



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIULCEROGÊNICO E ANTIBACTERIANO DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.)

CICERA NORMA FERNANDES

CRATO – CE

2012

CICERA NORMA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIULCEROGÊNICO E ANTIBACTERIANO DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Regina Kerntopf

Co-Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

CRATO - CE

2012

F363a Fernandes, Cicera Norma.

Avaliação dos efeitos antiulcerogênico e antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) [manuscrito] / por Cicera Norma Fernandes. – 2012.

116 f.: il.; 29 cm.

Cópia de computador (printout).

Trabalho de Conclusão de Curso (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri – URCA.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf.

Coorientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

1. *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.). 2. Efeito antiulcerogênico. 3. Mecanismo de ação. 4. Atividade antibacteriana. I. Título.

CDD: 581.636

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de Concentração em Bioprospecção de Produtos Naturais, outorgado pela Universidade Regional do Cariri, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Cicera Norma Fernandes

Dissertação aprovada em: 24/02/2012

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf – Orientadora
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes – Co-orientador
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe – Avaliador Externo
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa – Avaliador Interno Suplente
Universidade Regional do Cariri – URCA

*Dedico ao meu esposo **Deivyd Lima**, por sempre está ao meu lado,
me apoiando e dando força a continuar sempre.
Sem o seu carinho e compreensão eu jamais
teria chegado até aqui!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha rocha de refúgio, pelo dom da vida, cuidado e por todas as bênçãos concedidas. Obrigada Senhor por guiar meus passos sustentando-me nas horas de cansaço e desânimo.

Ao meu pai, Francisco Pereira Lima e às minhas mães, Maria Nilza Fernandes de Moura e Valdecí Fernandes, pelo amor e dedicação durante todos esses anos, por não medirem esforços na minha educação, me ajudando a concretizar cada um dos meus sonhos pequenos ou grandes, acessíveis ou quase impossíveis. Aos meus irmãos, Frank, Franklim, Frankson, Diane e Bruna, pela amizade, força e incentivo. Vocês são meus exemplos!

Ao meu esposo amado, Deivyd Lima, pelo seu companheirismo, dedicação e amor incondicional. Nessa importante etapa da minha vida, seu incentivo foi imprescindível. Louvo a Deus por ter me dado você!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf, pela amizade, ensinamentos, conselhos e principalmente pela orientação e confiança mais uma vez depositada em mim e no meu trabalho, tendo em vista que me orienta desde o estágio voluntário, passando pela iniciação científica e agora no mestrado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pelo apoio e sugestões que foram de grande contribuição a este trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), em especial, Heloísa Helena (minha irmã siamesa), Mariana Késsia, Msc. Rogério Saraiva, Anita Oliveira, Ana Luiza Siebra, Andreza Guedes, Luiz Jardelino, Kelly Rodrigues, Daniele Oliveira, Laura Hévila e Renata Sampaio, pela amizade e disponibilidade em ajudar nos experimentos. Agradeço também por compartilhar os momentos de descontração.

À minha querida amiga, Gerlânia Leite, que desde a época de iniciação científica sempre demonstrou disposição para me ajudar no que precisasse. Obrigado mais uma vez pela força, apoio, conselhos e amizade. Você é muito especial para mim!

Às minhas amigas de graduação, Luciene Lima e Tânia Valero, que apesar da distância, sempre me dão força e torcem por mim.

A todos os amados irmãos em Cristo da Igreja Batista da Paz, pelas orações e apoio. Que Deus abençoe a cada um.

A Msc. Germana Rocha, pessoa fundamental na realização do modelo de úlcera crônica, obrigado pela disponibilidade, auxílio e paciência.

Aos bolsistas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) e Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), coordenado respectivamente pelos professores Dr. José Galberto Martins da Costa e Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, pela disponibilidade e auxílio na realização dos testes fitoquímicos e microbiológicos.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Arlene Pessoa, pela catalogação da exsicata e identificação botânica.

À minha turma do mestrado, Heloísa Helena, Mariana Késsia, Samara Alves, Helenicy Veras, Flaviana Moraes, Morgana Delfino, Renata Dias e Teógenes Matias, por terem compartilhado tantos momentos bons e bem descontraídos.

Aos Coordenadores e Professores do Programa em Bioprospecção Molecular, pelos ensinamentos, dedicação e incentivos transmitidos e as secretárias Anderciele Rolim e Lenira Pereira pelos auxílios prestados no decorrer do curso.

Aos professores, Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e Dr. José Galberto Martins da Costa, por aceitarem o convite em participar da banca examinadora.

A Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (FMJ), pelo fornecimento dos animais.

A CAPES, CNPq e FUNCAP, pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho...

meus sinceros agradecimentos!

*Prepara-se o cavalo para o dia da batalha,
porém do SENHOR vem à vitória.*

Provérbios 21:31

RESUMO

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) pertence a família Annonaceae e é conhecida popularmente como araticum-do-campo, araticum-do-cerrado, araticum-bravo, ata-brava e ata de lobo. Na medicina popular é utilizada principalmente para combater reumatismo, cólicas renais, dores na coluna e distúrbios gastrointestinais como diarreia e dores no estômago. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) em modelos de lesão gástrica aguda (induzida por etanol_{abs}, indometacina e etanol acidificado) e crônico (induzida por ácido acético 30%), bem como investigar o envolvimento do óxido nítrico (NO), dos canais de K⁺-ATP-dependentes (K⁺_{ATP}), das prostaglandinas (PG's), dos receptores noradrenérgicos α_2 e receptores H₂ no mecanismo de ação gastroprotetor, seu efeito sobre a motilidade intestinal, e sua atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos. A caracterização dos metabólitos secundários foi realizada através de prospecção fitoquímica, sendo verificada a presença de taninos, flavonóides e alcalóides. O EEDF inibiu significativamente as lesões gástricas nos três modelos clássicos de úlcera aguda, sendo que no modelo de úlcera por etanol_{abs}, o extrato apresentou efeito dose-dependente. O estudo do mecanismo antiulcerogênico demonstrou o envolvimento do óxido nítrico e dos receptores noradrenérgicos α_2 . O EEDF não alterou a motilidade intestinal em camundongos. No modelo de úlcera crônica, o EEDF inibiu de maneira significativa o aparecimento de úlceras gástricas durante os 14 dias de tratamento, não apresentando diferença estatística significativa entre os grupos tratados em relação aos parâmetros avaliados de evolução de massa corpórea e consumos de ração e água. A avaliação da atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição, no qual o EEDF e frações apresentaram CIM \geq 1024 μ g/mL. Quando combinados aos aminoglicosídeos demonstraram efeito sinérgico frente às bactérias multirresistentes *Escherichia coli* (27) e *Staphylococcus aureus* (358). Os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências para uma futura utilização terapêutica de *Duguetia furfuracea* como ferramenta medicamentosa.

Palavras-chave: *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.). Efeito antiulcerogênico. Mecanismo de ação. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) belongs to Annonaceae family and is popularly known as araticum-do-campo, araticum-do-cerrado, araticum-bravo, ata-brava and ata de lobo. In folk medicine is mainly used to combat rheumatism, renal colic, back pain and gastrointestinal disturbances such as diarrhea and stomach pains. The present study aimed to evaluate the antiulcerogenic activity of ethanol extract of the leaves *Duguetia furfuracea* (EEDF) in models of acute gastric lesions (induced by absolute ethanol, indomethacin and acidified ethanol) and chronic (30% acetic acid induced) and investigate the involvement of nitric oxide (NO), K⁺ channel-ATP-dependent (K⁺ ATP), prostaglandins (PG's), α_2 .noradrenergic and H₂ receptors in the mechanism of action gastroprotective, their effect on intestinal motility, and its antibacterial activity and modulating antibiotics. The characterization of secondary metabolites was performed by phytochemical screening, and we found the presence of tannins, flavonoids and alkaloids. The EEDF significantly inhibited gastric lesions in the three classical models of acute ulcer, and in absolute ethanol ulcer model, the extract showed a dose-dependent. The study of the mechanism antiulcerogenic demonstrated the involvement of nitric oxide and α_2 .noradrenergic receptors. EEDF did not alter intestinal motility in mice. In chronic ulcer model, the EEDF significantly inhibited the development of gastric ulcers during the 14 days of treatment, showing no statistically significant difference between treatment groups with respect to the parameters evaluated in the evolution of body mass and feed and water. Evaluation of the antibacterial activity was determined by the microdilution method, in which the EEDF and fractions showed MIC \geq 1024 mg/mL. When combined with aminoglycosides demonstrated synergistic effect against multiresistant bacteria *Escherichia coli* (27) and *Staphylococcus aureus* (358). Results of this study provide evidence for future therapeutic use of *Duguetia furfuracea* as therapeutic tool.

Keywords: *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.). Antiulcerogenic effect. Mechanism of action. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da acetogenina uvaricina.	26
Figura 2 – Espécie <i>Duguetia furfuracea</i> (A. St.-Hil.).	29
Figura 3 – Partes aéreas de <i>Duguetia furfuracea</i> : (1) flor e (2) fruto.	29
Figura 4 – Anatomia do estômago: secção longitudinal, face ventral.	31
Figura 5 – Diagrama esquemático co controle fisiológico da secreção ácida pelas células parietais.	33
Figura 6 – Metodologia de obtenção do extrato bruto etanólico e frações das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> .	46
Figura 7 – Placa de microtitulação ilustrativa indicando a CIM após a adição da resazurina.	56
Figura 8 – Efeito do EEDF sobre as lesões gástricas induzidas por etanol _{abs} em camundongos.	61
Figura 9 – Efeito do EEDF sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos.	63
Figura 10 – Efeito do EEDF sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.	65
Figura 11 – Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	67
Figura 12 – Envolvimento dos canais de K ⁺ -ATP-dependentes (K ⁺ _{ATP}) no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	69
Figura 13 – Envolvimento das prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	71
Figura 14 – Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	73
Figura 15 – Envolvimento dos receptores H ₂ no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.	75
Figura 16 – Efeito do EEDF sobre a motilidade intestinal em camundongos.	77
Figura 17 – Efeito do EEDF em lesões gástricas induzidas por ácido acético 30%.	79

Figura 18 – Representação da evolução de massa corpórea dos animais tratados durante o período de 14 dias.	79
Figura 19 – Representação do consumo de ração dos animais tratados durante o período de 14 dias.	80
Figura 20 – Representação do consumo de água dos animais tratados durante o período de 14 dias.	80
Figura 21 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol _{abs} .	112
Figura 22 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por indometacina.	112
Figura 23 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado.	112
Figura 24 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento do óxido nítrico (NO).	113
Figura 25 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento dos canais de K ⁺ -ATP-dependentes (K ⁺ _{ATP}).	113
Figura 26 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento das prostaglandinas.	114
Figura 27 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2	114
Figura 28 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores H ₂ .	115
Figura 29 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por ácido acético 30%.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.	42
Tabela 2 – Origem bacteriana e perfil da resistência a antibióticos.	44
Tabela 3 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol _{abs} .	47
Tabela 4 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por indometacina.	48
Tabela 5 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol acidificado.	49
Tabela 6 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.	50
Tabela 7 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento dos canais de K ⁺ -ATP-dependentes (K ⁺ _{ATP}) na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.	50
Tabela 8 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento das prostaglandinas na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.	51
Tabela 9 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.	52
Tabela 10 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento dos receptores H ₂ na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.	53
Tabela 11 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da motilidade intestinal em camundongos.	53
Tabela 12 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por ácido acético 30%.	54
Tabela 13 – Classes de metabólitos secundários encontradas no extrato bruto das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> .	59
Tabela 14 – Atividade moduladora de <i>Duguetia furfuracea</i> frente à bactéria <i>E. coli</i> (27) com: extrato bruto etanólico, fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica.	83

