

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA, ANTIDIARRÊICA E
ANTIINFLAMATÓRIA DE *Astronium fraxinifolium* Schott: UMA ESPÉCIE
MEDICINAL DO CERRADO**

ALUNA: Silvia Massae Oide Serikava

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

COORIENTADOR: PROF. DR. HÉLIO KUSHIMA

Relatório final de estágio curricular apresentado ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/UNESP-Botucatu, como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu -SP

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido viver,

Agradeço aos professores que contribuíram de maneira tão importante na elaboração deste trabalho, especialmente meus orientadores, Clélia Akiko Hiruma-Lima e Hélio Kushima;

Aos colegas de laboratório, pois sem eles este trabalho não teria se tornado realidade;

Aos meus pais por me educar e me apoiar nas horas mais difíceis, moral e financeiramente;

Ao meu namorado, que sempre que pôde, me deu forças para continuar. Obrigada;

Aos animais de laboratório que deram suas vidas para que este trabalho se tornasse realidade;

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse construído.

ÍNDICE

RESUMO	1
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	11
MATERIAL E MÉTODOS	12
Preparação dos extratos	12
Animais	12
Doses utilizadas	12
Veículo de administração	12
Modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos	13
Lesões induzidas por etanol absoluto	13
Lesões induzidas por DAINÉ	13
Conteúdo de glutatona total	14
Modelo de ligadura de piloro	14
Determinação do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção	15
Determinação do envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção ...	16
Modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antidiarréica dos extratos	16
Determinação da motilidade intestinal	16
Avaliação da atividade antidiarréica	17
Modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antiedematogênica e antiinflamatória dos extratos	18
Indução de edema de pata pela carragenina	18
Teste da formalina	19

Análise estatística.....	20
RESULTADOS	21
Lesões induzidas por Etanol absoluto.....	21
Determinação do conteúdo de glutatona total.....	22
Lesões induzidas por droga antiinflamatória não-esteroidal (DAINE).....	23
Determinação do conteúdo de glutatona total.....	24
Modelo de ligadura de piloro – via intraduodenal.....	25
Lesões gástricas	25
Volume de conteúdo estomacal	26
Concentração hidrogeniônica	26
Avaliação do pH estomacal	27
Modelo de ligadura de piloro – via oral	28
Lesões gástricas	28
Volume de conteúdo estomacal.....	28
Concentração hidrogeniônica	29
Avaliação do pH estomacal	30
Determinação do envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção...	30
Determinação do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção.....	32
Determinação da motilidade intestinal	33
Avaliação da atividade antidiarréica.....	33
Modelo de acúmulo de fluido intestinal	35
Avaliação do efeito antiedematogênico	36
Avaliação da atividade antinociceptiva	39
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ULCEROGÊNICA, ANTIDIARRÊICA E
ANTIINFLAMATÓRIA DE *Astronium fraxinifolium* Schott: UMA ESPÉCIE
MEDICINAL DO CERRADO**

RESUMO

Este trabalho visa o estudo dos efeitos biológicos dos extratos hidroalcoólicos (HDA) obtidos das cascas e folhas de *Astronium fraxinifolium* (Anacardiaceae), uma espécie medicinal do Cerrado brasileiro. Com base nas indicações populares de uso da espécie no combate a diversos males como a diarreia, cólicas, inflamação e reumatismo e a confirmação pela literatura da atividade gastroprotetora da espécie congênera *Astronium urundeuva*, foram realizados modelos experimentais *in vivo* para caracterizar a propriedade anti-úlceras, antidiarrêica e antiinflamatória dos extratos hidroalcoólicos de cascas (A.f.cs) e folhas (A.f.fol) de *A. fraxinifolium*. A propriedade antiulcerogênica dos A.f.cs e A.f.fol, administrado pela via oral, em diferentes doses (125, 250 e 500 mg/kg) foi avaliada em modelos experimentais *in vivo* em que os ratos Wistar machos foram confrontados com agentes ulcerogênicos químicos como etanol absoluto e droga antiinflamatória não-esteroidal (DAINE). Os fatores envolvidos na gastroproteção dos extratos foram avaliados através da quantificação de glutatona total do raspado da mucosa, volume do suco gástrico, concentração de íons H⁺ e pH do suco gástrico. A atuação de fatores protetores da mucosa gástrica como óxido nítrico (NO) e compostos sulfidrílicos (SH) também foram analisados sob efeito de ambos os extratos. A propriedade antidiarrêica dos extratos (500 mg/kg, p.o.) também foi avaliada através da motilidade intestinal, índice de evacuações e acúmulo de fluidos intestinais. Ambos os extratos (500 mg/kg, p.o. e 50 mg/kg, i.p.) também foram submetidos a avaliação em dois modelos experimentais (edema da pata induzida por carragenina e teste de formalina) onde as propriedades antiedematogênica e antiinflamatória foram analisadas em roedores. Ambos os extratos foram estudados fitoquimicamente em CLAE-DAE (cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa) onde foram caracterizados para A.f.fol as presenças de flavonóides e para o

A.f.cs a presença predominante de taninos condensados. No modelo de indução de úlceras gástricas por etanol absoluto, todos os resultados mostraram uma evidente atividade gastroprotetora principalmente nas maiores doses (500 mg/kg) e o nível de glutatona total da mucosa gástrica se apresentou elevado para o extrato de folhas ($p < 0,05$). No modelo de indução de úlceras gástricas por droga antiinflamatória não-esteroidal, os resultados foram menos expressivos, mas ainda observou-se o maior efeito gastroprotetor na maior dose de ambos extratos. Porém, o conteúdo de glutatona total destes estômagos dos animais tratados com ambos os extratos não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle negativo tratado somente com o veículo ($p > 0,05$). Os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (conteúdo estomacal total, conteúdo de íons H^+ e pH) dos animais tratados com os extratos demonstraram que apenas o tratamento com A.f.cs, administrado intraduodenalmente, foi capaz de diminuir as áreas de lesões, o volume do conteúdo gástrico e a concentração de íons H^+ , indicando, portanto, a ação antissecretória deste extrato quando administrado pela via sistêmica e não pela via oral. Ambos os extratos atuam via ativação dos compostos SH e apenas o extrato das folhas atua via ativação do NO que conjuntamente para ativar os fatores gastroprotetores da mucosa gástrica. Apenas o extrato de cascas reduziu a motilidade intestinal e apresentou ação antidiarrêica ao reduzir em 85% os índices de evacuação e aumentar significativamente o tempo para o início das evacuações aquosas induzidas por óleo de ricino em camundongos ($p < 0,05$). A ação antiedematogênica dos extratos das cascas de *A. fraxinifolium* foi evidenciada pela via oral (500 mg/kg) e pela via intraperitoneal (50 mg/kg) a partir da 2ª hora de observação onde houve uma redução significativa do edema da pata dos ratos submetidos a inflamação por carragenina ($p < 0,05$). Em contrapartida, ambos os extratos reduziram a resposta antinociceptiva dos camundongos (2ª fase) no teste de formalina porém, somente A.F.fol apresentou reduções significativas da resposta antinociceptiva dos animais. Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que aos extratos das folhas e cascas de *A. fraxinifolium* possuem efetiva ação antiulcerogênica por propriedade antissecretória, antioxidante e gastroprotetora. A ação antidiarrêica, atribuída pela indicação popular,

foi confirmada somente para o extrato das cascas, provavelmente pela presença de taninos condensados com propalada ação adstringente, enquanto as propriedades antiedematogênica e antinociceptiva foram caracterizadas em ambos os extratos, porém com diferenças de intensidade de resposta para cada ensaio. Novos estudos se fazem necessário para caracterizar os compostos secundários responsáveis pelas respectivas ações bem como o seus prováveis mecanismos de ação, porém estes estudos demonstram as potencialidades farmacológicas da espécie *Astronium fraxinifolium* como fonte de medicamentos antiulcerogênicos, antidiarrêicos e antinociceptiva.

Palavras-chaves: *Astronium fraxinifolium*; Anacardiaceae; atividade antiulcerogênica; ação antidiarrêica; efeito antinociceptiva.

INTRODUÇÃO

ÚLCERAS PÉPTICAS - Basicamente a úlcera péptica é causada pelo desequilíbrio entre a secreção gástrica e a proteção promovida pela barreira da mucosa gastroduodenal e/ou pela neutralização do ácido gástrico pelo suco duodenal. Geralmente apresenta evolução crônica e resulta na perda circunscrita de tecido em regiões do trato digestivo que estão em contato com a secreção cloridropéptica do estômago (Mincis, 2002).

Dentre as causas específicas das úlceras pépticas no homem estão: a infecção pela bactéria *H. pylori*, o uso crônico de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINE), o tabagismo, o consumo de álcool, alguns hábitos alimentares e o estresse (Taylor e Blaser, 1991; Hiruma-Lima, 1998; Ishihara e Ito, 2002; Grob, 2003). Outros fatores genéticos podem também estar associados à doença, tais como o gastrinoma (síndrome de Zollinger-Ellison) e a forma duodenal da doença de Crohn.

As DAINÉ estão entre as principais drogas prescritas, mas sua eficácia terapêutica tem sido questionada devido aos seus efeitos danosos sobre o sistema gastrointestinal (Jones *et al.*, 2008). Em indivíduos não infectados pela *H. pylori*, o consumo de DAINÉ constitui a causa mais comum das úlceras pépticas (Bytzer *et al.*, 2001). Tais drogas inibem a formação de prostaglandinas ao inibir as ciclooxigenases (COX), o que acarreta na redução dos efeitos gastroprotetores mediados pelas suas isoformas COX-1 e 2. Isso leva à deficiência da proteção da mucosa gástrica, pela diminuição da secreção de muco e bicarbonato, redução na proliferação das células epiteliais e do fluxo sanguíneo na mucosa. Em pacientes infectados pela bactéria, os danos induzidos pelas DAINÉ se tornam mais freqüentes e intensos (Huang *et al.*, 2002). Cerca de 50% dos pacientes que usam tais drogas desenvolvem úlceras, principalmente os idosos, que as utilizam para tratar doenças cardiovasculares e artropatias (Collier *et al.*, 1985; Lanas *et al.*, 1997).

A ingestão aguda de álcool em concentrações acima de 25% altera a barreira da mucosa gástrica, efeito que pode ser intensificado quando na presença de DAINÉ (Bujanda, 2000). Alguns estudos demonstram que o consumo de álcool causa lesões gástricas de forma dose-dependente (Knoll *et al.*, 1998). Apesar de o álcool estimular a secreção ácida e poder causar gastrite aguda como resultado do dano direto à mucosa,

não há evidências de que o consumo de álcool produza ou esteja associado ao aumento na incidência de úlcera péptica (Mincis *et al.*, 1995), a cura ou a reincidência da doença (Bujanda, 2000).

Atualmente a prevalência média da doença na população mundial é cerca de 5 a 10%, representando um grave problema de saúde pública. A chance de cura é de mais de 95%, entretanto, a probabilidade de reincidência após um ano da cura varia de 65 a 80% e, passados dois anos, esse risco chega a quase 100%. O tratamento e a cura de recidivas ainda são um sério problema no campo médico (Fan *et al.*, 2005).

Os custos anuais estimados relacionados direta e indiretamente com a doença nos Estados Unidos são de 10 bilhões de dólares (Sistema de Saúde da Universidade de Michigan, 2007). Nos últimos 20 anos, importantes mudanças na incidência da doença têm ocorrido (Post *et al.*, 2006), observando-se um declínio gradativo a partir do ano de 1996. Essa diminuição não tem origem bem esclarecida, mas possivelmente se deve ao aumento do uso das drogas denominadas inibidoras das bombas de prótons e à diminuição nas taxas de infecção pela *H. pylori* (Kang *et al.*, 2002).

Atualmente, as intervenções cirúrgicas para a cura das úlceras pépticas são realizadas somente em poucos casos, devido à eficiência dos medicamentos. O tratamento inicial indicado, na maioria dos casos, é o uso dos inibidores da bomba de prótons, como o omeprazol e o lansoprazol, que promovem uma maior supressão da secreção ácida, altas taxas de cura e alívio dos sintomas. Outro tratamento eficaz na cura das úlceras pépticas é o uso de inibidores de receptores H₂ (histamina), medicamentos como a cimetidina. Apesar de eficientes, o uso prolongado ou excessivo de drogas anti-secretórias pode provocar efeitos colaterais (Martelli *et al.*, 1998; Wolfe e Sachs, 2000; La Vecchia e Tavani, 2002; Raghunath *et al.*, 2005). A erradicação da bactéria *H. pylori* pode ser, em alguns casos, o suficiente para a completa remissão de pequenas úlceras (Kalyanakrishnan *et al.*, 2007).

Apesar da existência de potentes medicamentos no mercado, as taxas de recidivas da doença são altas. Não há nenhum tratamento completamente eficaz contra tal efeito, o que dificulta a remissão das úlceras pépticas.

DIARRÉIA - A diarreia é conhecida como uma das principais doenças e causas de morte em crianças em países em desenvolvimento. Em 1980 era considerada a principal causa de morte em crianças, acarretando cerca de 4,6 milhões de vítimas por ano. Esse número, no entanto, vem diminuindo nas últimas décadas, devido principalmente à terapia de hidratação oral, introduzida em 1979. Tal tratamento permite que os líquidos, que foram perdidos de forma excessiva, sejam repostos. Embora as taxas de mortalidade tenham decaído, a doença ainda representa um enorme problema de saúde pública. Nos dias de hoje, estima-se que 1,8 milhões de crianças abaixo de 5 anos morram de diarreia todos os anos (Victora *et al.*, 2000).

A doença caracteriza-se pela formação de fezes de consistência anormal, geralmente associada a um aumento da frequência de defecação e a uma maior quantidade de fezes eliminadas (Fine *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1995). Pode resultar de diferentes condições: infecções, reações adversas a drogas, de doenças inflamatórias intestinais e de isquemia. Quando grave ou prolongada, a doença pode causar febre, fraqueza ou sangramento no reto.

PROCESSO INFLAMATÓRIO - O processo inflamatório consiste numa resposta complexa do organismo a agressões. Representa um importante mecanismo de defesa, que visa eliminar microorganismos, restaurar tecidos e estabelecer imunidade específica. Entretanto, muitas vezes o processo inflamatório deixa de ter função protetora e torna-se causa de doenças, como as infecciosas, auto-imunes e alérgicas, tais como as artrites reumatóides e as glomerulonefrites em cujos tratamentos as drogas antiinflamatórias são amplamente empregadas (Jancar, 2001).

A inflamação é geralmente dividida em três fases: aguda, resposta imune e crônica. A fase inicial ou aguda compreende as alterações vasculares, como dilatação e aumento na permeabilidade vascular e migração de leucócitos. Esta fase é mediada por autacóides, tais como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. A resposta imune ocorre quando as células do sistema imunológico são ativadas em resposta aos organismos estranhos ou a substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória ou crônica. Já durante as inflamações crônicas, que têm

duração prolongada – de semanas a meses - é comum a presença de linfócitos, macrófagos e de proliferação celular. A lesão celular associada à inflamação promove a liberação de ácido araquidônico a partir de compostos precursores e então são sintetizados vários eicosanóides. O ácido araquidônico pode ser oxigenado por quatro vias distintas, sendo duas delas responsáveis pela síntese das prostaglandinas e dos leucotrienos. A via da ciclooxigenase produz prostaglandinas, que exercem uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e as células envolvidas na inflamação. Duas isoenzimas convertem ácido araquidônico em prostaglandinas: a PGH sintetase-1 (COX-1) e PGH sintetase-2 (COX-2) (Furst *et al.*, 2003).

