 2006 Apr;13(13):2034-9.

Ebadi M. Pharmacodynamic basis of herbal medicine. 2 ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2007, 699 p.

Fadavi A; Barzegar M; Azizi MH; Bayat M. Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. Food Sci Tech Int. 2005;11(2):113-9.

Felippe PAN. Sistema alométrico ou cálculo de dosagem por taxa metabólica do animal [documento da Internet]. Campinas: Unicamp; 2005 [citado 15 ago 2008]. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/ceea/files/ceea/calculo.doc>.

Ferreira AL. Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 2005.

Gharzouli K; Khenouf S; Amira S; gharzouli A. Effects os aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-alba* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. Phytother Res. 1999;13(1):42-5.

Giglio AE, Osmo AA, Rodrigues SHP, Quintal VS. Bloqueadores H₂ e outros antiácidos sistêmicos. Revisões e Ensaio. 1993 Mai 10;84-7.

Glavin GB, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. The FASEB Journal. 1992 Fev;6(3):825-31.

Gustafson J, Welling D. "No acid, no ulcer" - 100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease. *J Am Coll Surg*. 2010 Jan;210(1):110-6.

Ham M, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24(6):665-73.

Hamaishi K; Kojima R; Ito M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(11):2206-13.

Hidaka M, Okumura M, Fujita K, Ogikubo T, Yamasaki K, Iwakiri T, et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drug Metabol Disposit*. 2005;33(5):644-648.

Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Agentes usados para o controle da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico. In: Hardman JG, Limbird LE, editores. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2007. p. 869-881.

Johanningsmeier SD; Harris GK. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011;2:181-201.

Jora NP, Magalhães TR, Domingos JBC, Pillon SC. Campanha saúde na estrada: avaliação do padrão de consumo de álcool e do estresse. *Rev Eletr Enf*. 2010;12(1):37-46.

Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alt Med Rev*. 2008;13(2):128-44.

Khalefa AA, Abd-Alaleem DL, Attiaa KI. The protective effects of ghrelin and leptin against stress-induced gastric ulcer in rats. *Arab J Gastroenterol*. 2010;11(2):74-8.

Khenouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim TH, et al. Effect of Tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* Leaves on

Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. J Agric Food Chem. 2003;51(5):1469-73.

Koda-Kimble MA, Young LY, Kradjan WA, Guglielmo BJ. Manual de Terapêutica Aplicada. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. Gastroenterol. 2008;135(1):41-60

Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol. 2007;109(2):177–206

Lee CJ; Chen LG; Liang WL; Wang CC. Anti-inflammatory effects of punica granatum in vitro and in vivo. Food Chem. 2010;118:315-322.

Lei F, Xing DM, Xiang L, Zhao YN, Wang W, Zhang LJ, et al. Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. J Chrom B. 2003;796(1):189-94.

Lira EC; Santos VL; Silva JA. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato bruto da raiz Cassia occidentalis L. (Mangerioba). Rev Bras Farm. 2005;86(2):53-56.

Luiz-Ferreira A; Almeida ACA; Cola M; Barbastefano V; Almeida AbA; Batista LM; et al. 2010. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* st. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. Molecules. 2010;15 7153-66.

Maranhão MVM, Machado CO, Oliveira AMFH, Delgado ACP. Antagonistas H₂ da histamina e anestesia. Rev Bras Anesthesiol. 1993;43(4):283-8.

Martineau H, Thompson H, Taylor D. Pathology of gastritis and gastric ulceration in the horse. Part 1: Range of lesions present in 21 mature individuals. Equine Vet J. 2009;41(7):638-44.

Medeiros JVR. Avaliação do efeito gastroprotetor do Sildenafil (Viagra®) na lesão gástrica induzida por álcool em ratos: papel do óxido nítrico, do GMPc e dos canais de potássio sensíveis ao ATP [dissertação]. Ceará: Universidade Federal do Ceará; 2006.

Melo-Junior MR; Machado MCFP; Araújo-Filho JLS; Patu VJRM; Beltrão EIC; Pontes-Filho NT. Avaliação histoquímica da mucosa gastrointestinal de ratos expostos ao álcool. Rev Paraense Med. 2006 Out/Dez;20(4):7-12.