Tabela 15 – Atividade moduladora de <i>Duguetia furfuracea</i> frente à bactéria <i>S. aureus</i> (358) com: extrato bruto etanólico, fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica.	83
Tabela 16 – Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.	108
Tabela 17 – Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (AINE).	108
Tabela 18 – Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado.	108
Tabela 19 – Envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.	109
Tabela 20 – Envolvimento dos canais de K ⁺ -ATP-dependentes (K ⁺ _{ATP}) no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.	109
Tabela 21 – Envolvimento das prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.	110
Tabela 22 – Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.	110
Tabela 23 – Envolvimento dos receptores H ₂ efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.	111
Tabela 24 – Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre a motilidade intestinal.	111
Tabela 25 – Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia furfuracea</i> (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético.	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

± Mais ou menos

% Percentagem

°C Grau Celsius

< Menor que

® Marca registrada

α Alfa

abs – Absoluto

AA – Ácido araquidônico

ACh – Acetilcolina

ACG's – Acetogeninas

AINE's – Antiinflamatórios não-esteróides

ANOVA – Análise de variância

AMPC – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica

ATP – Trifosfato de adenosina

β – Beta

BHI – *Brain Heart Infusion*

CAT – Catalase

CE – Estado do Ceará (Brasil)

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CIM – Concentração inibitória mínima

CIM/8 – Concentração subinibitória

cm – Centímetros

COX – Cicloxigenase

COX-1 – Cicloxigenase do tipo 1

COX-2 – Cicloxigenase do tipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DZO – Diazóxido

ECL – Células enterocromafins

EEDF – Extrato etanólico de *Duguetia furfuracea*

eNOS ou NOS-3 – Óxido nítrico sintetase endotelial

E.P.M. – Erro padrão da média

et al. – e colaboradores (latim)

EUA – Estados Unidos da América

FMJ – Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte

γ – Gama

g – Grama(s)

GC's – Guanilil ciclase solúvel

GMPc – Adenosina 3'-5'-monofosfato cíclica

GSH – Glutationa reduzida

GPx – Glutationa peroxidase

GSSH – Glutationa oxidada

GTP – Guanosina trifosfato

h – Hora(s)

H₂ – Receptor tipo 2 da histamina

H₃ – Receptor tipo 3 da histamina

HCDAL – Herbário Cariense Dárdano de Andrade-Lima

HCl – Ácido Clorídrico

HIA – *Heart Infusion Agar*

iNOS ou NOS-2 – Óxido nítrico sintetase induzível

i.p. – Via intraperitoneal

K_{ATP} – Canais de Potássio ATP-dependentes

Kg – quilograma(s)

L – Litro

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina metilester

LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais

LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular

M – Concentração molar

m – Metro

mg – Miligrama

min. – Minuto(s)

mL – Mililitro

n – Número da amostra

nNOS ou NOS-1 – Óxido nítrico neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – Nível de significância

PG's – Prostaglandinas

ROS – Espécies reativas de oxigênio

s.c – Via subcutânea

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TGI – Trato gastrointestinal

μg – Micrograma

μL – Microlitro

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UNIFOR – Universidade de Fortaleza

URCA – Universidade Regional do Cariri

v.o. – Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. REFERENCIAL TEÓRICO	25
3.1 Informação botânica	25
3.1.1 <i>Família Annonaceae</i>	25
3.1.2 <i>Gênero Duguetia</i>	26
3.1.3 <i>Espécie Duguetia furfuracea</i>	27
3.2 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal	30
3.2.1 <i>Secreção ácida gástrica</i>	32
3.2.2 <i>Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica</i>	34
3.3 Úlcera péptica	37
3.4 Produtos naturais e a atividade antiulcerogênica	38
3.5 Atividade antibacteriana e resistência à aminoglicosídeos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Materiais utilizados	42
4.1.1 <i>Drogas, reagente e soluções</i>	42
4.1.2 <i>Material permanente e equipamentos utilizados</i>	43
4.1.3 <i>Animais</i>	43
4.1.4 <i>Microrganismos para teste da atividade antibacteriana</i>	44
4.1.5 <i>Material vegetal</i>	45
4.2 Metodologias	45
4.2.1 <i>Obtenção do extrato bruto etanólico e fracionamento</i>	45
4.2.2 <i>Prospecção fitoquímica</i>	45
4.2.3 <i>Avaliação da atividade antiulcerogênica do EEDF</i>	47
4.2.3.1 <i>Lesão gástrica induzida por etanol</i>	47
4.2.3.2 <i>Lesão gástrica induzida por indometacina</i>	47
4.2.3.3 <i>Lesão gástrica induzida por etanol acidificado</i>	48
4.2.4 <i>Estudo do mecanismo de ação antiulcerogênico</i>	49
4.2.4.1 <i>Envolvimento do óxido nítrico</i>	49
4.2.4.2 <i>Envolvimento dos canais de K⁺-ATP-dependentes (K⁺_{ATP})</i>	50
4.2.4.3 <i>Envolvimento das prostaglandinas</i>	51
4.2.4.4 <i>Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2</i>	51
4.2.4.5 <i>Envolvimento dos receptores H₂</i>	52
4.2.4.6 <i>Avaliação da motilidade intestinal</i>	53
4.2.5 <i>Lesão gástrica induzida por ácido acético</i>	54
4.3 Atividade antibacteriana	55
4.3.1 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	55
4.3.2 <i>Avaliação da atividade moduladora</i>	56
4.4 Análises estatísticas	57

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Prospecção fitoquímica	59
5.2 Atividade antiulcerogênica do EEDF	60
5.2.1 <i>Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzida por etanol</i>	60
5.2.2 <i>Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzida por indometacina</i>	62
5.2.3 <i>Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzida por etanol acidificado</i>	64
5.2.4 <i>Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico do EEDF</i>	66
5.2.5 <i>Envolvimento dos canais de K^+-ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no efeito antiulcerogênico do EEDF</i>	68
5.2.6 <i>Envolvimento das prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do EEDF</i>	70
5.2.7 <i>Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF</i>	72
5.2.8 <i>Envolvimento dos receptores H_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF</i>	74
5.2.9 <i>Avaliação do EEDF sobre a motilidade intestinal</i>	76
5.2.10 <i>Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético</i>	78
5.3 Atividade antibacteriana	82
5.3.1 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	82
5.3.2 <i>Avaliação da atividade moduladora</i>	82
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	105
APÊNDICE	108

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é tão antiga quanto à existência do próprio homem (MARTINS *et al.*, 2000). O conhecimento sobre estas plantas simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, sendo ainda hoje, comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais, desde regiões mais pobres do país até as grandes cidades brasileiras (MACIEL, PINTO e VEIGA Jr, 2002).

O uso de plantas e extratos vegetais no tratamento de algumas doenças é um hábito bastante difundido no Brasil (JORGE *et al.*, 2004). Dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial utilizam plantas na medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (MACIEL, PINTO e VEIGA Jr, 2002). Estudos realizados com produtos naturais revelam que, apesar do crescente aumento de pesquisas nessa área, apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (MATU e VAN STADEN, 2003).

Há no mundo cerca de 250.000 a 300.000 espécies de plantas, sendo o Brasil detentor de cerca de 20% da flora mundial (CALIXTO, 2005). No entanto, esses recursos naturais não têm sido bem aproveitados para a produção de fitoterápicos, fato esse relacionado à falta de investimentos nos diferentes segmentos da cadeia produtiva de plantas medicinais, sendo essas responsáveis pelo avanço nas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos (CALIXTO, 2001; CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2004).

Nesse contexto, há um grande interesse científico pelo desenvolvimento das pesquisas de plantas utilizadas na medicina popular, envolvendo várias áreas, como a botânica, a farmacologia e a fitoquímica. O conhecimento existente nas comunidades tradicionais sobre as propriedades terapêuticas das plantas encontradas em seu ambiente natural pode vir a ser uma poderosa ferramenta na descoberta de novos medicamentos (CORRÊA *et al.*, 2002; ALMEIDA, 2004; MACIEL *et al.*, 2002).

Atualmente, estudos de plantas medicinais que apresentam alguma ação sobre o trato gastrointestinal assumem grande importância em nossa sociedade, visto que os

medicamentos hoje disponíveis para o tratamento desses distúrbios apresentam alguns efeitos colaterais, como, por exemplo, constipação, diarreia e gastrinemia (POTRICH, 2009). Devido à ausência de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos indesejáveis, torna-se necessário a procura de novas alternativas contra distúrbios gástricos (LA VECCHIA e TAVANI, 2002; RAGHUNATH *et al.*, 2005; SCHMEDA-HIRSCHAMANN e YESILADA, 2005).

A espécie *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) é um arbusto típico de cerrados secos do Brasil Central (PROENÇA *et al.*, 2000), popularmente conhecida como araticum-do-campo, araticum-do-cerrado, araticum-bravo, ata-brava e ata de lobo (AGRA *et al.*, 2007). Na medicina popular, várias partes da planta são utilizadas como anti-reumática, calmante, cicatrizante de feridas, no tratamento de dores nos rins e coluna (POTT e POTT, 1994), contra pediculose (GAVALINES e BRANDÃO, 1998), problemas menstruais e distúrbios gastrointestinais como diarreia e dores no estômago (LORENZI e MATOS, 2002; GOTTSBERGE, 1987).

Tendo em vista a procura por novas terapias para os distúrbios gastrointestinais que sejam eficazes e estejam associados a menos efeitos indesejáveis, buscou-se investigar as atividades biológicas da espécie vegetal *Duguetia furfuracea*, visto que na literatura a espécie é utilizada para o tratamento de problemas gastrointestinais na medicina popular.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos antiulcerogênico e antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Elaborar o extrato etanólico bruto e realizar fracionamento a partir das folhas de *D. furfuracea*;
- ✓ Realizar a caracterização fitoquímica das folhas da espécie em estudo;
- ✓ Investigar o efeito gastroprotetor do extrato etanólico bruto das folhas de *D. furfuracea* em modelos clássicos de lesões gástricas induzidas por etanol_{abs}, etanol acidificado e indometacina em camundongos;
- ✓ Verificar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pela atividade antiulcerogênica do extrato, analisando o envolvimento do óxido nítrico (NO), dos canais de K⁺-ATP-dependentes (K⁺_{ATP}), das prostaglandinas (PG's), dos receptores noradrenérgicos α_2 e receptores histamínicos (H₂);
- ✓ Avaliar as alterações produzidas pelo extrato etanólico bruto das folhas de *D. furfuracea* sobre a motilidade gastrointestinal;
- ✓ Investigar o efeito cicatrizante do extrato etanólico bruto das folhas de *D. furfuracea* contra lesões crônicas induzidas por ácido acético em ratos, avaliando o ganho de massa corpórea e o consumo de ração e água dos animais;
- ✓ Avaliar o efeito antibacteriano a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico bruto e frações das folhas de *D. furfuracea*;
- ✓ Analisar o extrato etanólico bruto e frações como agentes modificadores da atividade antibiótica de aminoglicosídeos.

REFERENCIAL TEÓRICO

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Informação botânica

3.1.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae possui aproximadamente 135 gêneros e 2.500 espécies de árvores e arbustos tropicais e subtropicais, frutíferas (FECHINE *et al.*, 2002; CHATROU *et al.*, 2004), sendo que no Brasil foram identificados 33 gêneros e 250 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005).

As espécies desta família são caracterizadas por apresentarem folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano, ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos (ALMEIDA *et al.*, 1998) que em algumas espécies são comestíveis, como as espécies do gênero *Annona* (*A. crassiflora*, frutos conhecidos como “araticum”) e do gênero *Xylopia* (*X. aromática*, frutos utilizados como temperos e conhecidos como “pimenta de macaco”) (CORREA, 1978).