As DAINE) bloqueiam os efeitos dos eicosanóides através da inativação das enzimas COX. Certos tipos de drogas atuam equitativamente sobre as duas enzimas, enquanto outras são seletivas na sua ação sobre as ciclooxigenases. Recentemente, inibidores seletivos de COX-2 tais como celecoxib e rofecoxib foram desenvolvidos no intuito de diminuir os efeitos adversos sobre o sistema gastrointestinal, bem como preservar a produção de prostaglandinas importantes à manutenção da integridade da mucosa e a circulação renal (Warrer *et al.*, 1999). Este desenvolvimento das novas drogas seletivas baseou-se no conceito de que a isoforma COX-1 é responsável pela produção das prostaglandinas fisiológicas no estômago, rim e plaquetas, enquanto que apenas a isoforma COX-2 está associada à inflamação e dor. Entretanto, vários inibidores seletivos de COX-2 têm mostrado reduzir de maneira significativa a dor e a inflamação apenas nas doses em que a seletividade já se perdeu (Wallace *et al.*, 1998a, b). Além disso, estudos mostram que a isoforma COX-2 é constitutivamente expressa em muitos tecidos, inclusive na mucosa gástrica, em humanos e outros animais (Zimmermann *et al.*, 1998; Harris, 1996; Robertson *et al.*, 1998) e pode contribuir com a defesa da mucosa em condições fisiopatológicas (Peskar *et al.*, 2001). Outros estudos recentes mostraram ainda que as COX-2 produzem prostaglandinas que exercem efeitos antiinflamatórios e auxiliam na cicatrização do tecido (Gilroy *et al.*, 1999) e portanto, têm importante função no tratamento de úlceras gástricas (Shigeta *et al.*, 1998; Brzozowski *et al.*, 2001). As vantagens terapêuticas dos inibidores seletivos de

COX-2 se mostram, portanto, controversas (Wollheim *et al.*, 2000; Wright, 2002; Rainsford *et al.*, 2001). Isto pode ser comprovado por alguns dos inibidores seletivos de COX-2, como celecoxib e rofecoxib, que mostraram piorar e complicar as úlceras gástricas preexistentes (Laudanno *et al.*, 2001).

Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas drogas que sejam suficientemente eficazes no tratamento de doenças inflamatórias e que se mostrem perfeitamente seletivas, com pouco ou nenhum efeito adverso.

PLANTAS MEDICINAIS - Os produtos naturais contribuíram e ainda contribuem muito para o desenvolvimento de inúmeros medicamentos, seja de forma direta ou indireta. Das plantas, pode-se isolar um potente composto ativo ou então, baseando-se nas diversas estruturas moleculares encontradas na natureza, sintetizar uma nova molécula, de potencial interesse comercial. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos de fontes naturais, divididos em: 25% provenientes de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (Calixto, 2001).

O início dos estudos das plantas medicinais teve início no começo do século XIX, durante o desenvolvimento da Química como disciplina científica moderna (Yunes, 2001). Nesta época, importantes fármacos foram isolados, muitos dos quais ainda hoje utilizados, tais como a morfina, potente analgésico, e a efedrina, utilizada como agente broncodilatador. E ainda, neste mesmo século, foi obtido o primeiro fármaco sintético: o tão usado ácido acetil salicílico (AAS). A partir daí, a pesquisa com plantas medicinais intensificou-se (Balunas *et al.*, 2005).

Apesar do notável desenvolvimento da medicina moderna, segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% da população mundial utiliza plantas medicinais (Farnsworth *et al.*, 1985) e ainda, 80% da população de países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (Brasil, 2006). Outra evidência de sua importância é a enorme parcela do mercado farmacêutico movimentada pelas plantas e seus derivados: a fatia chega a 30% (Kirkpatrick *et al.*, 2002). No Brasil,

estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (Guerra *et al.*, 2001)

As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias biologicamente ativas para o desenvolvimento de novos fármacos e têm sido utilizadas há anos por comunidades tradicionais. O conhecimento popular de tais espécies representa grande ajuda à pesquisa farmacológica, a qual na última década teve seu interesse voltado principalmente para as plantas (Di Stasi *et al.*, 1996).

As potencialidades do uso das plantas medicinais estão longe de se esgotar. Tal afirmação é endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão, no reino vegetal, soluções, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficácia (Schenkel *et al.*, 2003).

A flora do Cerrado é muito rica, e a maioria de suas espécies apresenta múltiplas utilidades para o homem: alimentícia, condimentar, têxtil, medicinal, produtora de látex, apícola e ornamental, entre outras. Contudo, o Cerrado tem sofrido contínua devastação e ainda assim, não há leis específicas para proteger o cerrado e apenas 1% dele se encontra em Unidades de Conservação (Maroni *et al.*, 2006).

Dentre as espécies vegetais do cerrado com potencial terapêutico, encontra-se *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. (Aroeira-do-sertão). Experimentalmente foi verificado que tal espécie apresenta as seguintes atividades: antiulcerogênica (Rao *et al.*, 1987), antiinflamatória (Menezes *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1986; Viana *et al.*, 1997), cicatrizante (Viana *et al.*, 1995), analgésica (Viana *et al.*, 1997), antioxidante (Desmarchelier *et al.*, 1999) e ainda tem efeitos sobre o trânsito gastrointestinal de ratos (Menezes *et al.*, 1988). Ademais, há indicações populares a respeito do uso da planta, tais como no controle de úlceras de pele, reumatismo (Almeida *et al.*, 1998; Desmarchelier *et al.*, 1999) e diarreia (Viana *et al.*, 1997). Em contrapartida, existem poucos trabalhos a respeito das demais espécies do mesmo gênero. A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott é uma delas e faz parte de um levantamento

etnofarmacológico de plantas do Cerrado dos estados de São Paulo e Tocantins, realizado pelo grupo de pesquisa de Produtos Naturais do Instituto de Química (UNESP-Araraquara).

A espécie *Astronium fraxinifolium* Schott (Anacardiaceae), popularmente conhecida como Gonçalo-alves, é também uma árvore típica do Cerrado. Apresenta madeira dura, própria para a construção, entre outras utilizações. Quanto às propriedades medicinais, a planta é popularmente indicada para tratar diversas moléstias. Sua casca adstringente, por exemplo, é muito utilizada no tratamento de diarreias. O óleo obtido da planta, por sua vez, é utilizado no tratamento de dores de dente e de calos e as folhas, segundo o conhecimento popular, apresentam propriedades anti-sépticas. Já as raízes são consideradas como anti-reumáticas (Brandão *et al.*, 2003). Apesar de não apresentar indicação popular contra úlceras gástricas, o seu estudo como potencial agente anti-úlcerosa se deve fundamentalmente pelo fato do extrato de *A. urundeuva* apresentar comprovada atividade gastroprotetora.

OBJETIVOS

Devido à importância dos estudos com plantas medicinais e considerando-se os estudos etnofarmacológicos acerca da espécie, este projeto tem o objetivo de avaliar a atividade antiulcerogênica, antidiarréica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de cascas e folhas de *Astronium fraxinifolium* Schott em modelos experimentais *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos extratos - Os extratos foram obtidos a partir da separação das partes das plantas (folhas e cascas), que foram secas e trituradas. Cada parte foi extraída com etanol e água (80 EtOH:20 H₂O), a partir de maceração com o solvente durante um mês. Os extratos foram preparados pela Profa. Dra. Viviane Cândida da Silva sob supervisão do Prof. Dr. Wagner Vilegas no Instituto de Química de Araraquara – UNESP. O processo de extração foi repetido tantas vezes quantas foram necessárias para a obtenção das quantidades adequadas para a realização dos ensaios biológicos. Os extratos foram armazenados em freezers a -5°C até o momento de sua utilização.

Animais - Em todos os experimentos foram utilizados ratos machos Wistar (180-250g) ou camundongos machos Swiss (20-25g) provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial (Departamento de Fisiologia, UNESP-Botucatu) por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (23 ± 2°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno de fundo sólido forradas com maravalha autoclavada e alimentados com ração Guabi[®] e água *ad libitum*.

Todos os experimentos obedeceram aos protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu.

Doses utilizadas - As doses utilizadas foram de 125, 250 ou 500 mg/kg administradas pela via oral (p.o.) nos modelos de indução de úlceras por etanol absoluto e droga antiinflamatória não-esteroidal. Já no modelo de ligadura de piloro, a dose escolhida foi a de 500 mg/kg por se tratar da dose mais efetiva nos experimentos anteriormente realizados.

Veículo de administração - Em todos os modelos foi utilizada solução salina (NaCl

0,9%) como veículo para as amostras vegetais e drogas-padrão, além de ser administrada no tratamento do grupo controle negativo.

- a) **Modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos de *A. fraxinifolium* Schott** - Para a avaliação da atividade antiulcerogênica, os modelos experimentais empregaram agentes lesivos relacionados à formação de úlcera no homem: ingestão de álcool (etanol absoluto) e consumo de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINE), além do acúmulo de secreções gástricas, representado pelo modelo de ligadura de piloro.

Lesões induzidas por Etanol absoluto -O experimento foi realizado de acordo com o modelo descrito por Morimoto *et al.*(1994), no qual os diferentes tratamentos foram administrados a grupos de ratos machos Wistar, previamente submetidos a jejum de 12h. Os tratamentos realizados para os diferentes grupos foram solução salina, carbenoxolona (100 mg/kg) e extratos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (125, 250 ou 500 mg/kg), administrados num volume de 10 mL/kg com a utilização de cânula intragástrica. Após 60 minutos do pré-tratamento, todos os animais receberam oralmente 1 mL de etanol 99,5%, que corresponde ao agente lesivo. Decorridos 60 minutos da administração do etanol, os animais foram mortos em câmara de gás carbônico, e seus estômagos retirados, prensados entre placas de vidro para a captura de suas imagens no scanner e então submetidos à quantificação da área das lesões, em milímetros, no programa AVSoft Bioview.

Lesões induzidas por droga antiinflamatória não-esteroidal (DAINE) - O modelo de indução de lesões gástricas por DAINE utilizando foi aquele descrito por Guidobono *et al.*, (1997), que utiliza Indometacina como agente lesivo e apresenta maior reprodutibilidade e equivalência quanto às lesões.De acordo com o método descrito, ratos machos Wistar foram aleatoriamente separados em grupos (n=7), mantidos em jejum por 12h com água *ad libitum*. Foram administrados, via oral, os seguintes tratamentos: solução salina (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle

positivo) e extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg. Decorridos 30 minutos do pré-tratamento, o agente lesivo indometacina (50mg/kg solubilizada em carbonato de sódio 0,5% - Allen e Hamilton, 2000) foi administrada oralmente para todos os grupos. Após 6 horas da administração da indometacina, todos os animais foram mortos e os estômagos retirados e prensados entre placas de vidro para a captura de suas imagens no scanner e então submetidos à quantificação da área das lesões, em milímetros, no programa AVSoft Bioview.

Conteúdo de glutatona total (GSH) -Em ambos os modelos descritos anteriormente, foi analisado o parâmetro adicional de conteúdo de glutatona total presente no tecido estomacal, que foi determinado utilizando o DTNB (ácido 5,5-ditio-bis 2-nitrobenzoico) (Anderson, 1985). A reação enzimática é constituída de 20 µl da amostra, 140 µl de NADPH, 5 µl de PBS (143 mM de tampão fosfato-EDTA-Na), 20 µl de DTNB 6,0 mM. Após 5 minutos de incubação a 30°C, 15 µl de glutatona redutase foram adicionados à solução para em seguida ser feita leitura da absorvância em 412 nm utilizando um espectrofotômetro de microplaca. A concentração de glutatona total foi expressa em ηmol/g de tecido.

Modelo de ligadura de piloro - De acordo com o método descrito por Shay (1945), com modificações, o experimento utilizou ratos machos Wistar submetidos previamente a jejum por 12 horas. A partir deste modelo foram realizados, em experimentos distintos, duas formas de administração dos tratamentos salina, cimetidina (100 mg/kg) e extratos de folhas ou cascas de *A. fraxinifolium* ambos na dose de 500 mg/kg, pelas vias oral e intraduodenal. Os tratamentos orais foram administrados 30 minutos antes da cirurgia de ligadura de piloro, enquanto os tratamentos pela via intraduodenal foram realizados logo após efetuação da ligadura. Tal distinção dos tratamentos se deve à possibilidade da observação de efeitos locais (pela via oral) e sistêmicos (via intraduodenal) das drogas e dos extratos. Antes da cirurgia, os ratos foram anestesiados e sofreram uma incisão

longitudinal logo abaixo da apófise xifóide. Os estômagos foram então exteriorizados e a ligadura do piloro realizada, utilizando um fio de algodão (nº00). Passadas 4 horas da cirurgia, os animais foram mortos, os estômagos foram retirados, abertos e prensados entre placas de vidro para a captura de suas imagens e posterior quantificação das lesões no programa AVSoft (mm²). O conteúdo estomacal coletado teve seu pH determinado bem como seu volume. Este material foi centrifugado a 3.500 rpm durante 20 minutos e em seguida, o sobrenadante foi retirado e titulado com solução de NaOH afim de quantificar a concentração hidrogeniônica. O indicador utilizado foi a fenolftaleína e a concentração total de ácido expressa em mEq/mL, foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$[H^+] = \frac{\text{fator } 1.825 \times \text{Volume NaOH (ml)}}{\text{Vol. gástrico (ml)}}$$

Vol. gástrico (ml)

Determinação do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção (Matsuda *et al.*, 1999) -Neste modelo foram utilizados ratos Machos Wistar, previamente mantidos em jejum por 12 horas e água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente divididos em seis diferentes grupos experimentais (n=7), dos quais três serão pré-tratados com salina pela via intraperitoneal (i.p.) e os outros três com N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, i.p.), um inibidor da síntese de óxido nítrico, na dose de 70 mg/kg. Após 30 minutos, os animais pré-tratados com salina e com L-NAME receberam pela via oral (*p.o.*) salina, carbenoxolona (100 mg/kg) ou os extratos das folhas ou das cascas de *A. fraxinifolium*. Após 1 hora, todos os animais receberam *p.o.* 1 mL de etanol absoluto. Decorridos 60 minutos da administração do agente lesivo, os animais foram mortos em câmara de CO₂ e tiveram seus estômagos abertos ao longo da grande curvatura, sendo prensados entre duas placas de vidro, as quais foram escaneadas para a posterior quantificação das áreas de lesão em mm² no programa AVSoft Bioview Spectra.

Determinação do envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção (Matsuda *et al.*, 1999) - Neste modelo foram utilizados ratos Machos Wistar, previamente mantidos em jejum por 12 horas com água *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente divididos em seis diferentes grupos experimentais (n=7), dos quais três foram pré-tratados com salina (i.p.) e os outros três com N-methylmaleimide (NEM, i.p.), um depletor de compostos sulfidrílicos, na dose de 10 mg/kg. Após 30 minutos, os animais pré-tratados com salina e com NEM receberam *p.o.* salina, carbenoxolona (100 mg/kg) ou os extratos das folhas e das cascas de *A. fraxinifolium*. Após 1 hora, todos os animais receberam *p.o.* 1 mL de etanol absoluto. Decorridos 60 minutos da administração do agente lesivo, os animais foram mortos em câmara de CO₂ e tiveram seus estômagos abertos ao longo da grande curvatura, sendo então prensados entre duas placas de vidro, as quais foram escaneadas para a posterior quantificação das áreas de lesão em mm² no programa AVSoft Bioview Spectra.

- b) Modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antidiarrêica dos extratos de *A. fraxinifolium* Schott** – o estudo da atividade antidiarrêica dos extratos foram realizados por intermédio de três modelos experimentais onde o trânsito de um marcador (carvão ativado) foi determinado ao longo de todo o intestino, a ação antidiarrêica foi determinada pela ação de um agente catártico e determinou-se o acúmulo de fluidos intestinais como descrito a seguir.