Mena P; Garcia-Viguera C; Navarro-Rico J; Moreno DA; Bartual J; Saura D; et al. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars grown in Spain. J Sci Food Agric. 2011;91(10):1893-906.

Mengue SS, Mentz LA, Schenkel EP. Uso de Plantas medicinais na gravidez. Rev Bras Farmacogn. 2001; 11(1): 21-35.

Miguel G, Dandlen S, Antunes D, Neves A, Martins D. The Effect of Two Methods of Pomegranate (*Punica granatum* L) Juice Extraction on Quality During Storage at 4°C. J Biomed Biotechnol. 2004 Dec 1;2004(5):332–7.

Monroe SM. Modern approaches to conceptualizing and measuring human life stress. Annu Rev Clin Psychol. 2008;4:33-52.

Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. Rev Eletr Farm. 2006;3(2):109-22.

Naseri MKG, Mard SA. Gastroprotective effect of Alhagi maurorum on experimental gastric ulcer in rats. Pak J Med Sci. 2007;23(4):570-3.

Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin. J Agric Food Chem. 2002;50(1):166-71.

Oliveira FQ, Gonçalves LA. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. Rev eletr Farm. 2006;3(2):36-41.

Opara LU; Al-Ani M; Al-Shuaibi YS. Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). Food Bioprocess Technol. 2009;2:315-21.

Paula ACB. Correlação entre a desnutrição proteica e o processo de formação e reparação de úlceras gástricas: efeito protetor/curativo do óleo essencial de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae) [tese]. Campinas: Instituto de Biologia: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 2003.

Penissi Ab; Rudolph MI; Piezzi RS. Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense. Biocell. 2003;27(2):163-72.

Pinho R, Romãozinho JM. Profilaxia de úlceras de estresse numa unidade de cuidados intensivos - Estado da Arte. J Port Gastroenterol. 2008;15:204-12.

Potrich FB. Atividade Gastroprotetora do extrato bruto hidroalcólico da *Achillea millefolium* L.: envolvimento do sistema antioxidante [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná - UFP; 2009.

Romão MOC, Costa AMDD, Terra FS, Boriollo MFG, Soares EA. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato de raspa de juá. Rev Bras Clin Med. 2010. 8(3):222-7.

Rugge M, Pennelli G, Pillozzi E, Fassan M, Ingravallo G, Russo V, et al. Gastritis: The histology report. Dig Liver Dis. 2011 Mar; 43 Supl 4:S373-84.

Saul C, Teixeira CR, Pereira-Lima JC, Torresini RJS. Redução da prevalência de úlcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1996-2005). Arq Gastroenterol. 2007 Out/Dez;44(4):320-4.

Scalon D, Fernandes WVB. Abordagem osteopática na gastrite. Rev Inspirar. 2010 Mar/Abr;2(2):6-11.

Schroeter G, Chaves LL, Engroff P, Faggiani FT, De Carli GA, Morrone FB. Estudo de utilização de anti-ulcerosos na população idosa de porto Alegre, RS, Brasil. Rev HCPA. 2008;28(2):89-95.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem; 2005 Jun;16(6):360-7.

Silva MS, Antoniollo AR, Batista JS, Mota CN. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. Acta Bot Bras. 2006;20(4):815-29.

Silva M, Azenha D, Pereira C, Almeida A, Balseiro S, Sampaio AM, et al. Carcinoma gástrico e gastrite crônica: Regulação epigenética por metilação dos genes CDH1 (caderina-E), CDKN2A (p16^{ink4A}), PTGS2 (COX2) e EGFR. Acta Med Port. 2010;23:05-14.

Shimazu T, Tsuji I, Inoue M, Wakai K, Nagata C, Mizoue T, et al. Alcohol drinking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the japanese population. Jpn J Clin Oncol. 2008;38(1):8–25.

Souza-Formigoni ML, Oliveira MG, Monteiro MG, Silveira-Filho NG, Braz S, Carlini EA. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. J Ethnopharmacol. 1991;34(1):21-7.

Stermer E. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. IMAJ. 2002;4(3):200-2.