Esta família é largamente empregada devido às suas diferentes propriedades farmacológicas atribuídas principalmente as acetogeninas e alcalóides, dois dos principais constituintes bioativos encontradas em gêneros específicos das anonáceas (FAGUNDES *et al.*, 2005), que apresentam ação citotóxica, antitumoral, pesticida, vermífida, abortiva, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Das diversas espécies e gêneros da família Annonaceae têm sido isoladas substâncias conhecidas como acetogeninas (ACG's). Essas substâncias têm despertado grande interesse nos estudos fitoquímicos dessa família (ALMEIDA *et al.*, 1998). Estudos realizados por Jolad *et al.*, (1982), a partir do extrato etanólico das raízes de *Uvaria acuminata*, identificaram pela primeira vez a presença das ACG's, o qual foi isolado a primeira acetogenina, uvaricina (Figura 1). Atualmente, é conhecido que diferentes espécies e gêneros de anonáceas produzem tipos particulares de ACG's (TORMO *et al.*,

Do ponto de vista fitoquímico, este gênero se destaca pelas várias classes de metabólitos encontradas: alcalóides, amidas, diterpenos, esteróides, flavonóides e acetogeninas (PONTES *et al.*, 2004). Um dos primeiros estudos de *Duguetia* sp. identificou a presença de alcalóides aporfínicos e 7-hidroxi-aporfínicos, estando entre estes últimos a duguetina (CASAGRANDE *et al.*, 1970). Diversos alcalóides já foram isolados de várias espécies de *Duguetia* e, pelo estudo fitoquímico biomonitorado de *D. panamensis*, utilizando o ensaio de toxicidade frente o microcrustáceo da espécie *Artemia salina*, foi obtida uma substância ativa o 2,4,5-trimetoxilestireno, porém apresentando baixa toxicidade e fraca atividade antitumoral (SIQUEIRA *et al.*, 2001). Em 1997, o mesmo autor isolou o sesquiterpeno, (+)-10 β ,14-allo-aromadendranodiol, do extrato hexânico das folhas e das cascas do caule da espécie *Duguetia glabriuscula*, que apresentou uma atividade antimicrobiana.

De modo geral, das espécies do gênero *Duguetia* já foram isolados vários alcalóides e vários tipos de estruturas de sesquiterpenos (PEREIRA *et al.*, 2003; FECHINE *et al.*, 2002; MAIA *et al.*, 2006). Desses constituintes, os alcalóides tem se destacado amplamente, exibindo atividades antimalárica, antimicrobiana e citotóxica (MUHAMMAD *et al.*, 2001; TEMPONE *et al.*, 2005).

3.1.3 Espécie *Duguetia furfuracea*

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.), conhecida popularmente como araticum-do-campo, araticum-do-cerrado, araticum-bravo, ata-brava e ata de lobo (AGRA *et al.*, 2007), é um arbusto típico de Cerrados secos do Brasil Central, encontrada em vários estados brasileiros, como Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (PROENÇA *et al.*, 2000).

A espécie se apresenta como arbusto com troncos lenhosos múltiplos, com base subterrânea que o torna resistente ao fogo, formando aglomerados (forma moitas) de 1 a 3 m de altura. Possui ramos finos, folhas simples inteiras, geralmente com galhas (caroços), lanceoladas, pecioladas, alternas, ápice agudo, base atenuada, margens inteiras, coriáceas, de coloração mais pálida na face inferior. As flores são solitárias e axilares, com três sépalas imbricadas e seis pétalas róseas (CORREA, 1978; BONTEMPO, 1994;

BARROSO *et al.*, 1999). Seus frutos possuem coloração alaranjada e são comestíveis, sendo carnosos nos meses de Abril a Julho, Outubro e Novembro e em Fevereiro (CORREA, 1978; MAAS *et al.*, 2001; PROENÇA *et al.*, 2000), sendo toda a planta de um tom bege-dourado pouco comum, tanto folhas quanto flores e frutos (Figuras 2 e 3) (PROENÇA *et al.*, 2000).

Na medicina popular, várias partes da planta são utilizadas: o chá de suas folhas é indicado para combater dismenorréia, metrorragia e diarreia (SANGALLI, 2000; LORENZI e MATOS, 2002) e o infuso como anti-reumáticas (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; CAROLLO *et al.*, 2006). Cascas e raízes combatem o reumatismo (POTT e POTT, 1994), sendo o chá da raiz usado como calmante, anti-reumático, para cólicas renais e dores de coluna. Gottsberge (1987) relata que a raiz é usada contra dores de estômago. O fruto é usado para amolecer feridas (POTT e POTT, 1994) e Silva (1998) comenta que seu fruto pode ser consumido “*in natura*”. As sementes são utilizadas contra pediculose (GAVILANES e BRANDÃO, 1998).

Figura 2 - Espécie *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.).



Figura 3 - Partes aéreas de *Duguetia furfuracea*: (1) flor e (2) fruto.



Fonte: Foto da autora. Localização: área de Cerrado da Chapada do Araripe, Crato – CE. Junho de 2010.

3.2 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal

O sistema digestório é formado basicamente de um tubo muscular com epitélio especializado que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso e ânus. Apresenta ainda órgãos anexos como: fígado, pâncreas e glândulas salivares. O trato gastrointestinal (TGI), juntamente com os órgãos anexos, possui a função de receber, digerir, absorver e eliminar substâncias ingeridas, sendo todos esses processos controlados pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal (MERCHANT, 2007).

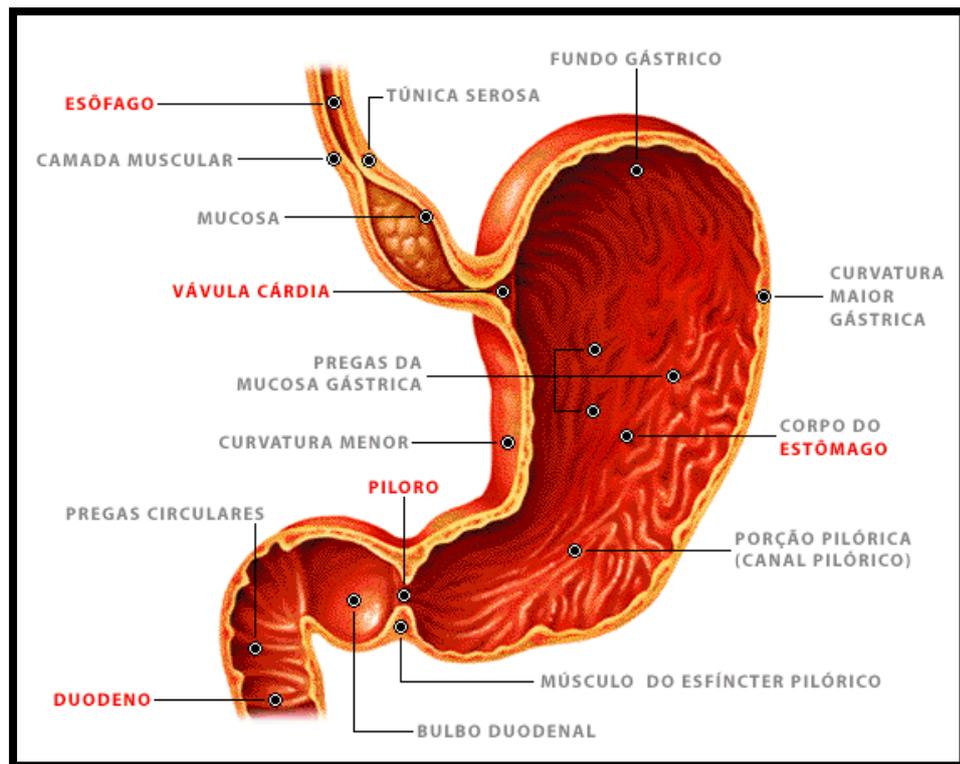
O estômago, órgão em destaque desse estudo, é anatomicamente dividido em cárdia, fundo, corpo, antro e piloro (Figura 4) (STURGES, 2001). O cárdia situa-se na junção do esôfago com o estômago e tem por função permitir a passagem de alimento e de água para o interior do estômago, e de impedir o refluxo gastroesofágico. Tanto o corpo quanto o fundo, são responsáveis pelo armazenamento do alimento e da água, e podem dilatar-se de maneira a acomodar o material alimentar. Além disso, o corpo secreta enzimas digestivas, junto com o ácido clorídrico. O antro é responsável pelo fracionamento mecânico do alimento e o piloro constitui-se em válvula muscular que limita as dimensões das partículas eliminadas até o duodeno e ajuda a evitar o refluxo gastroduodenal (WILLARD, 1995; ARAÚJO e BLAZQUEZ, 2007).

Ao longo de sua parede, o estômago apresenta várias camadas teciduais, compreendendo a serosa, a camada muscular longitudinal, a camada muscular circular, a submucosa e a mucosa. A serosa é a camada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto em uma pequena porção da parte posterior do estômago (região da cárdia). A submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém uma rica rede vascular e um plexo nervoso (plexo submucoso) e a mucosa é a camada da parte interna do estômago que abriga numerosas glândulas gástricas (DANGELO e FANTTINI, 2007).

As glândulas oxínticas e as glândulas pilóricas, ambas localizadas no estômago, atuam secretando diversas substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago. As glândulas oxínticas estão situadas na superfície interna do corpo e fundo, e são constituídas por células mucosas (secretoras de muco), células pépticas (secretoras de pepsinogênio), células parietais (secretoras de ácido clorídrico - HCl), células D (secretoras de somatostatina) e células enterocromoafins (ECL)

(secretoras de histamina). Já as glândulas pilóricas encontram-se localizadas na porção antral do estômago e possuem os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, exceto pela ausência das células pépticas, e inclusão das células G (produtoras de gastrina) (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Figura 4 - Anatomia do estômago: secção longitudinal, face ventral.



Fonte: Enciclopédia multimídia do corpo humano, 2000

Todas as estruturas gástricas citadas anteriormente são responsáveis por desempenhar funções específicas que promovem a manutenção da homeostasia do órgão, como a secreção de HCl, pepsinogênio, bicarbonato e prostaglandinas (PG's). Entretanto, outras substâncias também estão relacionadas com a manutenção da integridade gástrica, como o óxido nítrico (NO) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT e glutatona peroxidase - GPx) e glutatona reduzida (GHS) (POTRICH, 2009).

3.2.1 *Secreção ácida gástrica*

De acordo com Horn (2000), a regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, que envolve muitos tipos celulares, hormônios e mediadores, os quais convergem para a etapa final da secreção que é a atividade da H^+ , K^+ ATPase (Figura 5).

O ácido gástrico é o produto no final desta cadeia, e é responsável pela digestão de proteínas, absorção de ferro, cálcio e vitamina B_{12} , além de prevenir o crescimento bacteriano no estômago e a infecção entérica. Entretanto, quando os níveis de ácido e pepsina se sobrepõem aos mecanismos de defesa da mucosa, há a formação de úlceras gástricas. Para prevenir estas lesões, a secreção ácida gástrica pode ser precisamente regulada. Esta envolve vias aferentes e eferentes do sistema nervoso central e entérico, assim como a atuação de células neuroendócrinas e imunes pelas vias autócrina, parácrina, e hormonal (SCHUBERT, 2004).

Para que ocorra a regulação da secreção ácida gástrica, as células parietais são reguladas por três mecanismos: neurais, com envolvimento principalmente de acetilcolina (ACh) e do peptídeo liberador de gastrina (GRP); hormonais, pela ação da gastrina; e de forma parácrina devido à proximidade das células Enterocromafinssímiles (ECL) que liberam histamina (SCHUBERT e PEURA, 2008; MCQUAID, 2005).