Determinação da motilidade intestinal (Baggio *et al.*, 2003) - Camundongos Swiss machos (n=7), em jejum de 6 h foram divididos em grupos, que receberam seus respectivos tratamentos: solução salina (*p.o.*), atropina 5 mg/kg (s.c.), A.f.cs 500 mg/kg (*p.o.*) e A.f.fol 500 mg/kg (*p.o.*). Após trinta minutos, todos os animais receberam solução de carvão ativado 10% *p.o.* em volume de 10 mL/kg. Meia hora após a administração do carvão, todos os animais foram mortos em câmara de CO₂. Em seguida, procedeu-se a remoção de todo intestino delgado juntamente com o estômago, para a mensuração do comprimento total do intestino e a distância

percorrida pelo carvão ativado, para a obtenção da relação distância percorrida e comprimento total do intestino. Os dados obtidos dessa relação foram corrigidos em arcoseno para posterior análise estatística.

Avaliação da atividade antidiarréica (Acounters *et al.*, 1978; Mukherjee *et al.*, 1998)

Neste modelo foram utilizados camundongos machos Swiss, previamente mantidos em jejum por 12 horas, divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (n=5): grupos controle negativo (salina), positivo (loperamida, 5 mg/kg) e tratamentos com extratos hidroalcoólicos das cascas ou das folhas de *A. fraxinifolium* na dose de 500 mg/kg. Cada animal foi colocado em gaiola individual, sem contato com as fezes, com o assoalho recoberto por papel filtro (mata-borrão). Os pré-tratamentos foram realizados via oral e após 30 minutos, cada animal recebeu, via oral, 0,2 mL de óleo de rícino (Sigma®). O tempo de início das fezes aquosas foi analisado por um período de 4 horas após a administração do agente catártico. Em seguida, os animais foram retirados das gaiolas individuais e as excreções foram classificadas de acordo com um score numérico baseado na consistência das evacuações (stools). O valor 1 é atribuído às evacuações normais (stool = 1), o valor 2, às semi-sólidas (stool = 2) e o valor 3 é dado às evacuações aquosas (stool = 3). A partir destes valores, para cada grupo foi calculado o índice de evacuações (IE), dado pela seguinte fórmula:

$$IE(\text{grupo}) = 1 \times (\text{n}^\circ \text{ stool } 1) + 2 \times (\text{n}^\circ \text{ stool } 2) + 3 \times (\text{n}^\circ \text{ stool } 3)$$

Modelo de acúmulo de fluido intestinal (Robert *et al.*, 1976; DiCarlo *et al.*, 1994 – com modificações) -Neste modelo foram utilizados camundongos Swiss machos, mantidos em jejum por seis horas e divididos aleatoriamente em grupos controle negativo, positivo e grupos tratados com os extratos de *A. fraxinifolium*. Os animais foram tratados com salina (controle negativo, *p.o.*), 10 mg/kg de morfina (controle positivo, via subcutânea) e extratos de folhas e de cascas de *A. fraxinifolium* na dose de 500 mg/kg (*p.o.*). Após 60 minutos dos pré-tratamentos, cada animal recebeu, via oral, 0,2 mL de óleo de rícino. Decorridos 30 minutos da administração do agente diarrêico, todos os animais foram mortos em câmara de CO₂ e seus intestinos delgados cuidadosamente retirados, pesados com e sem o conteúdo intestinal, além de proceder-se com a quantificação do conteúdo intestinal (g).

c) Modelos experimentais utilizados para avaliação da atividade antiedematogênica e antiinflamatória dos extratos de *A. fraxinifolium* Schott - a avaliação das atividades antiedematogênica e antiinflamatória dos extratos foram avaliadas por dois modelos experimentais denominados testes de formalina e indução de edema de pata induzido por carragenina, como descrito a seguir.

Indução de edema de pata pela carragenina - O modelo de edema de pata induzido pela carragenina é altamente sensível as drogas antiinflamatórias não-esteroidais e tem sido uma ferramenta aceitável para avaliação de novas drogas antiinflamatórias (Just *et al.*, 2008). Esse modelo é bifásico: a fase inicial (1-2 horas) é mediada por histamina, serotonina e aumento da síntese de prostaglandinas, enquanto que a fase tardia (3-4 horas) é sustentada pela liberação de prostaglandinas no tecido, sendo que essa fase é inibida pelas drogas anti-inflamatórias não esteroidais como piroxicam (Brito e Antonio, 1998). Para verificar a possível atividade anti-edematogênica desses extratos foram utilizado o método de indução de edema de pata com carragenina em ratos Wistar (Levy, 1969; Henriques *et al.*, 1987). Os animais em jejum foram divididos em grupos: salina,

Piroxicam 30 mg/Kg, extrato hidroalcoólico das folhas e cascas de *A. fraxinifolium* (500 mg/kg, pela via oral ou 50 mg/kg pela via intraperitoneal). Os tratamentos (extratos e grupos controle) foram administrados pela via oral 1 hora antes da indução do edema através da injeção subcutânea de 100 µl/pata de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 100 µl/ pata de salina estéril na pata esquerda. Fez-se a medição de ambas as patas durante 4 horas. A pata esquerda de cada animal foi usada como controle recebendo apenas o mesmo volume de salina estéril. O resultado foi dado pela diferença de volume (ml) deslocado entre as patas medidas pelo pletismômetro Ugo Basile.

Teste da formalina - O modelo mais específico de dor aguda é caracterizado pelo teste de formalina. Este modelo possui uma resposta distinta (bifásica) de resposta de dor: 1) Fase inicial: inicia-se logo após a administração de formalina e desaparece após aproximadamente 5 minutos. É uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), que sofre ação principalmente de drogas narcóticas (opioides). 2) Fase tardia: inicia-se entre 15-30min após administração de formalina e permanece até cerca de 60min. Esta fase é indicativa de dor inflamatória, e sofre ação de drogas periféricas e narcóticas. Este experimento se baseia nas descrições de Hunskaar e Hole (1987), com algumas modificações. Foram utilizadas câmaras de observação, que consiste em um funil com 20 cm de diâmetro. Cada camundongo Swiss macho (n=7) foi previamente colocado no funil câmara por 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina para permitir aclimatação com o novo ambiente. Os camundongos foram pré-tratados oralmente com veículo (10 ml/kg, *p.o.*), e com o extrato hidroalcoólico das cascas e folhas de *A. fraxinifolium* na dose de 500 mg/kg. Após uma hora, foi administrada 20 µL de solução de formalina 1 % em tampão fosfato que foi injetada intraplantarmente na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados na câmara durante 30 minutos. O tempo (em segundos) que o camundongo lambe suas patas foi registrado e considerado como indicativo de dor.

Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão médio (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste a posterior de Dunnett, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Lesões induzidas por Etanol absoluto

Foi observado o notável efeito gastroprotetor do extrato de cascas de *A. fraxinifolium* no modelo de indução de lesões por etanol absoluto, com diminuição de até 100% das lesões ulcerosas macroscópicas, quando da administração da maior dose (500 mg/kg) (**fig. 1**). O efeito do extrato sugere uma atividade dose-dependente.

Figura 1: Efeito do pré-tratamento com extrato hidroalcoólico de cascas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs) no modelo de indução de lesão gástrica por etanol absoluto em ratos.

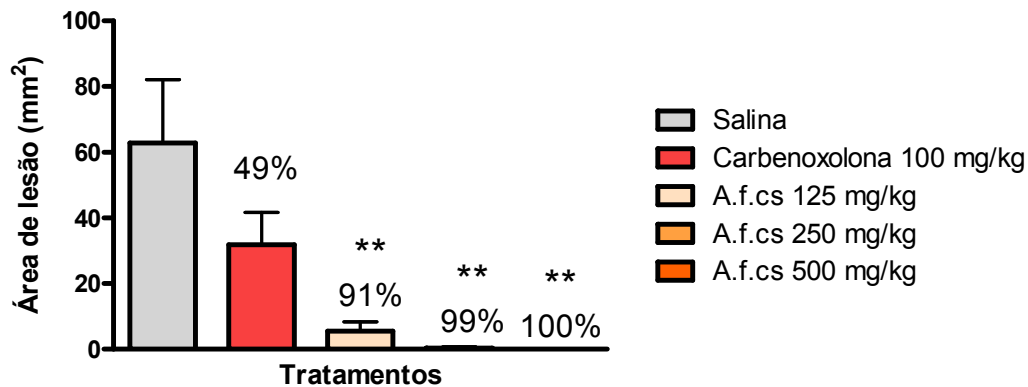


Figura 1: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de área de lesão. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para ** $p < 0,01$. Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo (salina).

Ainda neste modelo, foi macroscopicamente observado que a administração do extrato das folhas *A. fraxinifolium* também diminuiu significativamente a área das lesões provocadas pelo agente agressor (**fig. 2**). Tal efeito do extrato sugere também uma ação dose-dependente.

Figura 2: Efeito do pré-tratamento com extrato hidroalcoólico de folhas de *A. fraxinifolium* (A.f. fol) no modelo de indução de lesão gástrica por etanol absoluto em ratos.

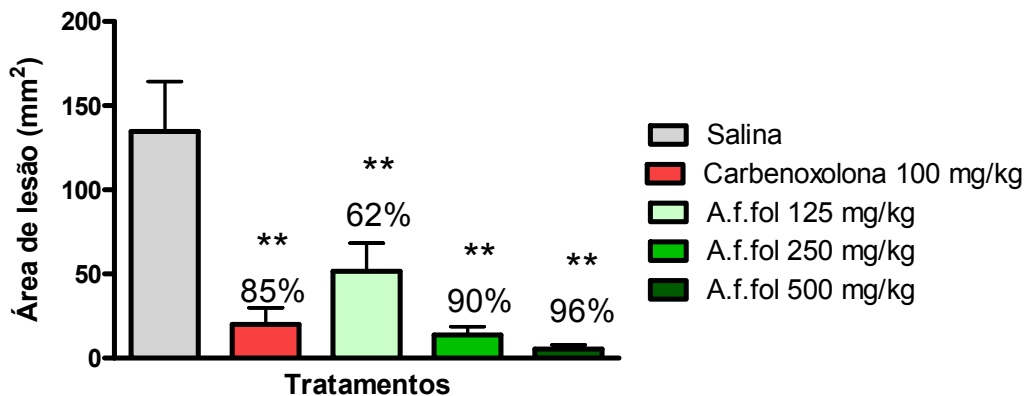


Figura 2: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de área de lesão. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para ** $p < 0,01$. Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo (salina).

Determinação do conteúdo de glutatona total

Foi observado que o tratamento com o extrato das folhas de *A. fraxinifolium* manteve normais os níveis de glutatona total da mucosa gástrica dos animais que sofrem efeito do etanol. Isto é, o extrato foi capaz de manter os níveis de glutatona semelhantes aos dos animais sham que não foram tratados com etanol. O tratamento com o extrato de cascas, entretanto, não apresentou o mesmo efeito, promovendo diminuição dos níveis de GSH (**fig. 3**), efeito semelhante ao do grupo controle negativo (salina).

Figura 3: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs e A.f.fol) sobre os níveis de glutatona total.

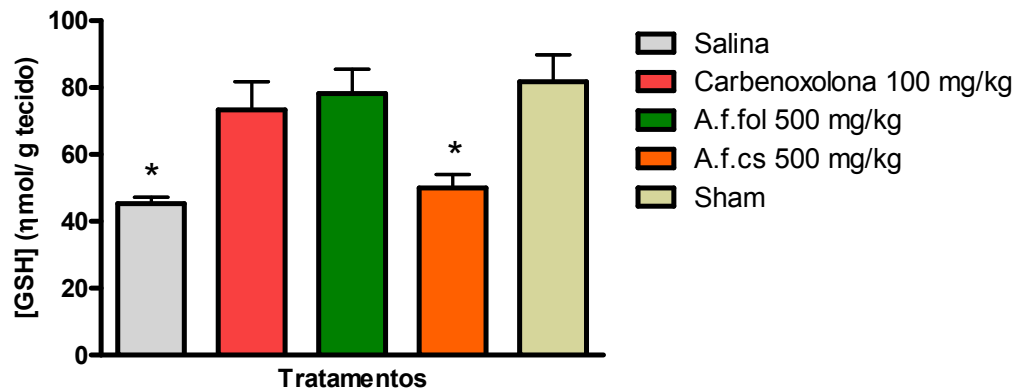


Figura 3: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de concentração de glutatona total. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $*p < 0,05$, em relação ao grupo sham.

Lesões induzidas por droga antiinflamatória não-esteroidal (DAINE)

No modelo de indução de lesões gástricas por DAINE, os resultados mostram ainda um grande efeito gastroprotetor dos extratos de cascas e folhas de *A. fraxinifolium* frente à ação lesiva da indometacina (figs. 4 e 5). Assim como no modelo de etanol, o maior percentual de gastroproteção (79 e 68%) foi obtido nas maiores doses de ambos os extratos, porém, não foi verificada a mesma relação dose-efeito, observada nas figuras 1 e 2.

Figura 4: Efeito do extrato hidroalcoólico de cascas *A. fraxinifolium* (A.f.cs) em experimento de úlcera induzida por droga antiinflamatória não-esteroidal.

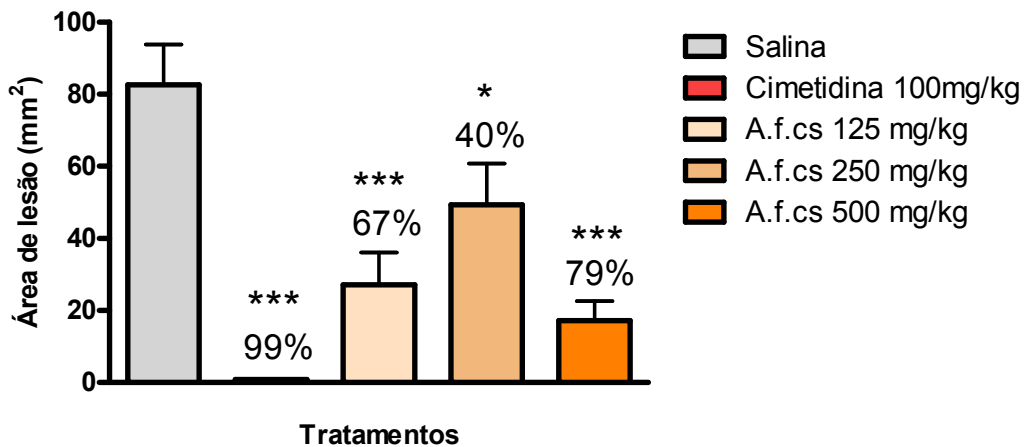


Figura 4: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de área de lesão. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo (salina).

Figura 5: Efeito do extrato hidroalcoólico de folhas *A. fraxinifolium* (A.f.fol) em experimento de úlcera induzida por droga antiinflamatória não-esteroidal.

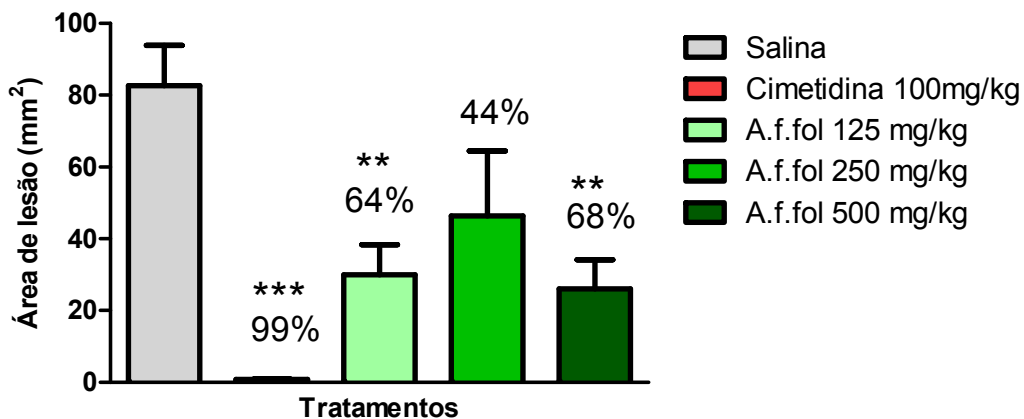


Figura 5: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de área de lesão. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo (salina).