Stringheta PC; Oliveira TT; Gomes RC; Amaral MPH; Carvalho AF; Vilela MAP. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil, Braz J Pharm Sci. 2007;43(2):181-94.

Taufner CF, Ferraço EB, Ribeiro LF. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. *Natureza online*. 2006;4(1):30-9.

Teyssen S, Singer MV. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003;17(4):557-73.

Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto Contexto Enferm*. 2006;15(1):115-21.

Tulassay Z, Herszényi L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010 Apr;24(2):99-108.

Twardowschy A. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae) [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007.

Veiga-Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova*. 2005;28(3):519-28.

Vidal A, Fallarero A, Peña BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (*Punicaceae*) whole fruit extracts. *J Ethnopharm*. 2003;89(2-3):295-300.

Vonghia L; Leggio L; Ferruli A; Bertini M; Gasbarrini G; Addolorato G. Acute alcohol intoxication. *Eur J Inter Med*. 2008;19(8):561-7.

Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev*. 2008 Oct;88(4):1547-65.

Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J*. 1996;10(7):731-40.

Wang R, Wang W, Wang L, Liu R, Ding Y, Du L. Constituents of the flowers of *Punica granatum*. Fitoterapia. 2006;77(7-8): 534-7.

Werkman C, Granato DC, Kerbauy WD, Sampaio FC, Brandão AAH, Rode SM. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). Rev Bras Pl Med. 2008;10(3):104-11.

Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel-Filho V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Quim Nova. 2001;24(1):147-52.

Zhao W, Zhu F, Shen W, Fu A, Zheng L, Yan Z, et al. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. Acta Biochim Biophys Sin. 2009;41(4):301-8.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - Tratamento Curativo

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / aigotti@focj.unesp.br / Guedes@focj.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **036/2009-PA/CEP**, sobre **“Avaliação da ação terapêutica de Punica granatum L., em lesões gástricas induzidas por etanol”**, sob responsabilidade de **ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO** tendo como orientadas Carolina Foot Gomes, Cristina Werkaman e Michelle Cardoso, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de novembro de 2009

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - Tratamento Preventivo

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / aigotti@focjo.unesp.br / Guodes@focjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **043/2009-PA/CEP**, sobre **"Avaliação da ação preventiva de *Punica granatum* em lesões gástricas induzidas por etanol"**, sob responsabilidade de **CAROLINA FOOT GOMES DE MOURA**, tendo como orientadora a Profa.Adjunto Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 09 de dezembro de 2009

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

ANEXO C - Certificado de Análise Bioquímica e Microbiológica do Extrato seco de PG (Pomegranate®) - frente



CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

161463

PAG: 1

PRODUTO: 909-POMEGRANATE EXTRATO SECO MIN.40% ELLAGIC ACID
 LOTE_FABRICANTE: TY081009 LOTE_INTERNO: 028740
 FABRICANTE: XIAN ACETAR BIO TECH
 PAIS DE ORIGEM: CHINA
 PROCEDENCIA: CHINA
 CLIENTE: BECKER PHARMACIA DE MANIPULA
 C.A.S.: N/A
 D.C.B.: N/A
 D.C.I.: N/A
 DATA DE ANALISE: 15/01/2009

FABRICACAO...: 10/2008 N.FISC: 161463
 VALIDADE....: 10/2010 QTD: 0,250

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
Aparencia	Po fino acinzentado	De acordo
Perda por secagem	Max. 5,0%	3,3
Cinzas	Max. 5,0%	2,85
Densidade	50 - 60 g/100 mL	51g/100mL
Metais pesados	Max. 10 ppm	<10
As	Max 2 ppm	<2
Pb	Max. 2 ppm	<2
Tamanho partícula	100%- 80 mesh	De acordo
C.t.bacterias	Max. 1000 ufc/g	Conforme
C.t.bolores-leveduras	Max. 100 ufc/g	Conforme
E. coli	Negativo	Negativo
Salmonella	Negativo	Negativo
Staphylococcus	Negativo	Negativo
Odor	Caracteristico	De acordo
Residuo de Pesticida		
666	<2ppm	De acordo
DDT	<2ppm	De acordo
Parte utilizada:casca		
Solvente de extracao:	anol e agua	
Metodo de secagem:	Alta temperatura e pressao	
Nome botanico:	Punica granatum L.	
Familia:	Lythraceae	
Teor	Min. 40,0% ac.elagico (HPLC)	41,25%

REF.BIBLIOGRAFICA:O PROD.SEGUE METODOL.DO FAB.