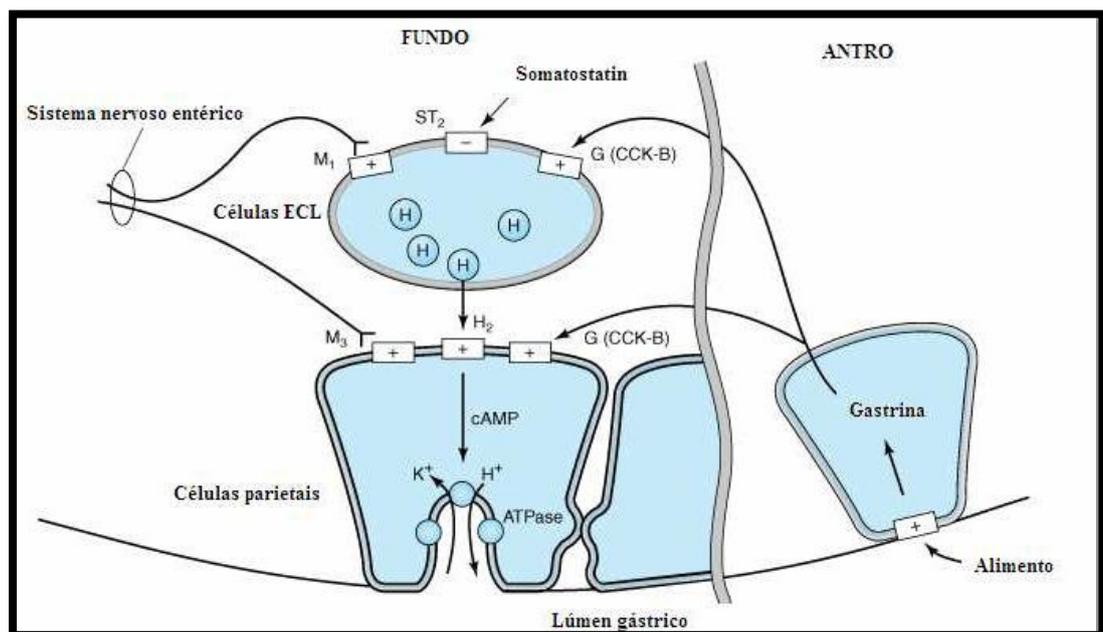
As células parietais são reguladas por esses três mecanismos de forma integrada, sendo estas células constituídas por receptores de membrana para histamina, ACh e colecistocinina-B (CCK-B) (SCHUBERT e PEURA, 2008).

No sistema nervoso central (SNC) o controle da secreção ácida é mediado principalmente pela ação da ACh, a qual age diretamente nas células parietais estimulando o aumento de cálcio intracelular através da enzima fosfolipase C. Esse aumento de cálcio intracelular leva a ativação de proteína cinases que estimulam a secreção de ácido pela H^+/K^+ -ATPase, cuja ação é mediada por receptores colinérgicos M_3 (MCQUAID, 2005). De forma indireta, a ACh se liga a receptores M_1 que potencializam a secreção de histamina nas células ECL, além de diminuir a secreção de somatoestatina, o principal inibidor da secreção ácida (SCHUBERT e SHAMBUREK, 1990).

A gastrina, principal estimulante da secreção ácida durante a ingestão de alimentos, é produzida nas células G do antro gástrico e, em menores quantidades e de forma variável, na parte proximal do intestino delgado, cólon e pâncreas. Ela se liga aos receptores CCK-B nas células parietais e ECL e em ambos os casos estão ligados à ativação da fosfolipase C e aumento do cálcio intracelular (DUFRESNE *et al.*, 2006). Embora a gastrina possa interagir diretamente com as células parietais, a atividade secretória deste hormônio está muito mais estabelecida como indutor da produção de histamina nas células ECL. Nestas células a gastrina aumenta a expressão de genes ligados a produção e liberação de histamina (SCHUBERT e PEURA, 2008; DUFRESNE *et al.*, 2006).

A histamina produzida pelas células ECL age sobre os receptores do tipo H_2 , os quais são acoplados a proteína-G e a adenilato ciclase e dessa forma aumentam a concentração intracelular de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). O AMPC por sua vez, ativa proteína cinases que estimulam a secreção de ácido pela H^+/K^+ -ATPase (MCQUAID, 2005).

Figura 5 - Diagrama esquemático do controle fisiológico da secreção ácida pelas células parietais.



Fonte: Adaptado de MCQUAID, 2005.

3.2.2 Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica

O TGI está frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões na mucosa gástrica. Estes estímulos podem ser de origem endógena (HCl, pepsina), de origem exógena (AINE's, etanol, fumo) ou de origem biológica (*Helicobacter pylori*) (ADEYEMI *et al.*, 2005; LAINE *et al.*, 2008). Estes agentes agressores implicam na patogênese da úlcera, incluindo aumento da secreção gástrica, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de produção de prostaglandinas endógenas, inibição da proliferação de células da mucosa e alteração da motilidade gástrica (KONTUREK *et al.*, 1998; KWIECIÉN; BROZOWSKI; KONTUREK, 2002; TULASSAY e HERSZE'NYI, 2010).

Entretanto, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção (pré-epitelial, epitelial e subepitelial), dentre os principais, serão destacadas a barreira muco/bicarbonato, o fluxo sanguíneo, as prostaglandinas, o óxido nítrico e as enzimas antioxidantes (DONG e KAUNITZ, 2006).

- ✓ **Muco/bicarbonato:** considerada a primeira linha de defesa da mucosa gástrica, é formada por um gel de muco, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes, que possui característica elástica, viscosa e aderente (ALQASQUMI *et al.*, 2009). O muco é secretado em todo o TGI desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente entre a mucosa e o lúmen, protegendo esta contra agentes nocivos. Também possui papel importante na cicatrização das úlceras, acelerando a recuperação da mucosa lesada (MAITY *et al.*, 2003). Secretado pelas células epiteliais, o muco, é constituído de 95% de água e 5% de mucina (glicoproteína), sendo esta secreção estimulada por hormônios gastrointestinais, como a gastrina e a secretina, bem como por prostaglandinas E₂ (PGE₂) e agentes colinérgicos (LAINE *et al.*, 2008). O bicarbonato atua na mucosa mantendo uma zona de pH neutro, oferecendo uma barreira protetora contra a difusão do ácido (AOI *et al.*, 2004). Esta secreção pré-epitelial consiste de uma secreção estável junto à camada do gel aderente, criando um gradiente de pH perto da neutralidade das células epiteliais, o qual promove a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e do duodeno contra o ácido secretado no lúmen. As taxas de secreção tanto de muco quanto de bicarbonato

tendem a aumentar, quando o alimento é ingerido (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

- ✓ **Fluxo sanguíneo:** o suprimento de sangue oxigenado para a mucosa gástrica é um fator importante, determinante para a integridade da mesma (MAITY *et al.*, 2003). Todos os mecanismos de defesa e reparo dependem de um suporte eficiente de fluxo sanguíneo. Situações de isquemia, por exemplo, comprometem a proteção da mucosa gastrointestinal e pode levar a proliferação bacteriana e doenças sistêmicas (HOLZER, 2000). As células endoteliais são responsáveis pela geração de potentes vasodilatadores como o NO e PGI₂ (prostaciclina), os quais agem protegendo a mucosa gástrica contra fatores agressores e opondo-se contra a ação danosa de vários agentes vasoconstrictores (Leucotrienos C4, tromboxano A2 e endotelina) (WALLACE, 2001; LAINE *et al.*, 2008).

- ✓ **Prostaglandinas (PG's):** encontradas em praticamente todos os órgãos e tecidos, desempenham uma grande variedade de funções fisiológicas e patológicas. São sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA), através das enzimas ciclooxigenases (COX). A isoforma COX-1 (constitutiva) é responsável pela produção da maior parte de prostaglandinas no estômago normal, já a isoforma COX-2 (induzível), atua na produção de PG's quando ocorrem lesões, constituindo um fator importante na cicatrização das úlceras. A produção contínua de PGE₂ e PGI₂ é de extrema importância para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. As PG's apresentam uma diversidade de funções, onde atuam inibindo a secreção de ácido; estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios; aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa; aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa; inibem a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas no endotélio vascular (LAINE *et al.*, 2008).

- ✓ **Óxido nítrico (NO):** é um gás volátil formado pela oxidação da L-arginina, cuja reação de oxidação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Existem três diferentes isoformas de NOS, sendo duas constitutivamente expressas, a óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS ou NOS-1) e a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS ou NOS-3), e uma induzível, a óxido nítrico sintetase

induzida (iNOS ou NOS-2). Quando gerado, o NO, liga-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GC's), que catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) para guanosina monofosfato cíclico (GMPc), aumentando assim a concentração de GMPc intracelular, que posteriormente poderá ligar-se a domínios específicos de proteínas, incluindo as proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases, desencadeando dessa forma respostas celulares (LANAS, 2008). No TGI, o NO atua na manutenção da homeostase, mantendo a integridade do epitélio gástrico e a barreira de muco, além de ser um potente vasodilatador, auxiliando na regulação do fluxo sanguíneo gástrico (SUGAMOTO *et al.*, 2001; BAYIR *et al.*, 2006).

- ✓ **Enzimas antioxidantes:** o metabolismo celular normal envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Entretanto, a geração excessiva de ROS pode afetar prejudicialmente o funcionamento celular, causando inflamação e morte celular (UZUN *et al.*, 2005). O ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, como por exemplo, a glutathiona reduzida (GSH), que é um tripeptídeo com potente atividade antioxidante e com propriedade de co-fator enzimático, ambos importantes para regulação da atividade celular. Sob condições de estresse oxidativo, as ROS são reduzidas por GSH com concomitante formação de GSSH (ou glutathiona oxidada). Apesar de sua resistência à oxidação espontânea, o GSH reage rapidamente e de forma não enzimática com o radical hidroxila, com o trióxido de nitrogênio (N_2O_3) e o com peroxinitrito. Para manter o equilíbrio redox celular, o GSSH é exportado das células por proteínas de transporte dependentes de ATP, ou seja, em condições severas de estresse ocorre uma diminuição nos níveis celulares de GSH. Esta depleção de GSH está relacionada com a patofisiologia de muitas doenças, entre elas a úlcera péptica, sugerindo um importante papel do GSH na manutenção da integridade dos sistemas fisiológicos (CNUBBEN *et al.*, 2001).

3.3 Úlcera péptica

A úlcera é considerada uma lesão benigna da mucosa gástrica ou duodenal, ocorrendo quando o epitélio gástrico se encontra exposto às secreções gástricas (ácido-péptico) (MAYER, 2007). Ela tem sido, por mais de um século, uma importante causa de morbidade e mortalidade. Nesse contexto, também avalia-se que os gastos com o tratamento desta doença alcancem mais de cinco bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos, além dos custos de medicamentos, não computados neste valor (CHAN e LEUNG, 2002; LU e GRAHAM, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008).

Tanto as úlceras localizadas no estômago quanto as do duodeno são referidas como úlcera pépticas. De modo geral, as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%). Atualmente cerca de 20% das pessoas que moram nas grandes cidades convivem com algum problema no estômago e/ou duodeno. Problemas esses que vão desde a indisposição passageira até a gastrite, úlcera e tumores (BERTGES *et al.*, 2006).

Na úlcera gástrica, a lesão é provocada por uma redução da capacidade protetora da mucosa, diminuindo a secreção de bicarbonato e de muco, além de reduzir a reepitelização, levando assim a mucosa a ficar mais suscetível à permeação do ácido gástrico, sendo lesionada e permitindo, também, a lesão da submucosa. Os mastócitos presentes nesta submucosa, bem como na lâmina própria, desgranulam e liberam a histamina, um dos agentes responsáveis por estimular a secreção de ácido clorídrico e promover a inflamação local. O ácido ainda pode atingir vasos sanguíneos e estimular nervos presentes na parede gástrica, gerando contrações exacerbadas (RODRIGUES *et al.*, 2008).

A reepitelização serve também como mecanismo de defesa na garantia de funcionamento da barreira mucosa. Fatores que reduzem a proliferação celular, como radicais livres, citocinas inflamatórias e estresse fisiológico, acabam por propiciar o desenvolvimento de lesão. Também, o rompimento desta barreira, especialmente por AINE's, facilita a entrada de íons H^+ , aumentando a acidose tecidual, o que contribui para a formação da úlcera (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Diversos são os fatores responsáveis por sua formação e dentre eles pode-se citar o estresse, fumo, nutrição deficiente, álcool, uso contínuo de AINE's e infecção por *Helicobacter pylori* (MATTOS, 2002; LU e GRAHAM, 2006).