Determinação do conteúdo de glutaciona total

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos com os extratos de *A. fraxinifolium* e o controle negativo (salina) quanto ao conteúdo de glutaciona total da mucosa gástrica (fig. 6).

Figura 6: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs e A.f.fol) sobre os níveis de glutatona total.

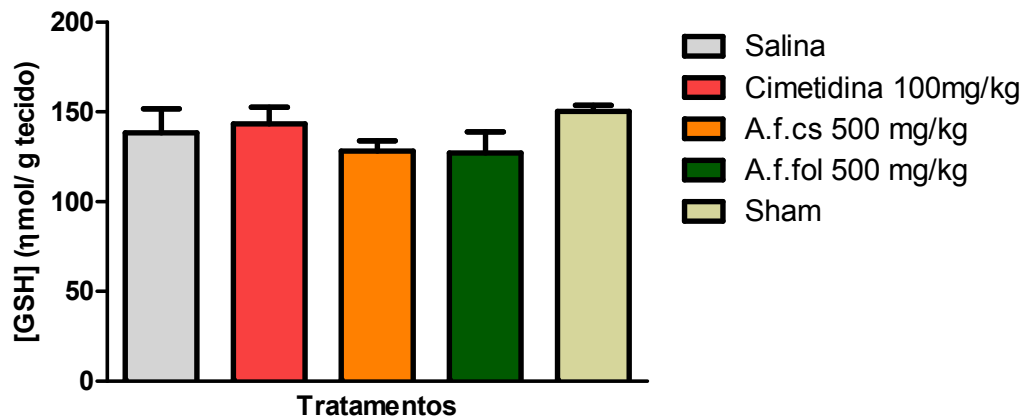


Figura 6: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de concentração de glutatona total. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ($p > 0,05$).

Modelo de ligadura de piloro- (via intraduodenal)

Lesões gástricas

No modelo de ligadura de piloro com administração dos tratamentos pela via intraduodenal, foi possível observar um grande efeito gastroprotetor de ambos os extratos (fig. 7).

Figura 7: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) em experimento de ligadura de piloro – via intraduodenal.

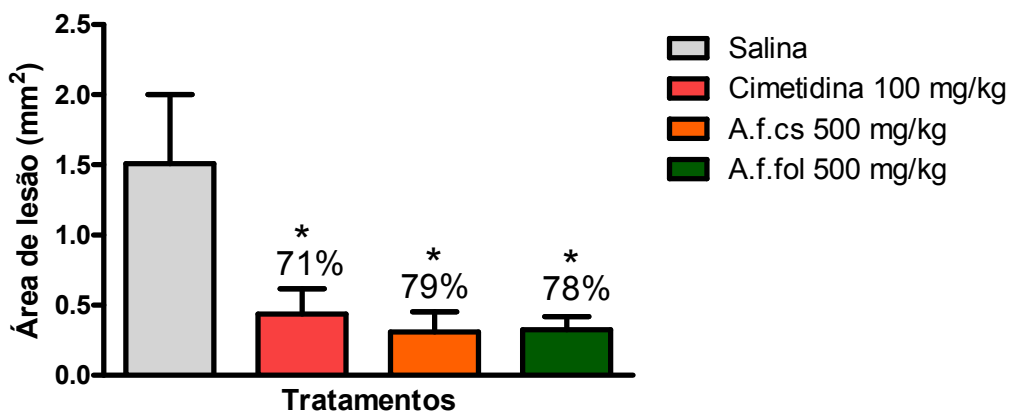


Figura 7: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de área de lesão. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para * $p < 0,05$. Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo (salina).

Volume do conteúdo estomacal

Foi determinado também o efeito dos diferentes tratamentos sobre o volume do conteúdo estomacal, resultando na diminuição significativa do volume do suco gástrico produzido com a administração de ambos os extratos pela via intraduodenal com relação ao tratamento de salina (**fig.8**).

Figura 8: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) em experimento de ligadura de piloro – via intraduodenal.

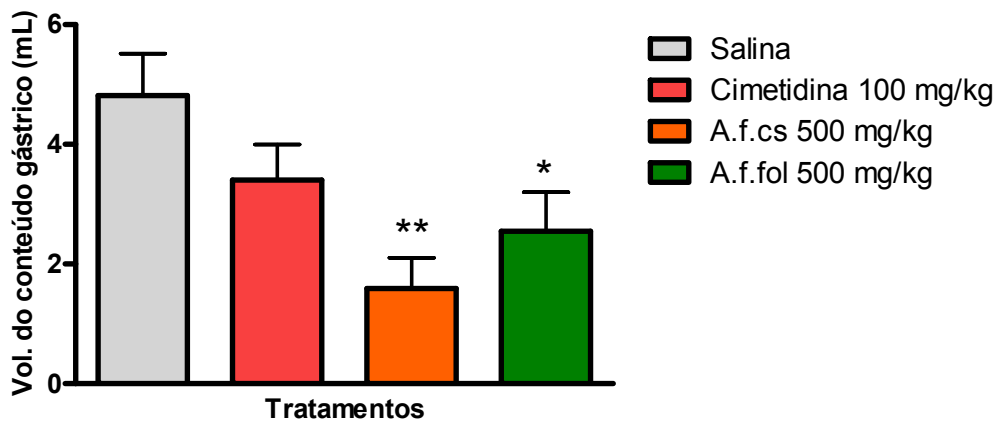


Figura 8: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de volume do conteúdo gástrico. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os valores em % representam a redução do volume do conteúdo gástrico em relação ao grupo controle negativo (salina).

Concentração hidrogeniônica

Neste modelo também foi determinada a concentração hidrogeniônica do conteúdo estomacal após os tratamentos. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$), mas é possível verificar que há um aumento de quase duas vezes na concentração de íons H^+ com o tratamento do extrato de folhas e pequena diminuição do mesmo parâmetro quando da administração do extrato de cascas (**fig.9**).

Figura 9: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) em experimento de ligadura de piloro – via intraduodenal.

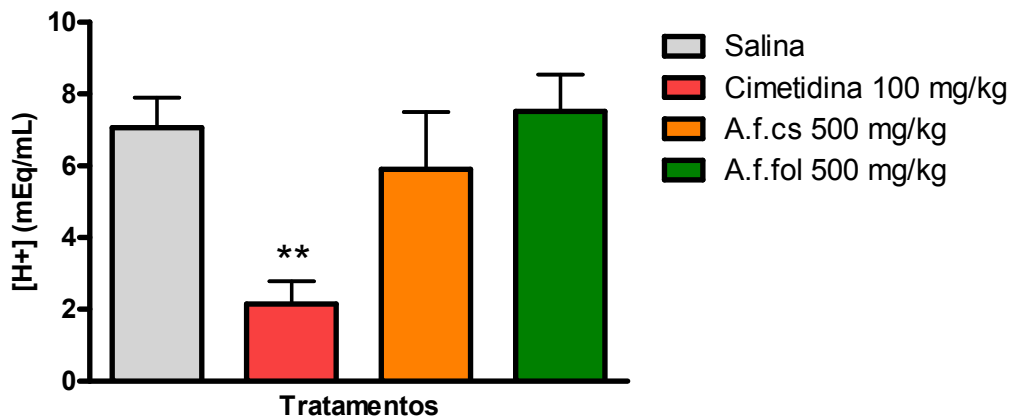


Figura 9: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de concentração hidrogeniônica. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para ** $p < 0,01$. Os valores em % representam a diminuição da concentração hidrogeniônica em relação ao grupo controle negativo (salina).

Avaliação do pH estomacal

O tratamento intraduodenal com o extrato de cascas promoveu o aumento significativo do pH estomacal, efeito semelhante ao obtido com administração também intraduodenal de cimetidina. Já o extrato de folhas não apresentou diferenças significativas neste parâmetro com relação ao grupo controle negativo (**fig. 10**).

Figura 10: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) sobre o pH estomacal de ratos em modelo de ligadura de piloro – via intraduodenal.

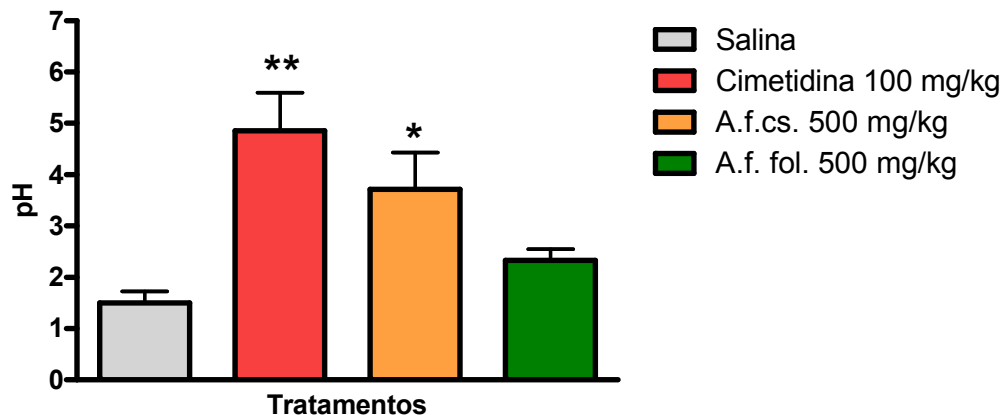


Fig. 10: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores pH. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Modelo de ligadura de piloro – (via oral)

Lesões gástricas

No modelo de ligadura de piloro com tratamento oral dos diferentes grupos, os resultados não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$), embora exista uma diminuição na área da lesão gástrica para o tratamento de ambos os extratos (**fig. 11**).

Figura 11: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) em experimento de ligadura de piloro – via oral.

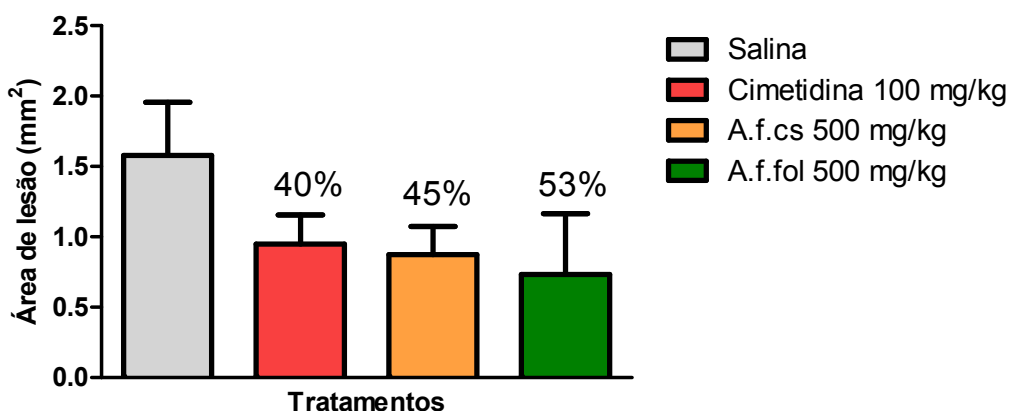


Figura 11: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de área de lesão. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ($p>0,05$). Os valores em % representam a atividade protetora em relação ao grupo controle negativo (salina).

Volume do conteúdo estomacal

O conteúdo estomacal coletado neste modelo teve seu volume determinado e os resultados apontam para um aumento do volume gástrico secretado promovido pela administração do extrato de cascas enquanto que a administração do extrato de folhas teve efeito contrário, apresentando ligeira diminuição no volume do conteúdo gástrico (**fig.12**). Os resultados dos efeitos dos extratos neste parâmetro não foram significantes ($p>0,05$).

Figura 12: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) em experimento de ligadura de piloro – via oral.

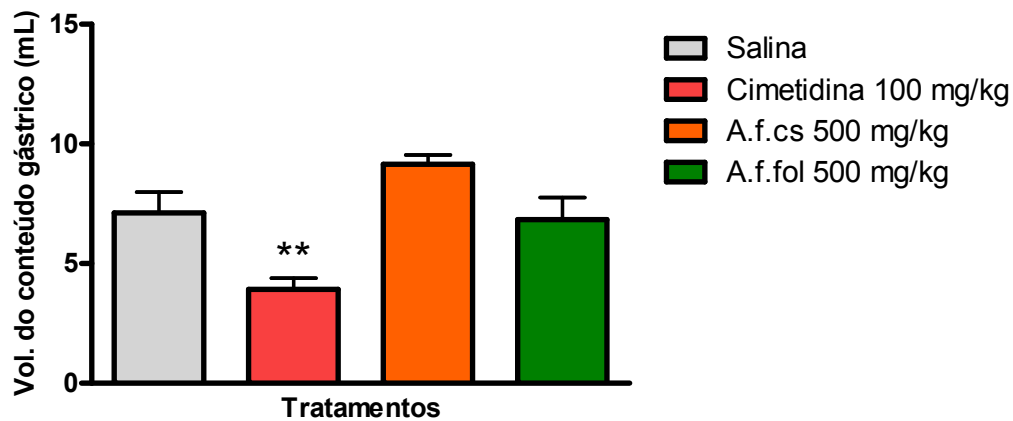


Figura 12: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de volume do conteúdo gástrico. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para ** $p < 0,01$.

Concentração hidrogeniônica

Neste modelo também foi determinada a concentração hidrogeniônica do conteúdo estomacal após os tratamentos. Foi possível verificar um efeito antissecretório de íons H^+ pela administração do extrato de cascas de *A. fraxinifolium*. Já o extrato de folhas não apresentou efeito sobre a secreção ácida (fig.13).

Figura 13: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) em experimento de ligadura de piloro – via oral.

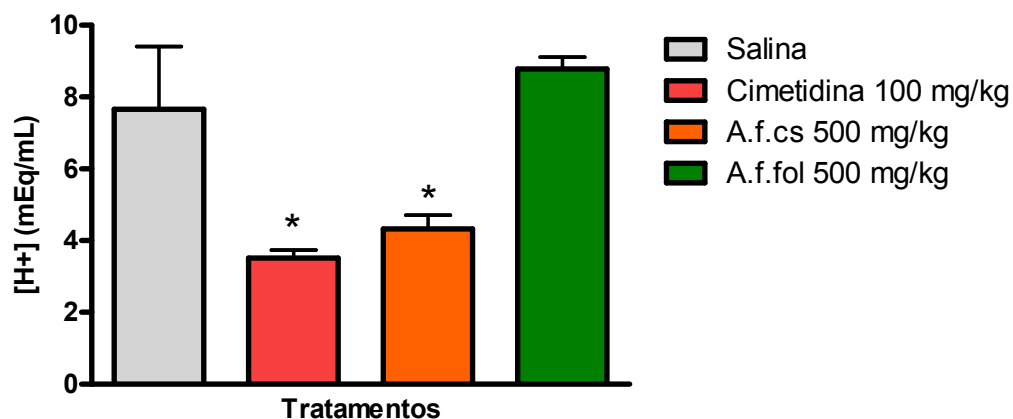


Figura 13: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores de concentração hidrogeniônica. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para * $p < 0,05$.

Avaliação do pH estomacal

O tratamento oral do extrato de folhas promoveu aumento significativo no pH estomacal, assim como o tratamento oral de cimetidina. Já para o tratamento com o extrato de cascas, o mesmo efeito não foi observado (**fig. 14**).

Figura 14: Efeito dos extratos hidroalcoólicos de cascas ou folhas de *A. fraxinifolium* (A.f.cs e A.f.fol) sobre o pH estomacal de ratos em modelo de ligadura de piloro – via oral.