(*)

(*) Os ensaios assinalados foram realizados em Laboratorio Terceirizado.

ARMAZENAMENTO:MANTER HERMET.FECHADO/LOCAL SECO E AREJADO.

CONCLUSAO.: APROVADO

ESTE DOCUMENTO E UMA COPIA DO ORIGINAL !
 SE HOUVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO.TECNICO.


 Karina Pontes Martinho
 Farmacêutica - Responsável CRF-SP: 30.263


 Renata Cezari
 Farmacêutica Responsável pelo
 Controle de Qualidade CRF-SP: 34.899

As assinaturas são válidas somente quando o mesmo estiver acompanhado da nota fiscal.
 É importante manter este certificado em seus arquivos para eventuais consultas. Dúvidas e informações complementares, favor contatar nossa farmácia do Controle de Qualidade pelo Telefone: (11) 2067-5713

ANEXO D - Certificado de Análise Bioquímica e Microbiológica do Extrato seco de PG (Pomegranate®) - verso

REGISTRO DE CONFERÊNCIA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS E PRODUTOS SEMI-ACABADOS			
Descrição (DCB ou DCI): <u>Pomegranate</u>			
Descrição do Rótulo: <u>Pomegranate extr seco</u>			
Código de referência interno: <u>5828</u>		Lote nº <u>TYP061009</u>	
Teor/Concentração: <u>—</u>	Fator de Correção: <u>—</u>	Fator de Equiv.: <u>—</u>	
Data da Emissão: <u>25/06/09</u>		Nota Fiscal nº: <u>161463</u>	
Transportadora: () Brasil Express (x) <u>Dr. Express</u> () Outras: <u>—</u>			
Recebido por: <u>C. Amador</u>		Período: () Manhã (x) <u>Tarde</u>	
Data de Saída: <u>25/06/09</u>		Data da Chegada: <u>26/06/09</u>	
Rótulo da Embalagem: (x) <u>Conforme</u> () Não Conforme			
Itens obrigatórios no rótulo = (nome, endereço, CNPJ e telefone do fornecedor; Nome do Insumo (DCB, DCI e CAS), quando possível; quando MP vegetal (nome popular, nome científico, parte da planta utilizada); quantidade e sua respectiva unidade de medida; nº, lote; data de fabricação; prazo de validade; condições de armazenamento; data de fracionamento, quando couber; nome do Resp. Técnico e seu registro no conselho profissional correspondente; origem com indicação do fabricante).			
EXAME VISUAL		APRESENTAÇÃO	
Embalagem externa: (x) <u>APROVADA</u> () REPROVADA		(x) <u>Sólido</u> () Líquido () Outros: <u>—</u>	
Embalagem primária: (x) <u>APROVADA</u> () REPROVADA			
CONDIÇÃO DE ARMAZENAMENTO		USO	
(x) <u>Temperatura ambiente</u> () Geladeira		(x) <u>Interno</u> () Externo () Ambos	
SUBSTÂNCIAS DA PORTARIA 344/88			
Quantidade comprada: <u>—</u>		Quantidade Verificada: <u>—</u>	
() Confere		() Não confere	
Conferido por: <u>—</u>		Data: <u>—/—/—</u>	
CONFERÊNCIA DO CERTIFICADO DE ANÁLISE DO FABRICANTE/FORNECEDOR			
Referência(s): <u>—</u>		Data: <u>01/07/09</u>	
Assinatura /Carimbo: <u>Fabio</u>			
<u>APROVADO</u>		() REPROVADO *	
*Abertura de SOLICITAÇÃO DE AÇÃO DE NÃO CONFORMIDADE - INSUMO FARMACÊUTICO E EMBALAGEM			
Descrição breve da Não Conformidade: <u>—</u>			
DR. FABIO BARBERATO FARMACÊUTICO CRP-SP nº 16.912			