Dando destaque às úlceras causadas por *Helicobacter pylori*, estima-se que metade da população esteja infectada, apesar de 80% destes não apresentarem evidências clínicas da doença. Porém, mesmo assim, a bactéria está relacionada à maioria das úlceras duodenais (90-95%) e gástricas (60-70%) (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Geralmente o indivíduo é infectado na infância, entretanto a *H. pylori* permanece latente por um longo período (LU e GRAHAM, 2008).

A bactéria Gram negativa, *H. pylori*, contribui diretamente na lesão das células gástricas através da liberação de citotoxinas vacuolizantes, bem como de enzimas tóxicas, como lipase, urease e protease, propiciando a formação da úlcera (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Além disto, reduz a secreção de bicarbonato pelo duodeno, permitindo uma penetração substancial de íons H^+ e de outros agentes lesivos na mucosa, destruindo as células presentes. Também, parece estimular o reflexo vago-vagal que, somado com o dano direto à mucosa, inibição das células D e estimulação das células G, resulta em uma hipergastrinemia e aumenta a secreção de H^+ , contribuindo para a ulcerogênese (KONTUREK *et al.*, 2004).

3.4 Produtos naturais e a atividade antiulcerogênica

As plantas medicinais, tradicionalmente têm sido utilizadas na medicina popular em todo o mundo para o tratamento de várias doenças, em especial a úlcera gástrica (TOMA *et al.*, 2002).

Diversos produtos naturais têm sido usados para fins terapêuticos de distúrbios gastrointestinais, sendo a primeira droga sistematicamente efetiva contra úlceras gástricas, a carbenoxolona, descoberta através de estudos realizados com a *Glycyrrhiza glabras* (alcaçuz), utilizada comumente pelos indígenas para o tratamento de úlceras gástricas, bronquite, inflamação e espasmos (AKTAR e MUNIR, 1989).

A pesquisa com princípios ativos obtidos a partir de plantas medicinais pode prover a descoberta de novos compostos, úteis para o desenvolvimento de novas drogas, e a preços mais acessíveis para a maioria da população (SILVA *et al.*, 2006). O isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo de organismos vivos assumem importância fundamental para o desenvolvimento científico da química de produtos naturais, como também contribui para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país (CAMPOS, 2008).

3.5 Atividade antibacteriana e resistência à aminoglicosídeos

A utilização de plantas medicinais especialmente na América do Sul contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (NAKAMURA *et al.*, 1999).

O constante uso de antibióticos tem provocado uma série de problemas dentre os quais pode-se destacar o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência microbiana. Esse contexto, faz com que haja uma busca de novos antibióticos que sejam eficazes, abrindo caminhos para a evolução das pesquisas, pois o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência dos microrganismos. A emergência de patógenos resistentes é uma ameaça a esses avanços (MOELLERING Jr, 2000).

O estudo da resistência bacteriana é baseado, geralmente em microrganismos de importância epidemiológica, dentre eles estão *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos etiológicos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (MICHELIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2006). Essa resistência pode dar-se através de vários mecanismos, principalmente: redução da concentração dos antibióticos no interior da célula devido à existência de sistemas de fluxo ativos, alteração do alvo do antibiótico por mutação espontânea e/ou por alteração estrutural ou através de sistemas de inativação enzimática (WALSH, 2000; AZUCENA e MOBASHERY, 2001; WALMSLEY, 2001).

A investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos. Plantas medicinais tem sido alvo de pesquisas em diversos países como o Brasil. Este país é detentor de uma rica biodiversidade e possuidor de uma flora diversificada. Dessa forma, a diversidade de moléculas encontradas em plantas faz das mesmas fontes promissoras de novos agentes antimicrobianos (DI STASI *et al.*, 2002; ESTEVAM *et al.*, 2009).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Drogas, reagentes e soluções

Tabela 1 – Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais.

Droga/Reagente	Origem
Ácido acético P.A.	Fluka, Alemanha
Ácido clorídrico (60%)	Vetec, Brasil
Amicacina	Sigma, EUA
Atropina	Farmace, Brasil
Canamicina	Sigma, EUA
Clonidina	Sigma, EUA
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin [®])	Syntec, Brasil
Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin [®])	Syntec, Brasil
Etanol P.A.	Dinâmica, Brasil
Diazóxido	Sigma, EUA
Gentamicina	Sigma, EUA
Glibenclamida	Sigma, EUA
Histamina	Sigma, EUA
Indometacina (Indocid [®])	Meck Shap e Dhome, Brasil
Ioimbina	Sigma, EUA
L-arginina	Sigma, EUA
Misoprostol (Cytotec [®])	Continental Pharma, Itália
N ^G -nitro-L-arginina-metilester (L-NAME)	Sigma, EUA
Neomicina	Sigma, EUA
Omeprazol	Medley, Brasil
Ranitidina	Geolab, Brasil
Solução fisiológica de NaCl 0,9%	Farmace, Brasil
Tween 80	Sigma, EUA

(Cont.)

Vermelho de fenol

Synth, Brasil

4.1.2 *Material permanente e equipamentos utilizados*

- ✓ Balança analítica de precisão (Metler Toledo AB204)
- ✓ Banho-maria (Modelo 100, Fanem Ltda)
- ✓ Cânulas de gavagem para camundongos e ratos
- ✓ Cronômetros digitais (LivStar)
- ✓ Estufa de secagem e esterilização
- ✓ Fio de sutura
- ✓ Materiais de biossegurança
- ✓ Material cirúrgico
- ✓ Pipetas automáticas (Maxipette)
- ✓ Placas de microtitulação
- ✓ Rotaevaporador (Fisatom)
- ✓ Seringas estéreis (1 mL, 3 mL e 5 mL)
- ✓ Tubos eppendorffs
- ✓ Vidrarias em geral

4.1.3 *Animais*

Para os experimentos farmacológicos foram utilizados duas espécies de roedores: camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade *Swiss*, adultos, de ambos os sexos, com massa corpórea entre 20-30 g e ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus*) albinos, com massa corpórea entre 180-250 g, oriundos do Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e monitorados na Unidade de Contenção de Animais da URCA.

Os animais foram acondicionados em caixas de propileno, a temperatura média de 26 ± 2 °C, com ciclos de claro/escuro de 12/12 h, recebendo ração padrão (Labina, Purina®) e água “*ad libitum*”. No dia que antecedia aos testes, os animais foram submetidos a jejum de sólidos por um período de 18 h antes dos ensaios, sendo apenas mantida a água.

Todos os experimentos com animais obedeceram a protocolos experimentais aprovados, previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA-UNIFOR) com parecer nº 001/2011 (Anexo A).

4.1.4 Microrganismos para teste da atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana do EEDF, foram utilizadas as seguintes linhagens padrão de bactérias provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB): *Escherichia coli* ATCC 10536, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e multirresistentes da espécie *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 2).

Tabela 2 – Origem bacteriana e perfil da resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4362	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-

Ast – Aztreonan; Ax – Amoxicilina; Amp – Ampicilina; Ami – Amicacina; Amox – Amoxicilina; Ca – Cefadroxil; Cfc – Cefaclor; Cf – Ceftazidima; Cip – Ciprofloxacina; Clo – Cloranfenicol; Im – Imipenem; Can – Canamicina; Szt – Sulfametrim; Tet – Tetraciclina; Tob – Tombramicina; Oxa – Oxacilina; Gen – Gentamicina; Neo – Neomicina; Para – Paramomicina; But – Butirosina; Sis – Sisomicina; Net – Netilmicina.

4.1.5 *Material vegetal*

As folhas de *Duguetia furfuracea* foram coletadas no mês de Junho/2010, no Sítio Barreiro Grande localizado no município de Crato-CE, em área de Cerrado da Chapada do Araripe. A espécie foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Maria Arlene Pessoa da Silva, e a exsiccata depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Regional do Cariri (URCA), sob registro nº 5508.

4.2 Metodologias

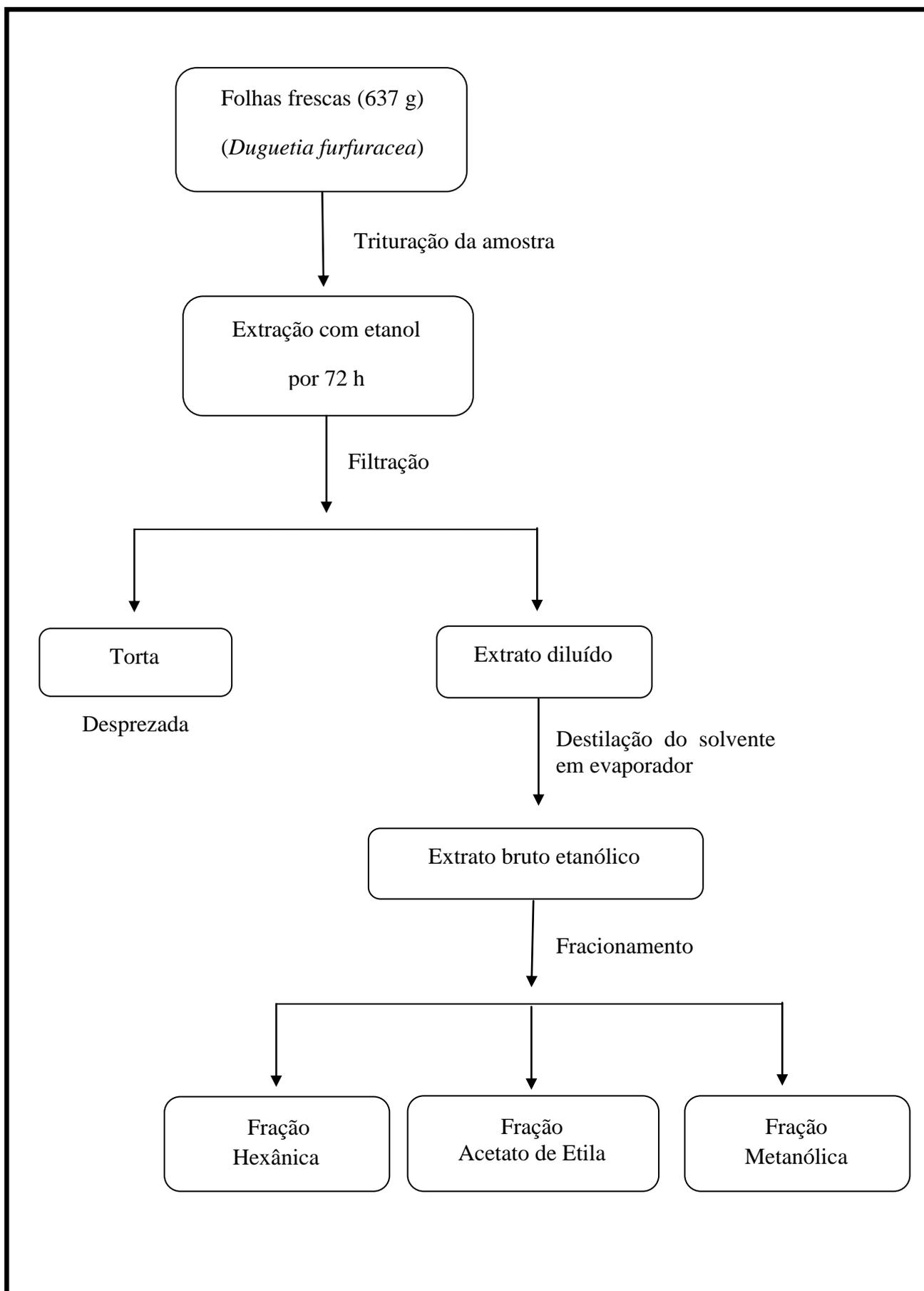
4.2.1 *Obtenção do extrato bruto etanólico e fracionamento*

O extrato etanólico foi preparado a partir das folhas frescas de *D. furfuracea* (637 g) pelo método de extração a frio com solvente orgânico (MATOS, 1997). As folhas da espécie foram previamente lavadas em água corrente, trituradas e maceradas e em seguida submetidas à extração em solvente etanol P.A. durante 72 horas. Após esse período o solvente etanólico foi destilado através de aparelho evaporador rotatório a 80 °C sob pressão reduzida, obtendo-se rendimento de 5,2% de extrato bruto. Em seguida realizou-se o fracionamento do extrato etanólico (10 g) sob filtração a vácuo, utilizando três solventes (de acordo com escala de polaridade): hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se respectivamente os seguintes rendimentos: 0,2%, 0,5% e 1,2%. Logo após essas amostras foram armazenadas a temperatura ambiente até realização dos ensaios (Figura 6).