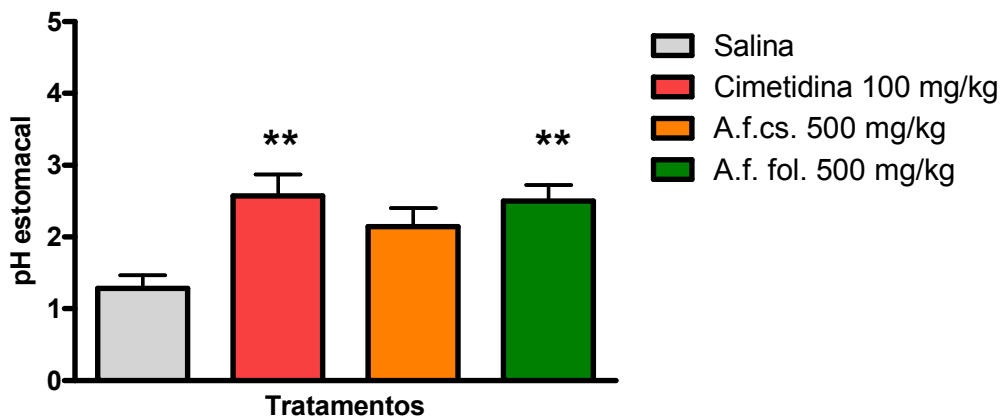


Fig. 14: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos valores pH. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $**p < 0,01$.

Determinação do envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção

A prévia administração i.p. do NEM (N-methyl-maleinide, bloqueador da formação do grupamento sulfidrílica) antes dos tratamentos orais com salina, carbenoxolona, A.f.cs. ou A.f.fol. provocou uma elevação expressiva nas lesões induzidas por etanol absoluto, quando comparados aos grupos pré-tratados com salina pela mesma via. Tal constatação é possível através da análise estatística expressas pelas barras pontilhadas transversais na **figura 15**. Em ambos os tratamentos com os extratos das cascas e das folhas, é possível observar uma significativa gastroproteção ($**p < 0,01$) ao promover 100% e 98% de diminuição das lesões gástricas,

respectivamente no pré-tratamento com salina, comparados aos seus respectivos grupos controles. Entretanto, através de uma comparação entre os animais pré-tratados com salina e tratados com A.f.cs. ou A.f.fol. em relação aos animais pré-tratados com salina e tratados com NEM e posteriormente tratados com A.f.cs. ou A.f.fol., é possível verificar que houve uma aumento expressivo das lesões ($p < 0,05$) quando o NEM foi administrado, isto é, diminuição do efeito gastroprotetor (62% e 80%, respectivamente). Os resultados obtidos neste modelo indicam, portanto, que as atividades gastroprotetoras de A.f.cs. e A.f.fol. apresentam forte participação dos compostos sulfidrilas endógenos no fortalecimento da barreira mucosa gástrica.

Figura 15: Efeito dos tratamentos orais com extratos hidroalcoólicos das cascas (A.f. cs) e das folhas (A.f. fol) de *A. fraxinifolium* sobre a área de lesão em modelo de determinação do envolvimento dos compostos sulfidrílicos na gastroproteção em ratos.

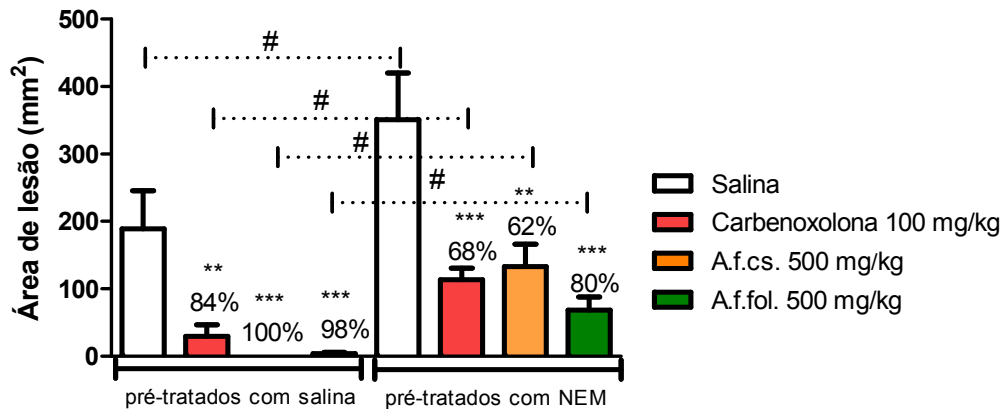


Figura 15: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. de valores de área de lesão (mm^2). ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, para $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. Os valores percentuais indicam a gastroproteção em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+salina ou NEM + salina). As diferenças significantes (# $p < 0,05$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina+tratamento e NEM+tratamento).

Determinação do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção.

O fármaco L-Name (inibidora da NO-sintase) administrado antes da indução de úlcera pelo etanol absoluto aumentou de maneira significativa a área lesionada em todos os grupos (controles negativo e positivo, extratos A.f.cs. e A.f.fol.) em relação aos mesmos grupos tratados com salina. É possível observar essas diferenças estatísticas pelas barras transversais pontilhadas na **figura 16**, de maneira a comparar os pré-tratamentos com L-NAME e salina de cada grupo experimental (divididos pelo tipo de tratamento oral). Ao se comparar os animais pré-tratados (*i.p.*) com salina e L-NAME, dos grupos que receberam o tratamento oral com o extrato de A.f.fol., pode-se verificar que o efeito gastroprotetor passa de 98% para 69,8% na presença do inibidor, sendo esta redução significativa ($p < 0,01$).

Figura 16: Efeito dos pré-tratamentos orais com extratos hidroalcoólicos das cascas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs.) e das folhas (A.f. fol.) sobre a área de lesão em modelo de determinação do envolvimento do óxido nítrico na gastroproteção em ratos.

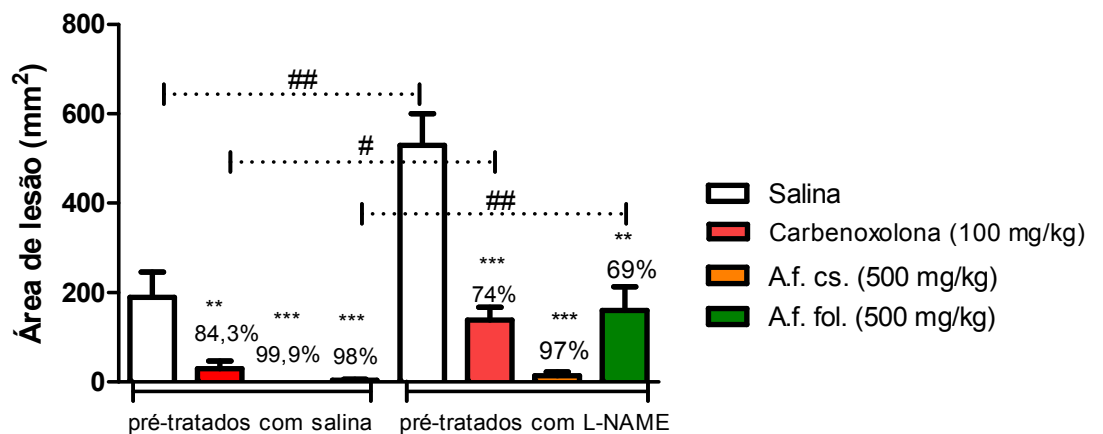


Fig. 16: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. de valores de área de lesão (mm^2). ANOVA seguida pelo teste de Dunnett. Os valores percentuais indicam a gastroproteção em relação aos seus respectivos grupos controle (salina+salina ou L-NAME+salina). As diferenças significativas (# $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$) são comparações entre os diferentes pré-tratamentos (salina+tratamento e L-NAME+tratamento).

Determinação da motilidade intestinal

Neste modelo, a administração oral do extrato de cascas de *A. fraxinifolium* diminuiu o deslocamento do carvão ativado em 21% ($p < 0,05$) enquanto que o extrato das folhas não alterou significativamente o deslocamento (**fig.17**). O tratamento do grupo controle positivo, tratado com a atropina, por sua vez diminuiu o deslocamento em 25% ($p < 0,01$).

Figura 17: Efeito dos pré-tratamentos orais com extrato hidroalcoólico das cascas (A.f.cs.) e das folhas (A.f.fol.) de *A. fraxinifolium* sobre a motilidade intestinal em camundongos.

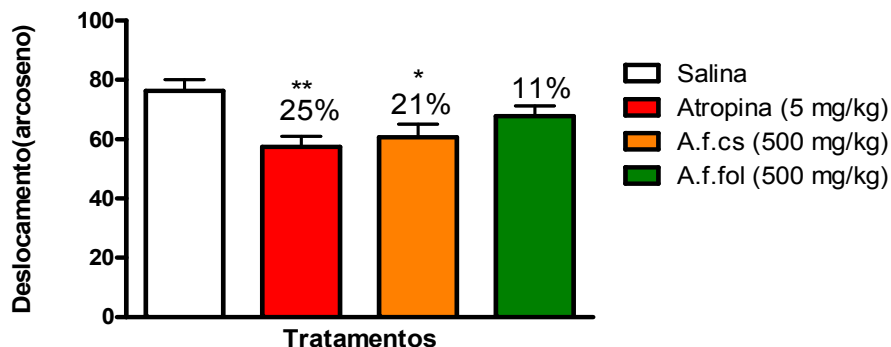


Fig.17: Resultados expressos em média \pm e.p.m. dos valores de índice de evacuações. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$. Os valores em % representam a diminuição do deslocamento (arcoseno) do carvão ativado em relação ao grupo controle negativo (salina).

Avaliação da atividade antidiarréica

Neste modelo foi observado um expressivo efeito antidiarréico da administração do extrato das cascas de *A. fraxinifolium*, fato não observado para o tratamento com o extrato das folhas na mesma dose. O efeito antidiarréico observado da administração do extrato das cascas pode ser demonstrado pela diminuição em 85% do índice de evacuações e pelo atraso do tempo para o início da primeira evacuação aquosa. Os resultados obtidos neste modelo podem ser melhor visualizados na tabela 1.

Tabela 1: Efeitos dos pré-tratamentos orais com extratos hidroalcoólicos das folhas (A.f. fol.) e das cascas (A.f. cs.) de *A. fraxinifolium* sobre os diferentes parâmetros no modelo de avaliação de atividade antidiarréica em camundongos

Grupo	N	Início das evacuações aquosas (min)	Inibição ^c (%)	Classificação			Índice de evacuações (IE)	Inibição [#] (%)
				Normal	Semi-sólido	Líquido		
Salina	5	100 ± 18,0	-	2	5	20	14,4 ± 2,1	-
Loperamida (5 mg/kg)	5	227,5 ± 25,4	127 ^{***}	7	7	6	7,8 ± 1,6	46 [*]
A.f. fol. (500 mg/kg)	5	62,8 ± 8,4	-37	2	11	19	16,2 ± 1,2	-12,5
A.f. cs. (500 mg/kg)	5	240 ± 0,0	140 ^{***}	3	4	0	2,2 ± 1,0	85 ^{***}

Tabela1: Resultados expressos em média ± e.p.m. ANOVA seguido pelo teste de Dunnet, *p<0,05 e ***p<0,001. ^c em relação ao tempo de início das evacuações aquosas, [#] em relação ao IE.

Modelo de acúmulo de fluido intestinal

O tratamento com o extrato de folhas aumentou o volume acumulado de modo significativo (17%, $p < 0,01$) enquanto que a administração do extrato de cascas não apresentou alteração significativa no volume acumulado em relação ao grupo controle negativo (fig.18).

Figura 18: Efeito dos pré-tratamentos orais com extratos hidroalcoólicos das folhas (A.f. fol.) e das cascas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs.) sobre o acúmulo de fluido intestinal em camundongos

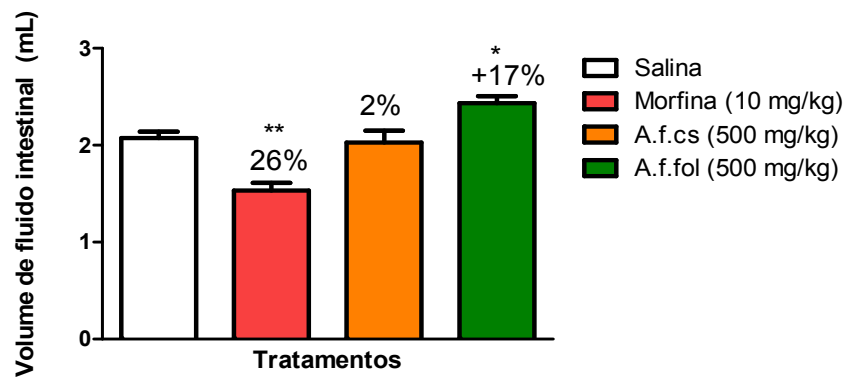


Figura 18: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. do volume de fluido intestinal. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Os valores em % representam a alteração do volume de fluido acumulado em relação ao grupo controle negativo (salina).

Avaliação do efeito antiedematogênico

O pré-tratamento pela via oral de 500 mg/kg do extrato de cascas de *A. fraxinifolium* foi capaz de reduzir o edema da pata dos ratos em 33% na primeira hora, 53.5% na segunda hora, 33 % na terceira hora e 15.5% na quarta hora de observação. Apesar das reduções evidentes do edema da pata dos animais, somente houve diferenças estatísticas em relação o efeito antiedematogênica na segunda e terceira horas de observação (fig.19).

Figura 19: Efeito do pré-tratamento oral com extrato hidroalcoólico das cascas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs.) após 1 hora da indução do edema de pata por injeção de carragenina em ratos.

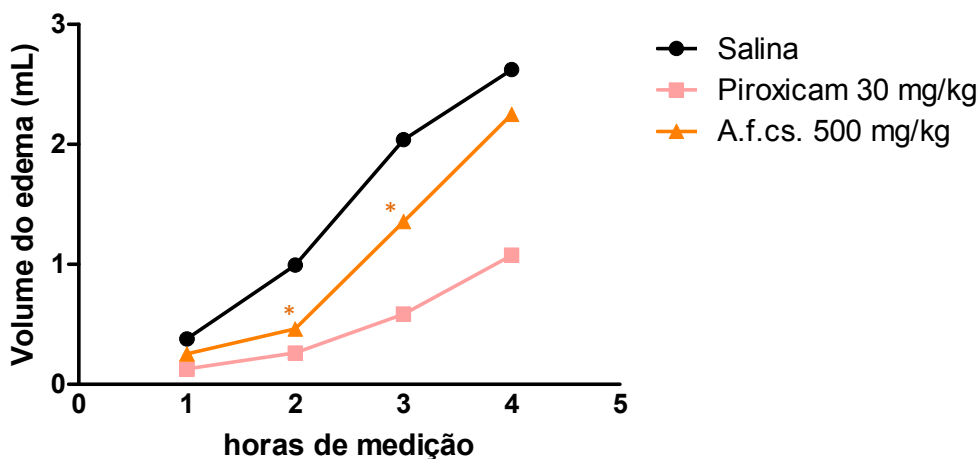


Figura 19: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos volumes de edema. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $*p < 0,05$.

Ao se modificar a via de administração do extrato das cascas de *A. fraxinifolium* para a via intraduodenal, alterando, portanto, a via de absorção do extrato, foi possível observar que na dose de 50 mg/kg, o extrato foi capaz de reduzir o edema da pata dos ratos em 69% na primeira hora, 85% na segunda hora, 98 % na terceira hora

e 91% na quarta hora de observação. Portanto, houve reduções muito mais evidentes do edema da pata dos animais dos animais por esta via onde a partir da segunda hora estas diferenças foram estatisticamente evidenciadas (**fig.20**).

Figura 20: Efeito do pré-tratamento intraperitoneal com extratos hidroalcoólicos das cascas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs.) no modelo de edema de pata em ratos.