4.2.2 *Prospecção fitoquímica*

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* foi realizada segundo a metodologia de Matos (1997), onde para identificação das classes de metabólitos secundários observa-se a mudança de cor ou formação de precipitados após adição de reagentes específicos.

Figura 6 – Metodologia de obtenção do extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Duguetia furfuracea*.



4.2.3 Avaliação da atividade antiulcerogênica do EEDF

4.2.3.1 Lesão gástrica induzida por etanol (ROBERT *et al.*, 1979)

Camundongos *Swiss* (n=8), foram tratados oralmente com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%), Omeprazol (30 mg/Kg) ou EEDF (100 e 300 mg/Kg) uma hora antes da administração de etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (0,01 mL, i.p.) e cetamina (0,02 mL, i.p.), sacrificados por decapitação, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ*. A área lesionada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol_{abs}.

Grupo	Dose/via/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 8; 1 h
Omeprazol	30 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
EEDF	300 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h

4.2.3.2 Lesão gástrica induzida por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969)

Camundongos *Swiss* (n=8), foram tratados oralmente com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%), Omeprazol (30 mg/Kg) ou EEDF (100 e 300 mg/Kg) uma hora antes da administração da indometacina (10 mg/Kg/v.o.). Após 3 h da administração do antiinflamatório, os tratamentos foram repetidos com o veículo, Omeprazol e o extrato.

Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (0,01 mL, i.p.) e cetamina (0,02 mL, i.p.), sacrificados por decapitação, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ*. A área lesionada foi inspecionada para atribuições de escores (Tabela 4).

Tabela 4 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por indometacina.

Grupo	Dose/via/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 8; 1 h
Omeprazol	30 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
EEDF	300 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h

4.2.3.3 Lesão gástrica induzida por etanol acidificado (MIZUI *et al.*, 1987)

Camundongos *Swiss* (n=8), foram tratados oralmente com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%), Omeprazol (30 mg/Kg) ou EEDF (100 e 300 mg/Kg) uma hora antes da administração via oral de 0,2 mL de uma solução de 0,3 M de HCl em etanol 60 %. Após 1 h, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (0,01 mL, i.p.) e cetamina (0,02 mL, i.p.) sacrificados por decapitação, os estômagos retirados, abertos pela grande curvatura, lavados em solução salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ*. A área lesionada foi expressa em termos de porcentagem em relação à área total do corpo gástrico (Tabela 5).

Tabela 5 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol acidificado.

Grupo	Dose/via/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 8; 1 h
Omeprazol	30 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
EEDF	300 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h

4.2.4 *Estudo do mecanismo de ação antiulcerogênico*

Para a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antiulcerogênico do EEDF, utilizou-se a dose eleita como a mais efetiva (100 mg/Kg EEDF) a partir do *screening* realizado anteriormente com os modelos clássicos de lesão gástrica.

4.2.4.1 Envolvimento do óxido nítrico (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

Para avaliar o envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito antiulcerogênico do EEDF no modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, camundongos *Swiss* (n=6) foram tratados com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou L-arginina (600 mg/Kg, v.o.). Após 1 h do tratamento via oral, foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Também foram realizadas combinações onde o EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes do N^G-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME, 10 mg/Kg, i.p.). Trinta minutos após a administração do etanol_{abs} os animais foram anestesiados e sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (Tabela 6).

Tabela 6 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade antiulcerogênica por indução de úlcera por etanol.

Grupo	Dose/via/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 6; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
L-arginina	600 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
L-NAME	10 mg/Kg; i.p.; 6; 30 min.

4.2.4.2 Envolvimento dos canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) (RAHGOZAR *et al.*, 2001)

Grupos de camundongos (n=6) *Swiss* foram tratados com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Diazóxido (DZO) (3 mg/Kg, i.p.) 1 h do tratamento via oral ou 30 min. do tratamento via intraperitoneal antes da administração de etanol_{abs} (0,2 mL/animal). Para avaliar a possível participação dos canais de K^+_{ATP} no efeito antiulcerogênico do EEDF, foram realizadas combinações nas quais o EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou DZO (3 mg/Kg, i.p.) foram administrados 1 h ou 30 min. antes da Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) respectivamente. Após 30 min. da administração do etanol_{abs}, os animais foram anestesiados e sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (Tabela 7).

Tabela 7 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento dos canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.

Grupo	Dose/via/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 6; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
Diazóxido	3 mg/Kg; i.p.; 6; 30 min.
Glibenclamida	5 mg/Kg; i.p.; 6; 30 min.

4.2.4.3 Envolvimento das prostaglandinas (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

O possível envolvimento das prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do EEDF foi avaliado utilizando-se camundongos *Swiss* (n=6), tratados com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Também neste mecanismo foram realizadas combinações onde o EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Misoprostol foram administrados 1 h antes da Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) e 2 h após administrado o etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min. após administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (Tabela 8).

Tabela 8 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento das prostaglandinas na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.

Grupo	Dose/via/n° animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 6; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
Misoprostol	0,016 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
Indometacina	10 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h

4.2.4.4 Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 (LAPA *et al.*, 2008)

Camundongos *Swiss*, divididos em grupos (n=6), foram tratados com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) 1 h do tratamento via oral ou 30 min. do tratamento via intraperitoneal antes da administração de etanol_{abs} (0,2 mL/animal). O envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 foi avaliado a partir de combinações onde o EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) foram administrados 1 h ou 30 min. antes da ioimbina (2

mg/Kg, i.p.) respectivamente. Trinta minutos após a administração do etanol_{abs} os animais foram anestesiados e sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (Tabela 9).

Tabela 9 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.

Grupo	Dose/via/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 6; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
Clonidina	0,1 mg/Kg; i.p.; 6; 30 min.
Ioimbina	2 mg/Kg; i.p.; 6; 30 min.

4.2.4.5 Envolvimento dos receptores H₂

Camundongos *Swiss*, divididos em grupos (n=6), foram tratados com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) 1 h do tratamento via oral ou 30 min. do tratamento via subcutânea antes da administração de etanol_{abs} (0,2 mL/animal). O envolvimento dos receptores H₂ foi avaliado a partir de combinações onde o EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) foram administrados 1 h ou 30 min. antes da Histamina (3 mg/Kg, s.c.) respectivamente. Trinta minutos após a administração do etanol_{abs} os animais foram anestesiados e sacrificados, tiveram seus estômagos retirados e analisados conforme descrito anteriormente (Tabela 10).

Tabela 10 – Grupos experimentais selecionados para avaliação do envolvimento dos receptores H₂ na atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol.

Grupo	Dose/via/n^o animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 6; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 6; 1 h
Ranitidina	40 mg/Kg; s.c.; 6; 30 min.
Histamina	3 mg/Kg; s.c.; 6; 30 min.

4.2.4.6 Avaliação da motilidade intestinal (LAPA *et al.*, 2008)

Para avaliação da motilidade, foram utilizados camundongos *Swiss* (n=8) tratados com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou atropina (0,1 mg/Kg, v.o.). Após 1 h dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%, v.o.). Transcorridos 30 min. desta administração, os animais foram anestesiados e sacrificados, seus estômagos e intestino delgado removidos e realizada a medição do comprimento total do intestino (desde o piloro até a junção ileocecal), bem como a distância percorrida pelo vermelho de fenol até a última porção que contenha, pelo menos, 1 cm contínuo do marcador. Os resultados das medidas foram expressos em percentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado. (Tabela 11).

Tabela 11 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da motilidade intestinal em camundongos.

Grupo	Dose/via/n^o animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 8; 1 h
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 8; 1 h
Atropina	0,1 mg/Kg; v.o. ; 8; 1 h

4.2.5 Lesão gástrica induzida por ácido acético (TAKAGI *et al.*, 1969)

Grupos de ratas *Wistar* (n=6) foram mantidos em jejum de sólidos por 18 h com acesso livre a água. Os animais foram submetidos à cirurgia para a indução das úlceras, onde foram anestesiados com uma mistura de xilazina e cetamina (6 e 60 mg/Kg, i.p. respectivamente). Logo após a anestesia os animais tiveram a parede abdominal aberta, o estômago exposto e injetado 50 µL de ácido acético 30% na subserosa da parede gástrica anterior. Na parede subserosa posterior foi aplicado 50 µL de soro fisiológico 0,9%. O local foi pressionado por 30 segundos para evitar o extravasamento da substância injetada. Em seguida, o estômago foi lavado cuidadosamente com salina 0,9% e a parede abdominal suturada. Após recuperação da anestesia, os animais retornaram a Unidade de Contenção de Animais da URCA, onde tiveram acesso a consumo de ração e água (devidamente pesados). Os tratamentos tiveram início no segundo dia após a cirurgia o qual teve duração de 14 dias, e consistiu na administração via oral de veículo (solução salina 0,9% + *Tween* 80), Omeprazol (30 mg/Kg) ou EEDF (100 mg/Kg). Ao final dos tratamentos, os animais foram anestesiados e sacrificados, o estômago removido e aberto pela grande curvatura, comprimidos entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise com o auxílio do programa *ImageJ*. Posteriormente realizou-se a determinação da área total de lesão e o percentual de área lesada (Tabela 12).

Tabela 12 – Grupos experimentais selecionados para avaliação da atividade antiulcerogênica por indução de úlcera induzida por ácido acético 30%.

Grupo	Dose/nº animais/tempo
Veículo	(0,1 mL/10 g); v.o.; 6; 14 dias
Omeprazol	30 mg/Kg; v.o.; 6; 14 dias
EEDF	100 mg/Kg; v.o.; 6; 14 dias

4.3 Atividade antibacteriana

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na avaliação da atividade antibacteriana a determinação da CIM foi realizada através do método de microdiluição em caldo, utilizando-se placas esterilizadas com 96 poços, onde as culturas de bactérias padrão antes mantidas a 4 °C em meio *Heart Infusion Agar* (HIA), foram repicadas e inoculadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 35 °C por um período de 24 horas. Em seguida, procedeu-se a padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana meio BHI 10% para obtenção da concentração final de 10^5 céls/mL (NCCLS, 2000).

As soluções do extrato bruto etanólico e as frações hexânica, acetato de etila e metanol foram preparadas utilizando 10 mg das amostras solubilizadas em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração, realizaram-se diluições em água destilada atingindo concentração de 1024 µg/mL. Durante o teste de microdiluição, as concentrações finais das amostras variou de 512 a 8 µg/mL. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h (JAVADPOUR *et al.*, 1996).

Após esse período, as placas foram reveladas com o auxílio de um corante específico, a resazurina. Foi preparada uma solução de resazurina sódica em água destilada na concentração de 0,01%, onde 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade, e após 1 h realizou-se a leitura do teste. A leitura dos resultados foi determinada através da mudança de coloração, sendo considerados positivos, os poços que permaneceram com a coloração azul, ou seja, não houve crescimento bacteriano e negativo os que obtiveram coloração vermelha (Figura 7) (MANN e MARKHAN, 1998; PALOMINO *et al.*, 2002). O controle negativo foi realizado com os meios de cultura contendo o inóculo bacteriano padronizado. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Figura 7 - Placa de microtitulação ilustrativa indicando a CIM após a adição da resazurina.