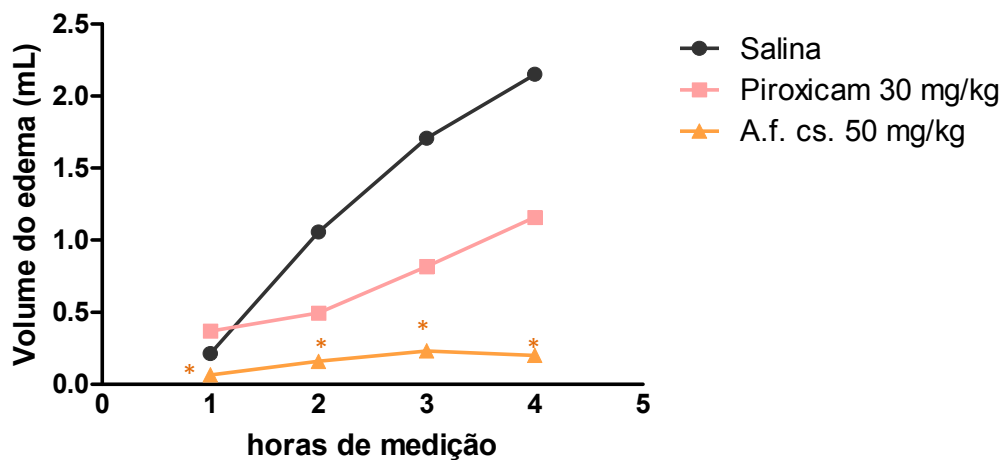


Figura 20: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos volumes de edema. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $*p < 0,05$.

O pré-tratamento pela via oral de 500 mg/kg do extrato de folhas de *A. fraxinifolium* não foi capaz de reduzir o edema da pata dos ratos em nenhum dos períodos observados. Através da análise da **figura 21** é possível até observar que o pré-tratamento com os extratos das folhas aumentou o edema da pata dos animais, porém sem evidências estatísticas.

Figura 21: Efeito do pré-tratamento oral com extrato hidroalcoólico das cascas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs.) após 1 hora da indução do edema de pata por injeção de carragenina em ratos.

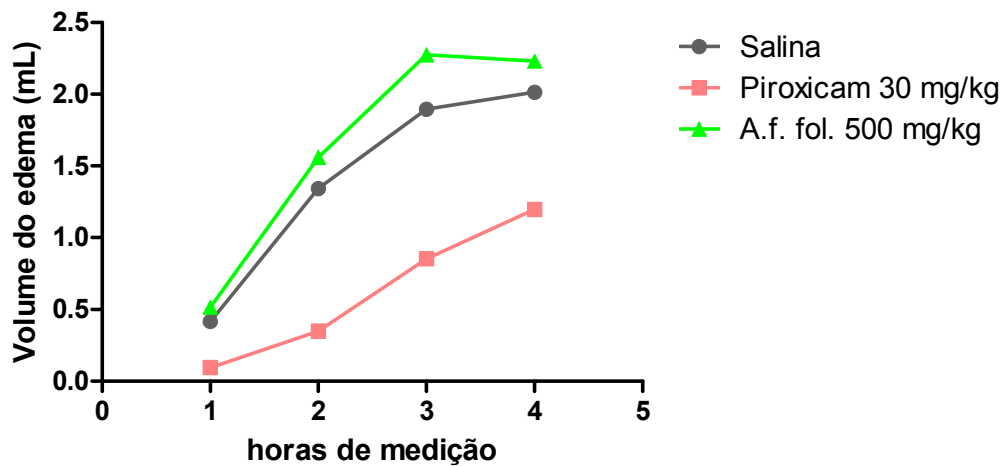


Figura 21: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos volumes de edema. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $*p < 0,05$. Os valores em % representam a redução do volume do edema da pata em relação ao grupo controle negativo (salina).

A alteração da via de administração do extrato das folhas de *A. fraxinifolium* (50 mg/kg) para a via intraperitoneal evidenciou o efeito edematogênico do extrato na primeira hora (62%) porém nenhuma outra alteração expressiva foi observada a partir da segunda hora de observação (**fig. 22**).

Figura 22: Efeito do pré-tratamento intraperitoneal com extrato hidroalcoólico das cascas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs.) após 1 hora da indução do edema de pata por injeção de carragenina em ratos.

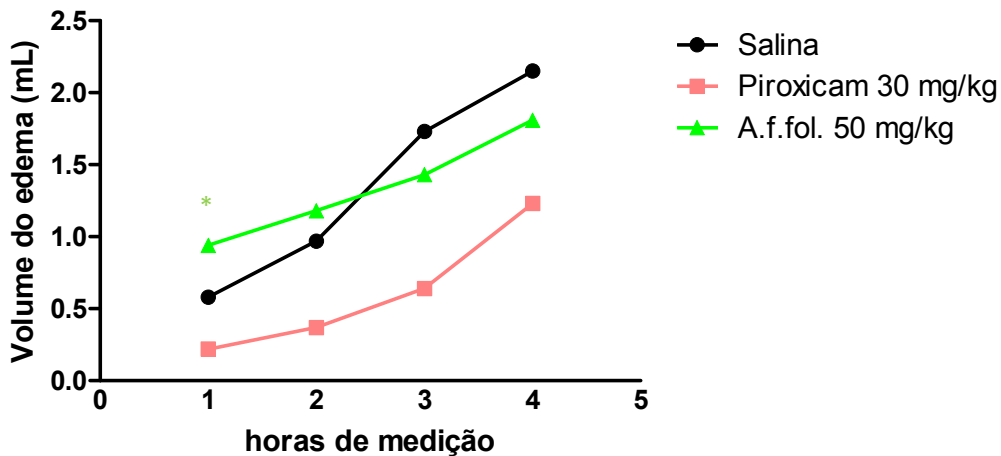


Figura 22: Resultados expressos pela média \pm e.p.m. dos volumes de edema. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett, para $*p < 0,05$. Os valores em % representam a redução do volume do edema da pata em relação ao grupo controle negativo (salina).

Avaliação da atividade anti-nociceptiva

Através do modelo de formalina, foi possível constatar que os extratos de cascas e folhas, na dose de 500 mg/kg, administrados pela via oral, foram capaz de reduzir a dor neurogênica – 1ª fase em 10% e 17%. Porém, estas reduções não são estatisticamente representativas (**fig. 23**). Entretanto, ambos os extratos também apresentaram atividade anti-nociceptiva para a dor inflamatória- 2ª fase com reduções de 37% e 46% respectivamente, sendo esta última representando diferenças estatisticamente significantes (**fig. 24**).

Figura 23: Efeito do pré-tratamento oral com extratos hidroalcoólicos das cascas e folhas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs. e A.f. fol.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos

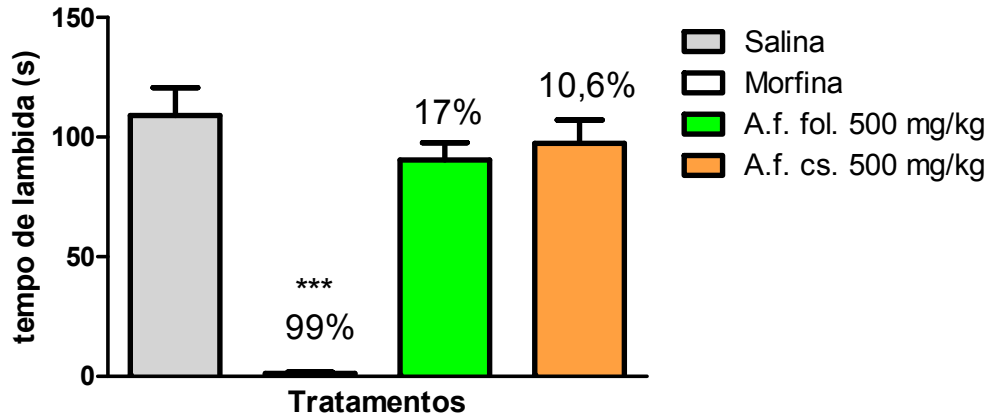


Figura 23: Resultados expressos em média \pm e.p.m. do tempo de lambida. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett para *** $p < 0,001$.

Figura 24: Efeito do pré-tratamento oral com extratos hidroalcoólicos das cascas e folhas de *A. fraxinifolium* (A.f. cs. e A.f. fol.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos

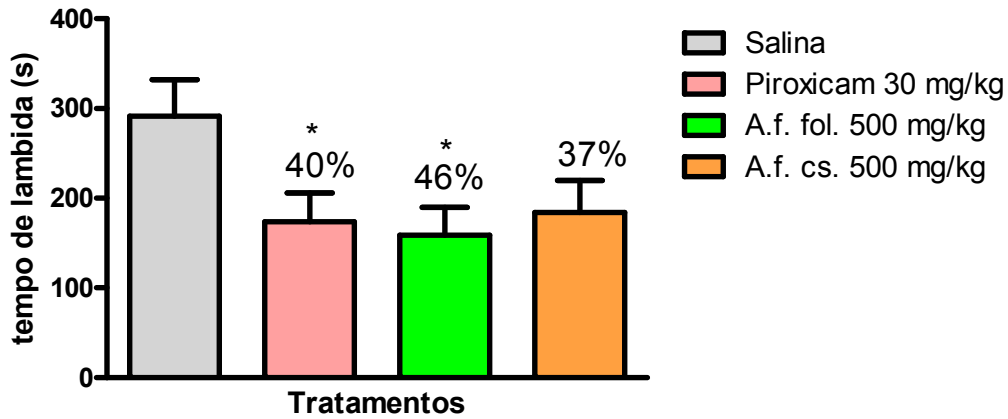


Figura 24: Resultados expressos em média \pm e.p.m. do tempo de lambida. ANOVA seguido pelo teste de Dunnett para * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Padrões de consumo abusivo de álcool existem na maioria dos países. O consumo está aumentando em muitos dos países em desenvolvimento e nos países da Europa Central e Oriental, embora esteja diminuindo nos países desenvolvidos (WHO, 2001). A ingestão excessiva de álcool está associada a diversas patologias em todos os níveis (Bujanda, 2000). Muitos estudos descreveram danos à mucosa gástrica após o consumo maciço de etanol tanto em humanos como em animais de experimentação (Franke *et al.*, 2005; Laine e Weinstein, 1988). Em ratos, o etanol induz estresse oxidativo, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (Mizui *et al.*, 1987), como os ânions superóxidos, produção de radicais hidroxilas, peroxidação lipídica (Bagchi *et al.*, 1998) e a fragmentação do DNA, levando às lesões gástricas. O etanol altera ainda o fluxo sanguíneo, produzindo necrose e hemorragia no tecido estomacal (Kwiecien *et al.*, 2002). Neste trabalho foi demonstrado o efeito gastroprotetor de ambos os extratos hidroalcoólicos da folhas e cascas de *A. fraxinifolium* sobre as lesões gástricas induzidas por um agente lesivo de máxima severidade que é o etanol absoluto administrado diretamente sobre a mucosa gástrica de ratos. Tanto as folhas como as cascas exerceram efeito gastroprotetor em todas as doses utilizadas sendo que as cascas de *A. fraxinifolium* exerceram uma ação protetora relativamente melhor do que as folhas (91 a 100% para as cascas vs. 62 a 96% para as folhas).

Além do etanol, outro fator indutor químico da lesão gástrica são as DAINES, medicamento amplamente prescritas para o tratamento da dor, febre, inflamação e doença trombotica. Entretanto, seu uso está associado aos efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal, tais como erosões na mucosa gástrica, ulceração, sangramento, perfuração e aumento de complicações severas em úlceras pré-existentes (Wallace, 2001). A patogênese dos danos à mucosa gástrica causados pelo uso das DAINES depende parcialmente de sua habilidade em reduzir a produção de prostaglandinas através da inibição das COX (Gudis e Sakamoto, 2005) e de outros mecanismos independentes da enzima COX, que incluem disfunção mitocondrial, disfunção no processo de renovação células e ativação de neutrófilos (Fiorucci *et al.*, 2001; Pastoris

et al., 2008). A ativação de ambos os mecanismos leva ao dano oxidativo dos tecidos, que parece exercer um importante papel na fisiopatologia da injúria à mucosa causada por DAINE (Hiraishi *et al.*, 2000). Experimentalmente, as úlceras induzidas pela administração de indometacina estão relacionadas à diminuição dos níveis de prostaglandinas da mucosa e da secreção de bicarbonato e muco, aumento dos radicais livres, da peroxidação lipídica e de leucotrienos (Ueki *et al.*, 1988; Kapui *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 1998), além de diminuir a atividade da glutatona peroxidase pela geração de espécies reativas de oxigênio, através da interferência no sistema antioxidante endógeno das células da mucosa (Takeuchi *et al.*, 1991; Yoshikawa *et al.*, 1993; Miura *et al.*, 2002; Odabasoglu *et al.*, 2006; Dengiz *et al.*, 2007).

Neste trabalho os resultados demonstraram um efeito gastroprotetor dos extratos hidroalcoólicos de folhas e cascas de *A. fraxinifolium* frente ao agente lesivo indometacina (DAINE). Diferentemente de seu comportamento frente ao etanol absoluto, ambos os extratos exerceram um efeito gastroprotetor de menor intensidade com proteções de 40% a 79% para as cascas e 44% a 68% para as folhas. Esta menor ação gastroprotetora frente a ambos os modelos experimentais pode indicar o envolvimento do estresse oxidativo. Estudos experimentais mostraram que a geração de radicais livres de oxigênio e peroxidação lipídica estão envolvidas na patogênese das lesões gástricas agudas induzidas por etanol, DAINES ou *H. pylori* (Hollander *et al.*, 1985; Das e Banerjee, 1993; Das *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1998).

A glutatona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existente no organismo sob duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Meister e Anderson, 1983). Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutatona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tais como as úlceras pépticas (Deneke e Fanburg, 1989; Oberley e Oberley, 1993; Navarro *et al.*,

1999).

Os resultados da concentração de glutathiona total apresentados neste trabalho indicam que a atividade gastroprotetora do extrato de folhas de *A. fraxinifolium* no modelo de etanol está diretamente relacionada com a manutenção dos níveis de glutathiona na mucosa gástrica. Porém, o mesmo não pode ser atribuído para o extrato das cascas desta espécie indicando, portanto, que outros fatores protetores devem estar envolvidos na ação deste extrato.

O modelo de ligadura de piloro induz úlceras gástricas devido ao acúmulo de secreção no estômago (Shay *et al.*, 1945) pela estimulação vagal sobre as células parietais (Brodie, 1966; Brodie e Knapp, 1966; Håkanson *et al.*, 1980). No modelo de ligadura de piloro, a administração dos extratos apresentou diferentes efeitos de acordo com a via de administração. O extrato de cascas de *A. fraxinifolium*, quando administrado via intraduodenal (efeito sistêmico), diminuiu significativamente a área das lesões gástricas, o volume de conteúdo gástrico total e aumentou o pH do suco gástrico. Este mesmo extrato, quando administrado oralmente (efeito local) não promoveu redução significativa das lesões gástricas, do volume do conteúdo gástrico total e nem do pH ($p > 0,05$), mas apresentou diminuição significativa na concentração de íons H^+ no conteúdo estomacal quando comparado ao grupo salina. Os extratos das folhas desta espécie apresentaram resultados muito semelhantes aos obtidos pelas cascas. Tais resultados apontam para uma ação antissecretória dos extratos das cascas e folhas que exercem sua ação predominantemente via administração sistêmica do que local.

Um importante fator que também contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de compostos SH (sulfidrílicos) que tem como finalidade básica o fortalecimento de pontes de dissulfeto assim como reduzir a formação de radicais livres derivados de oxigênio, relacionados com a proteção celular (Konturek *et al.*, 1990; Matsuda, 1999). Os efeitos gastroprotetores dos compostos SH incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzidos por diversos agentes e circunstâncias, como ocorre com as exposições tóxicas como o próprio etanol na mucosa gástrica (Takeuchi *et al.*, 1988; Konturek *et al.*, 1990). Em

contrapartida, a redução dos níveis normais de SH tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (Glavin e Szabo, 1992; Ko e Cho, 1995).