Fonte: Adaptado de MATIAS, 2010.

4.3.2 Avaliação da atividade moduladora

Para avaliação do extrato bruto etanólico e das frações como moduladores da atividade antibiótica, as CIM's dos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (Amicacina, Canamicina, Gentamicina e Neomicina), foram avaliados na presença e ausência do extrato e frações pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2003). Os aminoglicosídeos foram avaliados em concentrações que variaram de 2500 a 1,22 $\mu\text{g/mL}$. Foram utilizadas linhagens multirresistentes de *E. coli* (Ec 27) e *S. aureus* (Sa 358) inoculadas em caldo BHI a 10% e incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 h. O controle positivo foi realizado contendo apenas os antibióticos e o inóculo.

As soluções dos antibióticos foram preparadas com a adição de água destilada estéril de forma a obter uma concentração correspondendo a 5000 $\mu\text{g/mL}$. Um volume de 100 μL de cada solução dos antibióticos foi diluído seriadamente nos poços contendo o

meio de cultura em caldo BHI a 10% e a suspensão bacteriana contendo o extrato ou frações na concentração subinibitória (CIM/8) (COUTINHO, 2008). As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina como especificado anteriormente.

4.4 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média±erro padrão da média (E.P.M). As diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguindo dos testes de *Student-Newman-Keuls*, *Tukey* e *Bonferroni*. Foram consideradas diferenças significativas valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com utilização do programa *Software Graph Pad Prism* versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica das folhas de *Duguetia furfuracea*, permitiu identificar a presença de taninos condensados, chalconas, auronas, catequinas, flavononas e alcalóides, conforme evidenciado na Tabela 13.

Tabela 13 – Classes de metabólitos secundários encontradas no extrato etanólico bruto das folhas de *D. furfuracea*.

Classes de Metabólitos	(+) Presença (-) Ausência
Fenóis	-
Taninos pirogálicos	-
Taninos condensados	+
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	-
Flavonóis	-
Xantonas	-
Chalconas	+
Auronas	+
Flavononóis	-
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	+
Flavononas	+
Alcalóides	+

Na família Annonaceae, o estudo fitoquímico tem se concentrado nos gêneros *Annona*, *Goniothalamus*, *Monodora*, *Rollinia*, *Uvaria* e *Xylopia* (LEBOEUF *et al.*, 1982). Entretanto, trabalhos desenvolvidos por Carollo *et al.* (2005), a partir de diferentes

extratos de folhas e ramos da espécie *Duguetia furfuracea*, permitiram o isolamento de flavonóides e alcalóides, corroborando com os nossos resultados onde foram encontrados estes mesmos constituintes. Outros trabalhos, isolaram e identificaram a partir das folhas de *Duguetia furfuracea* os seguintes flavonóides glicosilados: 3-*O*-galactosilgalactosilkaempferol, 3-*O*-galactosilisoramnetina, 3-*O*-galactosilramnosil-isoramnetina e 3-*O*-ramnosilglucosil-isoramnetina (SANTOS e SALATINO, 2000). Estudos realizados com espécies que pertencem ao mesmo gênero, também confirmam nossos resultados em relação à presença de alcalóides contidos na espécie, demonstrando a riqueza deste constituinte neste gênero (FECHINE *et al.*, 2002).

Flavonóides são considerados um grupo de grande interesse econômico e, principalmente, farmacológico, pois, possuem atividades antitumorais, antiinflamatórias, antioxidantes, antibacteriana, antivirais, dentre outras (SHIRWAIKAR, *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2007). Aos alcalóides, são atribuídas atividades anti-hipertensivas, antitumorais, antieméticos e antiinflamatórias (BRITO *et al.*, 2008). Os taninos são conhecidos por seu potencial bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral, inibidor da peroxidação de lipídeos e seqüestrador de radicais livres (CHUNG *et al.*, 1998; DE BRUYNE *et al.*, 1999; DUFRESNE e FARNWORTH, 2001; MOURE *et al.*, 2001).

Possivelmente, essas substâncias naturais presentes na planta forneceu subsídios para o estudo antiulcerogênico e antibacteriano.

5.2 Atividade antiulcerogênica do EEDF

5.2.1 Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzida por etanol

A atividade antiulcerogênica do EEDF foi inicialmente avaliada com o modelo clássico de úlcera induzida por etanol, um agente necrosante da mucosa gástrica.

A administração de etanol_{abs}, por via oral em camundongos, produziu lesões gástricas que comprometeram ($25,51 \pm 3,14$) a mucosa gástrica. O pré-tratamento dos animais com EEDF nas doses de 100 e 300 mg/Kg, 1 h antes da administração do etanol reduziu significativamente o aparecimento de lesões na mucosa gástrica em 68,72% e

94,42% respectivamente, quando comparado ao grupo veículo. O tratamento com um inibidor da bomba de prótons $H^+K^+/ATPase$ (Omeprazol, 30 mg/Kg, v.o.), utilizado como controle positivo no teste, reduziu de maneira significativa a área de incidência de lesão induzida pelo etanol em 81,57% quando comparado ao grupo veículo (Figura 8, Apêndice B, Tabela 16).

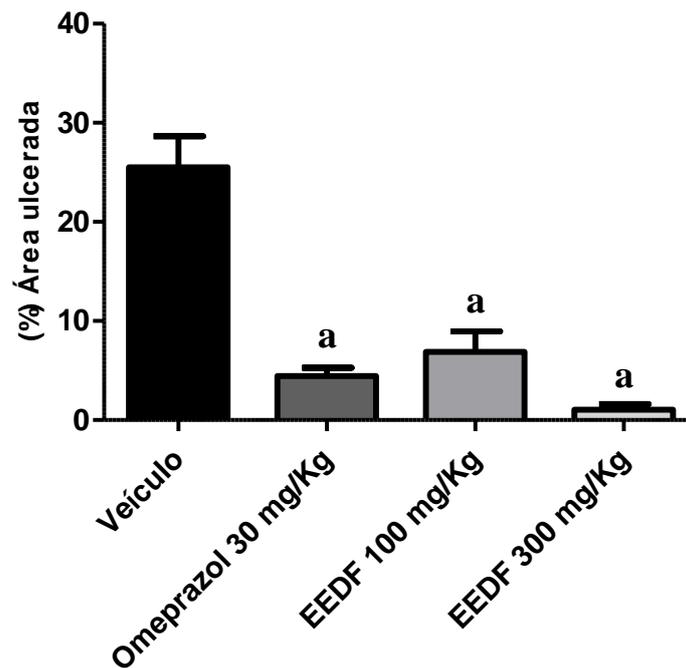


Figura 8 – Efeito do EEDF sobre as lesões gástricas induzidas por etanol_{abs} em camundongos. Veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), Omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) ou EEDF (100 e 300 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes dos animais receberem etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=8 animais por grupo). ^a $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

A úlcera induzida por etanol constitui um modelo clássico de indução de lesões gástricas em animais sendo utilizado para o estudo fisiopatológico e para a prospecção de novas moléculas (KWIECIÉN *et al.*, 2002; KONTUREK *et al.*, 1998; KONTUREK *et al.*, 2001). O etanol é considerado um potente agente ulcerogênico que atua como necrotizante de ação direta na mucosa gástrica. Além disso, o etanol induz lesões gástricas através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, danos no endotélio vascular, desordem da microcirculação e isquemia, com conseqüente produção de radicais livres, liberação de

endotelinas, desgranulação de mastócitos e inibição da síntese de prostaglandinas, resultando na redução da produção de muco e aparecimento de lesões gástricas hemorrágicas (PAN *et al.*, 2008).

Estudos têm relatado a influência de vários fatores no desenvolvimento das lesões gástricas associadas ao etanol. Em estudos realizados por Szelenyi e Brune (1988) foi observado a influência da formação de radicais livres para desenvolvimento de lesões, mostrando que a redução da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) acarreta em grande aumento nos danos em resposta a esse agente lesivo. Os autores ainda relataram em seu estudo, que compostos com propriedades de seqüestrar radicais livres como dimetilsulfóxido e compostos sulfidrílicos são efetivos ao impedir ou diminuir o dano sobre a mucosa gástrica após administração de etanol.

Neste modelo, foi observado que o pré-tratamento com o EEDF protegeu a mucosa gástrica em camundongos contra as úlceras induzidas pelo etanol_{abs}, sugerindo uma ação antiulcerogênica exercida pelo extrato. Essa atividade antiulcerogênica pode ser devido à presença de compostos que apresentam propriedades antioxidantes, como os flavonóides e os taninos (HODEK *et al.*, 2002), sendo estes encontrados na espécie em estudo.

5.2.2 *Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzida por indometacina*

Neste modelo, o EEDF apresentou significativo efeito antiulcerogênico nas doses de 100 e 300 mg/Kg, obtendo-se respectivamente, 58,11% e 61,94% de proteção quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo ($7,42 \pm 1,46$). Já o grupo tratado com omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) conferiu uma proteção significativa de 67,57% em relação ao grupo controle (Figura 9, Apêndice B, Tabela 17).

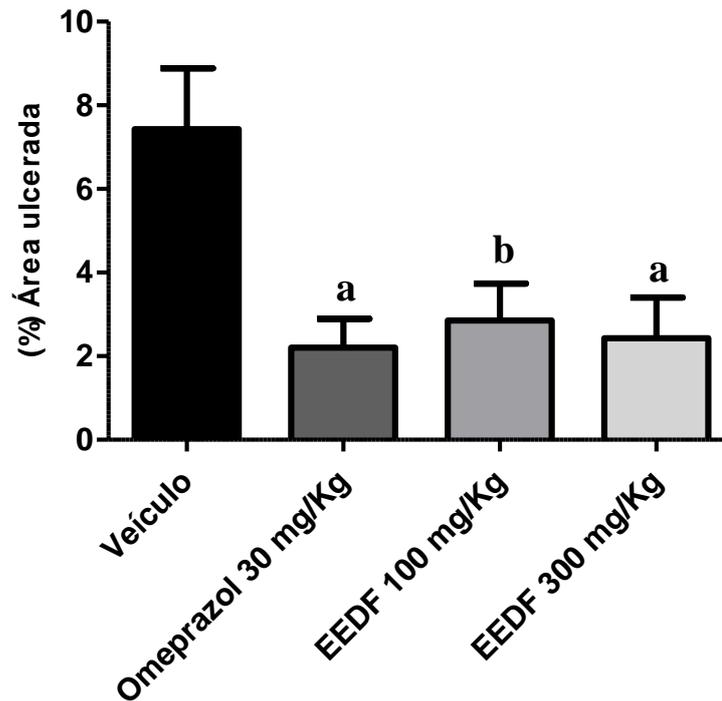


Figura 9 – Efeito do EEDF sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina em camundongos. Veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), Omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) ou EEDF (100 e 300 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes dos animais receberem indometacina (10 mg/Kg, v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=8 animais por grupo). ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,05$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de *Student-Newman-Keuls*).

Úlceras causadas por AINE's envolvem mecanismos de inibição das COX's 1 e 2, de maneira a promover a redução da síntese de prostaglandinas (PG's). As PG's endógenas atuam na regulação do fluxo sanguíneo da mucosa, proliferação de células epiteliais, regeneração epitelial, secreção de muco e de bicarbonato e secreção basal de ácido e na atividade imune da mucosa. Desse modo, a inibição da síntese de prostaglandinas resulta em enfraquecimento das defesas da mucosa, diminuindo a sua capacidade de resistir a agressores (CHAN e LEUNG, 2002). A inibição da COX-1 é pelo menos em parte, responsável por alguns dos efeitos adversos dos AINE's, como as toxicidades renal e gastrointestinal (ROBERTS e MORROW, 2001; SEAGER e HAWKEY, 2001). Diversos artigos recentes têm esclarecido a contribuição adicional da COX-2 na defesa da mucosa gástrica e na cicatrização de úlceras. Em algumas circunstâncias, COX-2 produz uma substância gastroprotetora altamente potente (15-R-lipoxina A₄), o qual análogo dessa substância provavelmente possuiria valor terapêutico na prevenção de ulcerações (WALLACE, 2005).