Este trabalho demonstrou que o pré-tratamento com o depletor dos compostos sulfidrílicos endógenos (NEM) em todos os grupos tratados, provocou um aumento expressivo das lesões gástricas induzidas pelo etanol. O aumento significativo das lesões dos animais pré-tratados com NEM e tratados com os extratos, evidenciou a importância dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção dos extratos de *A. fraxinifolium*, indicando, portanto, a forte participação deste componente no mecanismo de ação de ambos os extratos.

Estudos indicam também que o NO está envolvido na preservação da mucosa em modelos experimentais de úlcera gástrica por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também por uma ação antiinflamatória nos tecidos (Cho, 2001; Kwiecién *et al.*, 2002; Ancha *et al.*, 2003). Ao avaliar a participação do NO na gastroproteção conferida pelos extratos de *A. fraxinifolium*, pode-se observar que a administração do extrato de cascas impediu a formação das lesões gástricas pelo etanol na presença do inibidor de síntese de NO (L-NAME) em relação ao grupo tratado com salina. Porém, ao se comparar os resultados dos grupos de animais tratados com os extratos de folhas, é evidente a perda significativa da gastroproteção do extrato na presença de L-NAME em relação ao grupo pré-tratado sem o inibidor (98% vs 69%). Tais resultados permitem dizer que o extrato de folhas de *A. fraxinifolium* apresenta também a ação gastroprotetora relacionado à atividade do óxido nítrico sobre a mucosa gástrica.

A análise fitoquímica das folhas indica a presença de 10 flavonóides glicosilados (apigenina-6-C- β -glicopiranosídeo, quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo, apigenina-8-C- α -glicopiranosídeo, 5-O-metoxiluteolina, kaempferol-3-O- α -rhamnopiranosídeo, rhamnetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo; miricetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo; quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo e quercetina-3-O- β -xilopiranosídeo) os prováveis responsáveis pela atividade

gastroprotetora exercida pelo extrato de folhas da *A. fraxinifolium*. O extrato hidroalcoólico das cascas foi analisado por Espectrometria de Massas e a partição deste, apenas promoveu a separação seletiva de monômeros e polímeros de catequinas ou comumente chamadas de taninos condensados.

Considerando que as úlceras gástricas consistem em lesões na mucosa gástrica originadas do desequilíbrio entre os fatores protetores (secreção de muco gastroduodenal, produção de bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado, NO, compostos sulfidrílicos endógenos, antioxidantes como a glutatona, dentre outros) e lesivos (excesso de pepsina e/ou ácido clorídrico, radicais livres ou formadores destes) (Wallace e Granger, 1996; Maity *et al.*, 2003, Shichijo *et al.*, 2003) pode-se caracterizar até o presente que o extrato hidroalcoólico das cascas apresenta um efeito gastroprotetor efetivo e que esta ação se deve ao fortalecimento dos fatores protetores e os compostos sulfidrílicos endógenos e uma redução da ação secretória do suco gástrico. Em contrapartida, o extrato hidroalcoólico das folhas possui sua ação gastroprotetora pela ativação dos fatores protetores como a glutatona, compostos sulfidrílicos endógenos, NO e uma efetiva ação antissecretória.

Além do efeito antiulcerogênico, este trabalho também se propôs a avaliar a ação antidiarréica desta espécie, considerando a indicação popular para esta finalidade.

A Organização Mundial da Saúde define a diarreia como a passagem de fezes aquosas por pelo menos três vezes num período de 24 horas, isto é, a diarreia consiste basicamente na perda de um volume excessivo de líquido pelas fezes (WHO, 1995), que pode ser causada por uma alteração no transporte de elétrons e água pela mucosa intestinal. Em situações normais, a secreção intestinal tem a função de adequar a concentração de nutrientes, água e eletrólitos sobre a superfície do epitélio absorptivo. Além disso, a secreção intestinal pode também exercer um papel importante nos mecanismos homeostáticos tais como no controle de fluídos e balanço ácido-base do organismo (Lundgren, 2002). A diarreia e o próprio aumento no trânsito intestinal interferem na formação das úlceras duodenais e na absorção de nutrientes no intestino a partir do momento que eleva o contato do suco gástrico não tamponado

sobre o intestino o que promove a erosão na mucosa duodenal (Bertaccini e Scapignato, 1981).

Na avaliação do efeito dos extratos sobre a motilidade intestinal, o tratamento com a atropina e com o extrato de cascas de *A. fraxinifolium* reduziu a distância percorrida pelo carvão ativado (marcador) em 25% e 21%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo (salina), enquanto o extrato de folhas não reduziu a motilidade nos animais em relação ao controle salina.

A ingestão de óleo de rícino induz mudanças na permeabilidade da mucosa intestinal e transporte eletrolítico, os quais resultam num acúmulo de fluido, que flui rapidamente através do intestino, constituindo a diarreia (Gaginella *et al.*, 1975). A atividade antidiarréica apresentada pelo pré-tratamento com extrato das cascas de *A. fraxinifolium* mostrou-se significativa, praticamente revertendo o efeito catártico do óleo de rícino. Tal efeito pode ser atribuído aos taninos condensados, que são os componentes fitoquímicos majoritários deste extrato, pois segundo Okuda (2005), os taninos são responsáveis por diversas atividades biológicas, tais como a ação antidiarréica e a anti-hemorragica.

Na avaliação do efeito dos extratos de *A. fraxinifolium* sobre o acúmulo de fluido intestinal, o tratamento com o extrato de folhas causou um aumento significativo desse parâmetro ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo, enquanto o extrato de cascas não promoveu modificação no acúmulo. Considerando os resultados obtidos com o tratamento com os extratos de *A. fraxinifolium*, pode-se considerar que o extrato, predominantemente das cascas possui significativa ação antidiarréica, que poderá atuar, entre outros fatores, na diminuição do trânsito gastrointestinal, tendo sua absorção otimizada, possivelmente melhorando a sua própria ação gastroprotetora.

Além da indicação popular da espécie *A. fraxinifolium* para o tratamento da diarreia, outra indicação citada pela população é o tratamento de artrites e reumatismos, esse trabalho também se propôs a avaliar a ação antiinflamatória deste extrato vegetal.

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas

(*Chondrus crispus*), que depois de injetada na pata do rato, produz uma reação inflamatória aguda (Vinegar *et al.*, 1987; Winter *et al.*, 1962), provocando um aumento da sensibilidade ao estímulo doloroso térmico ou mecânico, constituindo a hiperalgesia (Nantel *et al.*, 1999). O modelo experimental de indução de edema de pata por carragenina é adequado para avaliar o efeito antiedematogênico de produtos naturais e acredita-se ser bifásico: a primeira hora envolve a liberação de serotonina, histamina, bradicinina, PAF (fator de agregação plaquetária), substância P, dentre outras substâncias; e a partir da primeira hora, o edema é mantido principalmente pelas prostaglandinas (Di Rosa *et al.*, 1971; Williams, 1979; Teixeira *et al.*, 1993; Gilligan *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 2000; Perianayagam *et al.*, 2006). O pré-tratamento oral e intraperitoneal com o extrato das cascas de *A. fraxinifolium* apresentou um expressivo efeito antiedematogênico, representado pela diminuição do volume de edema nas medições a partir da segunda hora de avaliação. A formação do edema de pata por carragenina é resultado do sinergismo entre os vários mediadores inflamatórios que promovem o aumento da permeabilidade vascular, bem como o aumento do fluxo sanguíneo, entre outros fatores (Ialenti *et al.*, 1995). Entretanto o pré-tratamento com o extrato das folhas, por sua vez, não apresentou nenhum efeito significativo sobre a formação do edema de pata neste modelo, apesar deste extrato possuir qualitativamente a presença de flavonóides em sua composição, que já existem relatos na literatura de propalada ação antiinflamatória.

Então, novo modelo experimental foi utilizado para caracterizar melhor este extrato. A injeção subcutânea de formalina produz uma distinta nocicepção bifásica. A primeira fase começa imediatamente após a injeção de formalina e continua por 5 minutos, e passada esta primeira fase, a nocicepção parece diminuir. A segunda fase retoma os níveis elevados de nocicepção e tem início 15 a 20 minutos após a injeção de formalina e continua até 60 minutos (Hunnskaar e Hole, 1987). A primeira fase parece ser devido à química direta da estimulação dos nociceptores, já a segunda fase é dependente da inflamação periférica e alterações no processamento central (Sayyah *et al.*, 2004). As substâncias envolvidas na primeira fase (neurogênica) são a substância P e a bradicinina, enquanto que na segunda fase (inflamatória), estão envolvidas as

seguintes substâncias: serotonina, histamina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas (García *et al.*, 2004). O efeito inibitório da nocicepção na segunda fase do teste da formalina, promovido pelo pré-tratamento com o extrato das folhas de *A. fraxinifolium*, pode ser atribuído a uma ação periférica, isto é, antiinflamatória, a qual pode estar envolvida com a diminuição de substâncias pró-inflamatórias não relacionadas com a formação do edema de pata por carragenina, uma vez que o pré-tratamento com o A.f.cs. não apresentou efeito significativo neste último modelo. Recentemente, os flavonóides têm recebido maior atenção devido às descobertas de suas diversas atividades farmacológicas, tais como antiinflamatória, analgésica, anti-tumoral, anti-HIV, antiinfeciosa (antidiarréica, anti-fúngica), antioxidante, entre outras (Gurib-Fakim, 2006). Dentre os diversos tipos de flavonóides, estão aqueles que inibem potencialmente a síntese de prostaglandinas (Manthey, 2000), sendo alguns destes efeitos devidos à inibição de enzimas envolvidas na biosíntese de prostaglandinas, tais como a lipoxigenase, fosfolipase e ciclooxigenase (Manthey *et al.*, 2001). O efeito antiinflamatório e antinociceptivo do A.f.fol. pode ser devido, portanto, aos seus componentes majoritários, os flavonóides.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível concluir que:

- o extrato hidroalcoólico das folhas e cascas de *Astronium fraxinifolium* possui ação gastroprotetora frente a agentes ulcerogênicos como etanol absoluto e droga antiinflamatória não-esteroidal. Ambos os extratos atuam via ativação dos compostos SH e que o extrato das folhas atua também via ação da glutatona, ativação do NO que conjuntamente para ativar os fatores gastroprotetores da mucosa gástrica;
- Apenas o extrato de cascas reduziu a motilidade intestinal e apresentou ação antidiarréica ao reduzir os índices de evacuação e aumentar significativamente o tempo para o início das evacuações aquosas induzidas por óleo de ricino;

- O extrato das cascas de *A. fraxinifolium* possui ação antiedematogênica quando administrado pela via oral e intraperitoneal mas o extrato das folhas desta espécie possui ação antiinflamatória quando administrado pela via oral;
- A composição fitoquímica dos extratos das cascas e folhas são distintos qualitativamente compostos por taninos condensados e flavonóides, respectivamente, o que pode explicar as propriedades farmacológicas observadas para cada um dos extratos e
- a indicação etnofarmacológica como antidiarréico e antiinflamatório para a espécie foi confirmada através de ensaios pré-clínicos in vivo mas novos estudos se fazem necessários para avaliar a viabilidade desta espécie como fitomedicamento ou fitoterápico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.C.; HALIMTON, R.J. Rancidity and foods. **Blackie Academic and Professional**, London, UK, 2000.
- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. **EMBRAPA**, CPAC, 1998.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 548-555, 1985.
- AWOINTERS, F.; NIEMEGERES, C.J.E.; LENAERTS, F.M.; JANSEEN, P.A.J. Delay of castor oil diarrhoea in rats: a new way to evaluate inhibitors of prostaglandin synthesis. **J of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, p. 41–5, 1978.
- BAGCHI, D.; CARRYL, O.; TRAN, M.; KROHN, R.; BAGCHI, D.J.; GARG, A.; BAGCHI, M.; MITRA, S.; STOHS, S. Stress, diet and alcohol induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **Journal of Applied Toxicology**, v. 18, suppl 1, p. 3-13, 1998.
- BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-8, 2003.
- BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, p.431-441, 2005.
- BERTACCINI, G. & SCAPIGNATO, C. Histamine H₂ antagonists modify gastric emptying in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.77, p. 434–448, 1981.
- BRANDÃO, M.; CARVALHO, P.G.S.; JESUÉ, G. Guia ilustrado de plantas do Cerrado de Minas Gerais – 3ª ed., São Paulo: **Editora Empresa das Artes**, p. 57, 2003
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos– 2ª ed., Brasília, DF: **Editora Coronário**, 2006.
- BRODIE, D. A.; KNAPP, P. G. The mechanism of the inhibition of gastric secretion produced by esophageal ligation in the pylorus-ligated rat. **Gastroenterology**, v. 50, p. 787-795, 1966.

- BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; SLIWOWSKI, Z.; PAJDO, R.; DROZDOWICZ, D., PTAK, A.; HAHN, E.G., Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. **Microsc. Res. Tech.**, v.53, p.343– 353, 2001. BUJANDA, L. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 12, p. 3374-3382, 2000.
- BYTZER, P.; TEGLBJAERG, P. S. Helicobacter pylori-negative duodenal ulcers: prevalence, clinical characteristics, and prognosis – results from a randomized Trial with 2-year follow-up. **American Journal of Gastroenterology**, v.96, p.1409-1416, 2001.
- CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v.2, p.261-279, 2001.
- COLLIER, D. S.; PAIN, J. A. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and peptic-ulcer perforation. **Gut**, v.26, p.359-363, 1985.
- DAS, D.; BANERJEE, R.K. Effect of stress on the antioxidant enzymes and gastric ulceration. **Mol Cell Biochem**, v. 125, p. 115-125, 1993.
- DAS, D.; BANDYOPADHYAY, D.; BANERJEE, R.K. Oxidative Inactivation of Gastric Peroxidase by site-Specific Generation of Hydroxyl Radical and Its Role in Stress-Induced Gastric Ulceration. **Free Radical Biol Med**, v. 24, p. 460-469, 1998.
- DAS, D.; BANDYOPADHYAY, D.; BHATTACHARJEE, M.; BANERJEE, R.K. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. **Free Radical Biol Med**, v. 23, n. 1, p. 8-18, 1997.
- DENEKE, S.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol**, 257, L163, 1989.
- DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; CADIRCI, E.; HALICI, M. Gastroprotective and antioxidant effects of motelukast on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **J Pharmacol Sci**, v. 105, p. 94-102, 2007.
- DESMARCHELIER, C.; LISBOA ROMÃO, R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. 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.
- DI STASI, L. C. Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudos interdisciplinar – São Paulo: Editora UNESP, 1996.
- DICARLO, G.D.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Effects of quercetin on gastrointestinal tract in rats and mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 42–45, 1994.
- FAN, T.Y.; FENG, Q.Q.; JIA, C.R.; FAN, Q.; LI, C.A.; BAI, X.L. Protective effect of Weikang decoction and partial ingredients on model rat with gastric mucosa ulcer. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 8, p. 1204-1209, 2005.
- FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL.; FARNSWORTH, N.R., AKERELE,O., BINGEL, A.S., SOEJARTO, D.D., GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v.63, p.965-981, 1985.
- FINE, K. D.; KREJS, G. J.; FORDTRAN, J. S. Diarrhea. In: Sleisenger, M. H.; Fordtran, J. S., eds. *Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. Philadelphia:WBSaunders, 6ª ed., p.1043-1072, 1998.
- FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A. Mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drug-gastropathy. **Dig Liver Dis**, v. 33, suppl. 2, p. S35–43, 2001.
- FRANKE, A., TEYSSEN, S., SINGER, M.V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. **Dig Dis**, vol. 23, p. 204–213, 2005.
- FURST, D.E. & MUNSTER, T. Antiinflamatórios não-esteróides, agentes anti-reumáticos modificadores da doença, analgésicos não-opiíides & drogas utilizadas na gota. In: Katzung, B.G. *Farmacologia básica & clínica – 8ª ed.*, Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, p. 518-541, 2003.
- GAGINELLA, T.S.; STEWART, J.J.; OLSEN, W.A.; BASS, P. Action of ricinoleic acid and structurally related fatty acid on the gastrointestinal tract. II. Effect on water and electrolyte absorption in vitro. **J of Pharmacological and Experimental Therapy**, v. 195, p. 355–61, 1975.
- GARCÍA, M.D.; FERNANDEZ, M.A.; ALVAREZ, A.; SAENZ, M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 69–73, 2004.

- GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; WIKKIS, D. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat. Med.**, v.5, p.698– 701, 1999.
- GLAVIN G.; SZABO S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB J.**, v. 6, p. 825-831, 1992.
- GROB, G. N. The rise of peptic ulcer, 1900-1950. **Perspect Biol Med**, v. 46, n. 4, p. 550-566, 2003.
- GUDIS, K.; SAKAMOTO, C. The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection. **Dig Dis Sci**, v. 50, suppl. 1, p. S16–23, 2005.
- GUERRA, P. M.; NODARI, R. Biodiversidade: aspectos biológicos , geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p.15.
- GUIDOBONO, F.; PAGANI, F.; TICOZZI, C.; SIBILIA, V.; PECILE, A.; NETTI, C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br J Pharmacol**, v. 120, p. 581-586, 1997.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.
- HÅKANSON, R.; HEDENBRO, J.; LIEDBERG, G.; SUNDLER, F.; VALLGREN, S. Mechanisms of gastric acid secretion after pylorus and oesophagus ligation in the rat. **J Physiol**, v. 305, p. 139-149, 1980.
- HARRIS, R.C. The macula densa: recent developments. **J Hypertens**, v.14, p.815–822, 1996.
- HAWKEY, C.J. COX-2 inhibitors. **Lancet**, v. 353, n. 9149, p. 307-314, 1999.
- HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; TERANO A. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of NSAID-induced gastric mucosal damage. **J Gastroenterol**, v. 35, p. 567–569, 2000.
- HIRUMA-LIMA, C.A.; Atividade antiulcerogênica da desidrocrotina e do óleo essencial obtido a partir das cascas de *Croton cajucara* Benth., uma planta da família Euphorbiaceae. **Tese de Doutorado**, Unicamp, 1998.

- HOLLANDER, D.; TARNAWSKI, A.; KRAUSE, W. J.; GERGELY, H. Protective effect of sucralfate against alcohol induced gastric mucosal injury in the rat. Macroscopic, histologic, ultrastructural, and functional time sequence analysis. **Gastroenterology**, v. 88, p. 366-374, 1985.
- HUANG, J.Q.; SRIDHAR, S.; HUNT, R.H. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. **Lancet**, v.359, p.14-22, 2002.
- HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-104, 1987.
- IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur J Pharmacol**, v. 211, p. 177–182, 1995.
- ISHIHARA, M.; ITO, M. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of cimetidine and omeprazole. **Eur J Pharmacol**, v. 444, n. 3, p. 209-215, 2002.
- JANCAR, S. Imunidade natural e inflamação. In: Calich, V.; Vaz, C. *Imunologia – 1ª ed.*, Rio de Janeiro: **Editora Revinter**, p.13, 2001.
- KALYANAKRISHNAN RAMAKRISHNAN, M. D. FRCSE; SALINAS, R.C. Peptic ulcer disease. **American Family Physician**, v.76, n.7, 2007.
- KANG, J.Y.; TINTO, A.; HIGHAM, J.; MAJEED, A. Peptic ulceration in general practice in England and Wales 1994-98: period prevalence and drug management. **Aliment Pharmacol Ther**, v.16, p.1067-1074, 2002.
- KAPUI, Z.; BOER, K.; ROZSA, I.; BLASKO, G.; HERMECZ, J. Investigations induced gastric ulcer in rat. **Arzneimittelforschung**, v. 43, p. 767–771, 1993.
- KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: Stitching together naturally. *Nature*, v.1, p.748, 2002. In: Kushima, H. Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. e *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (Dilleniaceae), **Tese de mestrado**, UNESP, 2006.
- KNOLL, M.R.; KOLBEL, C.B.; TEYSSEN, S. Action of pure ethanol and some alcoholic beverages on the gastric mucosa in healthy humans: A descriptive endoscopic study. **Endoscopy**, v.30, p.293-301, 1998.

- KO, J. K. S.; CHO, C. H.. The role of non-protein sulfhydryl compound in gastric adaptative citoprotections against ethanol-induced mucosal damage in rats. *Inflamm. Res.*, v. 44, p242-244, 1995.
- KONTUREK, P. K ; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; DEMBINSKI, A. Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions. *Gastroenterol.*, v. 99, p. 1607-1615, 1990.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **J Physiol Pharmacol**, v.53, p.39–50, 2002.
- LA VECHIA & TAVANI, A. A review of epidemiological studies on cancer in relation to the use of anti-ulcer drugs. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 11, n. 2, p. 117-123, 2002.
- LAINE, L. & WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis”: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, p. 1254–1262, 1988.
- LANAS, A.; SERRANO, P.; BAJADOR, E.; ESTEVA, F.; BENITO, R.; SAINZ, R. Evidence of aspirin use in both upper and lower gastrointestinal perforation. **Gastroenterology**, v.112, p.683-689, 1997.
- LAUDANNO, O.M.; CESOLARI, J.A.; ESNARRIAGA, J.; RISTA, L.; PIOMBO, G.; MAGLIONE, C. Gastrointestinal damage induced by celecoxib and refecoxib in rats. **Dig Dis Sci**, v.46, n.4, p.779–84, 2001.
- LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.
- LUNDGREN, O. Enteric nerves and diarrhoea. **Pharmacology & Toxicology**, v. 90, p. 109–120, 2002.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer--recent mechanistic update. **Mol Cell Biochem**, v. 253, n. 1-2, p. 329-338, 2003.
- MANTHEY, J.A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. **Microcircul.**, v. 7, p. S29–34, 2000.
- MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K.; GUTHRIE, N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr Med Chem**, v. 8, p. 135–153, 2001.

- MARONI, B.C.; DI STASI, L.C.; MACHADO, S.R. Plantas medicinais do cerrado de Botucatu – guia ilustrado. São Paulo: **Editora UNESP**, 2006.
- MARTELLI, A.; MATTIOLI, F.; MERETO, E.; BRAMBILLA, C.G.; SINI, D.; BERGAMASCHI, G.; BRAMBILLA, G. Evaluation of omeprazole genotoxicity in a battery of in vitro and in vivo assays. **Toxicology**, v. 130, n. 1, p. 29-41, 1998.
- MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Gastroprotection Of Escins Ia, Ib, Iia, And Iib On Ethanol-Induced Gastric Mucosal Lesions In Rats. **Eur. J. Pharmacol**, v. 373, p. 63 – 70, 1999.
- MEISTER, A. & ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** v. 52, p. 711,1983.
- MENEZES, A.M.; RAO, V.S. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p. 531–533, 1988.
- MENEZES, A.M.S.; RAO, V.S.N.; FONTELES, M.C. 1986. Antiulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, v.57, p. 253–256, 1986.
- MINCIS, M.; CHEBLI, J.M.; KHOURI, S.T.; MINCIS, R. Ethanol and the gastrointestinal tract. **Arq Gastroenterol**, v. 32, n. 3, p. 131-139, 1995.
- MIURA, T.; MURAOKA, S.; FUJIMOTO, Y. Lipid peroxidation induced by indomethacin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: involvement of indomethacin radicals. **Biochem Pharmacol**, v. 63, p. 2069-2074, 2002.
- MIZUI, T.; SATO, H.; HIROSE, F.; DOTEUCHI, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life Sci**, v. 41, n. 6, p. 755-763, 1987.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; HARA, H.; SUKAMOTO, T. Effects of KB-5492, a new anti-ulcer agent with a selective affinity for the sigma-receptor, on aspirin-induced disruption of the rat gastric mucosal barrier. **Jpn J Pharmacol**, v. 64, n. 1, p. 49-55, 1994.
- MUKHERJEE, P.K.; SCHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S.C.; PAL, M., SCHA; B.P. Screening of antidiarrhoeal profiles of some plant extracts of specific region of West Bengal, India. **J of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 85–9, 1998.
- NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; YOSHIDA, N.; KONDO, M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. **Dig Dis Sci**, v. 43, suppl. 9, p. 305–345, 1998.

- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, p. 853-859, 1999.
- NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J. M. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. **Free Rad Biol Med**, v. 26, p. 410-418, 1999.
- NIKI, E.; YOSHIDA Y.; SAITO Y.; NOGUCHI N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, p. 668-676, 2005.
- OBERLEY, T.D.; OBERLEY, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histol Histopathol**, v.12, n. 2, p. 525-535, 1997.
- ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 30, p. 1426-1434, 2007.
- OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.
- PASTORIS, O.; VERRI, M.; BOSCHI, F.; KASTIUCHENKA, O.; BALESTRA, B.; PACE, F. Effects of esomeprazole on glutathione levels and mitochondrial oxidative phosphorylation in the gastric mucosa of rats treated with indomethacin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 378, p. 421-429, 2008.
- PERIANAYAGAM, J.B.; SHARMA, S.A.; PILLAI, K.K. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extracts in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 410-414, 2006.
- PESKAR, B.M.; MARICIC, N.; GRETZERA, B.; SCHULIGOI, R.; SCHMASSMANN, A. Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense. **Life Sci**, v. 69, n. 25-26, p. 2993-3003, 2001.
- POST, P.N.; KNIPERS, B.J.; MEIJER, G.A. Declining incidence of peptic ulcer but not of its complications: a nation-wide study in the Netherlands. **Aliment Pharmacol Ther**, v.23, p.1587-1593, 2006.

- POWELL, D. W. Approach to the patient with diarrhea. In: Yamada T., Alpers D. H., Owyang C., Powell D. W., Silverstein F. E., eds. **Textbook of Gastroenterology**. Philadelphia: JB Lippincott, 2ª ed., p.318-831, 1995.
- RAGHUNATH, A. S.; O'MORAIN, C.; M'CLOUGHLIN, R. C. Review article: the long-term use of proton-pump inhibitors. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 22, suppl 1, p. 55-63, 2005.
- RAINSFORD, K.D. Gastric ulcerogenicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice with mucosa sensitized by cholinomimetic treatment. **J. Pharm**, v. 39, p. 669-672, 1987 – com modificações.
- RAO, V.S.N.; MENEZES, A.M.S.; VASCONCELOS, F.A.; ALMEIDA, F.R.C.; FONTELES, M.C. Effects of *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) in experimental colitis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.19, p.568, 1986.
- RAO, V.S.; VIANA, G.S.; MENEZES, A.M.; GADELHA, M.G. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. Aqueous extract. **Braz J Med Biol Res.**, v. 20(6), p.803-5. 1987
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.I.; KLEPPRE, M.S. Enteropooling assay: a test for diarrhoeal produced by prostaglandins. **Prostaglandins**, v.11, p. 809–814, 1976.
- ROBERTSON, R.P. Dominance of cyclooxygenase-2 in the regulation of pancreatic islet prostaglandin synthesis. **Diabetes**, v.47, p.1379–83, 1998
- SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 325–329, 2004.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. º (Org.) et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª Ed. rev. Ampl. Porto Alegre/Florianópolis: **Editora da UFRGS/Editora da UFSC**, 2003, cap. 15, p.371-400.
- SHAY, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterol**, v. 5, p. 43-61, 1945.

- SHICHIJO, K.; IHARA, M.; MATSUU, M.; ITO, M.; OKUMURA, Y.; SEKINE, I. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. **Dig Dis Sci**, v. 48, p. 340–48, 2003.
- SHIGETA, J.I.; TAKAHASHI, S.; OKABE, S. Role of cyclooxygenase-2 in the healing of gastric ulcers in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.286, p.1384– 1390, 1998.
- SMALLEY, W.E.; RAY, W.A.; DAUGHERTY, J.R.; GRIFFIN, M.R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of hospitalizations for peptic ulcer disease in elderly persons. **Am J Epidemiol**, v. 141, n. 6, p. 539-545, 1995.
- TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K.; HIRONAKA, Y.; FUJIOKA, Y.; MATSUMOTO, J.; OKABE, S. Oxygen free radical and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. **Digestion**, v. 49, p. 175-184, 1991.
- TANAKA, S.; GUTH, P.H.; PAULSEN, G.; KAUNITZ, J.D. Gastroprotective effect of ranitidine bismuth citrate is associated with increased mucus bismuth concentration in rats. **Gut**, v. 39, p. 164–171, 1996.
- TAYLOR, D.N.; BLASER, M.J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Epidemiol Rev**, v. 13, p. 42-59, 1991.
- UEKI, S., TAKEUCHI, K., OKABE, S. Gastric motility is an important factor in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. **Dig Dis Sci**, v. 33, p. 209–216, 1988.
- UNIVERSITY OF MICHIGAN HEALTH SYSTEM. Peptic ulcer disease. Acessado em 05 de Agosto de 2008, em: <http://www.cme.med.umich.edu/PDF/GUIDELINE/pud05.pdf>
- VIANA, G.S.B.; MATOS, F.J.A.; BANDEIRA, M.A.M.; RAO, V.S.N. Aroeira-do-Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): Estudo Botânico, Farmacognóstico, Químico e Farmacológico, Fortaleza, Brasil, EUFC, 1995.
- VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.M.; MOURA, L.C.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; MATOS, F.J.A.; RIBEIRO, R.A. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytother Res**. v.11, p. 118-122, 1997.
- VICTORA, C.G.; BRYCE, J.; FONTAINE, O.; MONASCH, R. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, p.1246-1255, 2000.

- VINEGAR, R.; VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed Proc.**, v. 46, p. 118-126, 1987.
- WALLACE, J.L.; BAK, A.; MCKNIGHT, W. Contribution of cyclooxygenase-1 to inflammatory responses in rats and mice: implications for GI toxicity. **Gastroenterology** v.115, p.101– 109, 1998a.
- WALLACE, J.L.; REUTER, B.K.; MCKNIGHT, W. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: are they really effective, selective, and GI-safe? **J.Clin. Gastroenterol.**, v.27, S28– S34, 1998b.
- WALLACE, J.L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 15, n. 5, p. 691-703, 2001.
- WALLACE, J.L. & GRANGER, D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J**, v. 10, n. 7, p. 731-740, 1996.
- WARRER, T.D., GIULIANO, F., VOJNOVIC, I. Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7563– 7568, 1999. In: Berenguer, B. et al., Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 442, p.125– 135, 2002.
- WHO. The treatment of diarrhea: a manual for physicians and other senior health workers. **World Health Organization**, 1995.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-547, 1962.
- WOLFE, M.M. & SACHS, G. Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal disease and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterology**, v. 118, n.2, p. S9–S31, 2000.
- WOLLHEIM, F.A. Selective Cox-2 inhibition in man-therapeutic breakthrough or cosmetic advance? **Rheumatology**, v.39, p.935–938, 2000.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol summary. **WHO**, 2001. Acessado em 30 de junho de 2009, em:
http://www.who.int/substance_abuse/publications/en/globalstatussummary.pdf
- WRIGHT, J.M. The double-edge sword of COX-2 selective NSAIDs. **Can Med Assoc J** , v.167, p.1131–1137, 2002.
- YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; KISHI, A.; TOMII, T.; KANEK, T.; IINVMA, S.; ICHIKAWA, H.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, S.; KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, v. 34, p. 732-737, 1993.
- YUNES, A.R.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna – Chapecó, SC: **Editora Universitária UNOESC**, 2001.
- ZIMMERMANN, K.C., SARBIA, M., SCHROR, K., WEBER, A.A. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit mucosa. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 54, p.536–40, 1998.