A cicatrização de úlceras requer angiogênese no tecido de granulação na base da mesma, junto com a replicação das células epiteliais nas margens da úlcera e subsequentemente o reestabelecimento da arquitetura glandular. A proliferação de células epiteliais e endoteliais é possível devido aos fatores de crescimento. As drogas inibidoras da COX, seletivas e não seletivas, podem interferir negativamente na cura de úlceras gástricas, em partes, devido à habilidade dessas drogas em reduzir a expressão de fatores de crescimento, inibindo a angiogênese na região da úlcera (WALLACE, 2005).

No modelo de úlcera induzida por AINE, novamente foi evidenciado uma atividade antiulcerogênica significativa do EEDF (100 e 300 mg/Kg) que protegeu a mucosa gástrica dos camundongos frente à indução de lesões por AINE (indometacina).

5.2.3 Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzidas por etanol acidificado

O EEDF apresentou significativo efeito antiulcerogênico nas doses de 100 e 300 mg/Kg com proteção de 56,64% e 63,24% respectivamente, em relação ao grupo tratado apenas com veículo ($21,74 \pm 2,52$). O controle positivo (Omeprazol, 30 mg/Kg, v.o.), teve um percentual de inibição de 74,04% quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo (Figura 10, Apêndice B, Tabela 18).

A úlcera induzida por etanol acidificado promove lesões necróticas de maneira multifatorial na mucosa gástrica. O etanol é um potente agente ulcerogênico que atua dissolvendo a camada de muco da mucosa gástrica, resultando em aumento do fluxo de Na^+ e H^+ no lúmen, estimulando a secreção de pepsina, histamina e H^+ (SINGH *et al.*, 2008; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009; SANTIN *et al.*, 2010). Além disso, o etanol faz com que o tecido entre em um estado de êxtase de sangue levando a graves lesões com características necróticas (MAROTTA *et al.*, 1999).

Neste modelo, as lesões ulcerativas são decorrentes da ação necrosante do etanol sobre a mucosa gástrica, com menor participação da secreção ácida, sendo de etiologia bastante ampla e complexa, envolvendo a depleção dos fatores protetores (muco e bicarbonato) e aumentando os fatores agressores (ácido clorídrico) (VÁZQUEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2006). Os efeitos do etanol sobre a mucosa gástrica podem estar

associados com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), que causam um desequilíbrio entre o processo antioxidante e oxidante celular. A administração de etanol resulta em lesões no plexo vascular, ocasionando ruptura dos vasos, favorecendo a hemorragia e necrose, retrodifusão de íons hidrogênio, causando esfoliação nas células epiteliais, rompendo a barreira protetora da mucosa e alterando a permeabilidade da membrana (SIKIRIC *et al.*, 1999).

Os resultados da atividade antiulcerogênica do EEDF no modelo de úlcera induzida pela administração via oral de etanol acidificado, demonstrou significativo efeito antiulcerogênico nas doses testadas, possivelmente através do mecanismo de ação antioxidante dos flavonóides e taninos, como já foi relatado anteriormente.

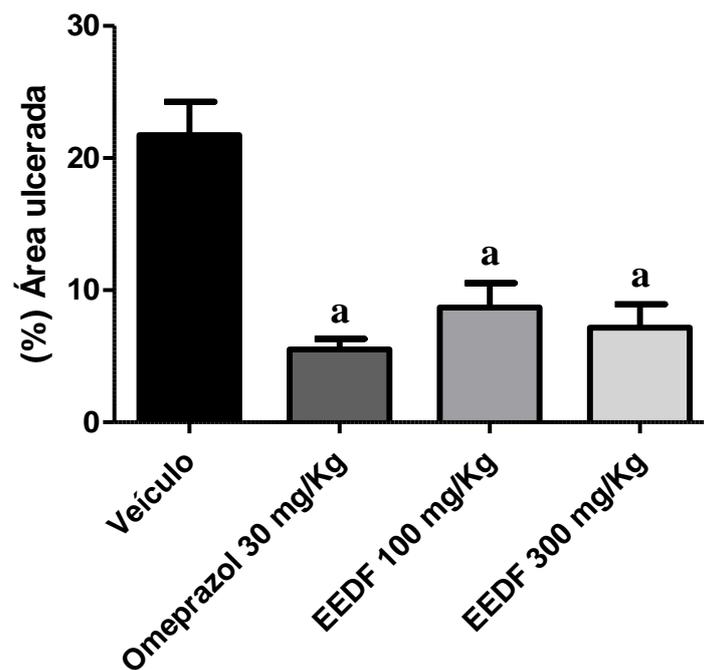


Figura 10 – Efeito do EEDF sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos. Veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), Omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) ou EEDF (100 e 300 mg/Kg, v.o.) foram administrados 1 h antes dos animais receberem de uma solução 0,3 M de HCl em etanol 60% (0,2 mL/animal, v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada (n=8 animais por grupo). ^a $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

5.2.4 *Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico do EEDF*

Para a avaliação do envolvimento do óxido nítrico (NO) no mecanismo antiulcerogênico do EEDF, realizou-se o modelo de úlcera induzida por etanol associada ao L-NAME. Os animais tratados apenas com veículo (1% *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.) mostraram, após a administração de etanol absoluto, a área de lesão da mucosa gástrica de $24,87 \pm 4,13$. A administração prévia de EEDF (100 mg/Kg, v.o.) e L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) reduziram de forma significativa o percentual de lesão gástrica ($5,44 \pm 1,77$) e ($0,21 \pm 0,12$) em comparação ao grupo tratado com veículo ($24,87 \pm 4,13$), correspondendo a um percentual de inibição de 75,18% e 98,90%, respectivamente. A administração de L-NAME reverteu o efeito protetor da L-arginina na dose de 600 mg/Kg ($23,91 \pm 2,57$). O mesmo foi observado no EEDF (100 mg/Kg) quando associado ao L-NAME (10 mg/Kg, i.p.), o qual teve seu efeito protetor revertido apresentando percentual de área ulcerada de $16,07 \pm 4,68\%$ (Figura 11, Apêndice B, Tabela 19).

O NO é um importante transmissor endógeno liberado pelas células endoteliais, quando a mucosa está exposta a agentes nocivos. Sua função principal é proteger a mucosa gástrica de agentes vasopressores e inibir a secreção de ácido gástrico de células parietais (TULASSAY e HERSZÉNYI, 2010).

Além reduzir efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, o NO facilita a cicatrização do tecido lesado e a inibição da sua síntese aumenta à susceptibilidade do estômago à injúria provocada por agentes como o etanol (MASUDA *et al.*, 1995; KAWANO e TSUJI, 2000). A presença de NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio, que são altamente citotóxicos (WALLACE e MILLER *et al.*, 2000).

No trato gastrointestinal, o NO, pode exercer efeitos protetor e deletério (promover peroxidação lipídica, quando combinado com ROS), porém isso irá depender do tipo de óxido nítrico sintetase (NOS) envolvida. Um bloqueio na produção de NO acarreta em um enfraquecimento da resposta vascular e subsequente fluxo alcalino no lúmen (CHO, 2001). Recentes estudos mostraram que o NO estimula a síntese de PG inflamatórias ao ativar a isoenzima II da COX-2. Por conseguinte, a inibição da via NO

pode exercer um efeito benéfico sobre doenças inflamatórias. Estudos que utilizam inibidores da COX-2 demonstram a necessidade do NO para a manutenção da expressão do gene da COX-2 (KATZUNG, 2005).

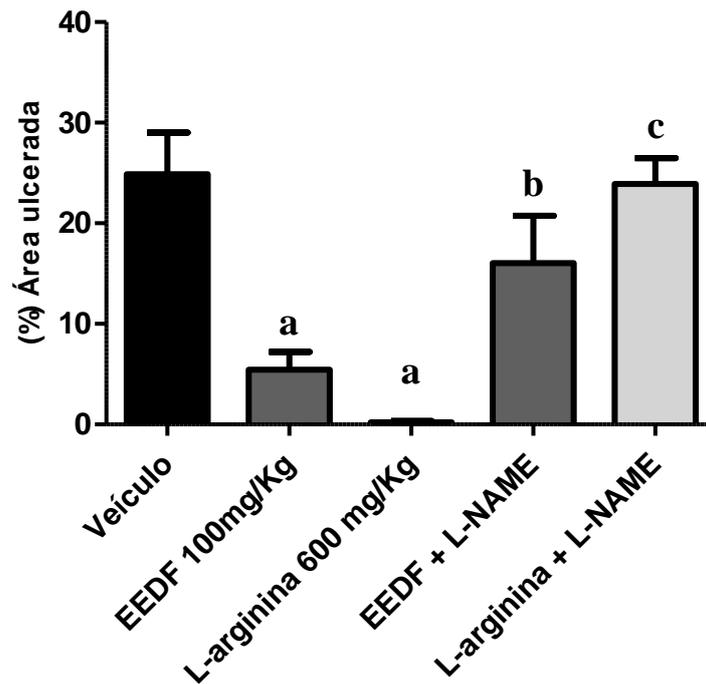


Figura 11 – Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os animais foram tratados previamente com Veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) ou EEDF (100 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, L-Name (10 mg/Kg, i.p.) foi administrado 1 h após os animais receberem L-arginina (grupo L-arginina + L-NAME) ou EEDF 100 mg/Kg (grupo EEDF 100 + L-NAME). Os valores representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de área gástrica ulcerada (n=6 animais por grupo). ^a $p < 0,001$ vs controle veículo; ^b $p < 0,05$ vs EEDF 100 mg/Kg; ^c $p < 0,001$ vs L-arginina (600 mg/Kg) (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

Estudos realizados por Nahavandi *et al.* (1999) em roedores, demonstraram que o L-NAME aumenta a quantidade e intensifica a lesão provocada pelo álcool no estômago. Em nosso estudo, o L-NAME acentuou as lesões na mucosa gástrica induzida pela administração de etanol, e quando administrado em associação ao EEDF (100 mg/Kg) atuou revertendo o seu efeito antiulcerogênico, demonstrando assim, que este provavelmente seja dependente da via NO.

Zayachkivska *et al.* (2005) demonstraram o efeito gastroprotetor de diversos flavonóides provavelmente devido a um aumento na expressão de NOS constitutiva e liberação de NO e neuropeptídeos. Assim, nossos resultados sugerem uma possível participação do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do EEDF, sendo devido à presença de flavonóides em sua constituição química.

5.2.5 *Envolvimento dos canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no efeito antiulcerogênico do EEDF*

Para a avaliação do envolvimento dos canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no mecanismo antiulcerogênico do EEDF, realizou-se o modelo de úlcera induzida por etanol associada à glibenclamida. Os animais tratados apenas com veículo (1% *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.) mostraram, após a administração de etanol absoluto, a área de lesão da mucosa gástrica de $(14,72 \pm 2,39)$. A administração prévia de EEDF (100 mg/Kg, v.o.) e Diazóxido (3 mg/Kg, v.o.) reduziram de forma significativa o percentual de lesão gástrica $(5,44 \pm 1,77)$ e $(2,61 \pm 1,51)$ em comparação ao grupo tratado com veículo $(14,72 \pm 2,39)$, correspondendo a um percentual de inibição de 57,90% e 75,91%, respectivamente. O EEDF (100 mg/Kg) não teve seu efeito protetor revertido quando associado à glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), droga bloqueadora de K^+_{ATP} , porém o inverso ocorreu com o DZO, o qual a proteção foi revertida pela ação da glibenclamida $(12,34 \pm 2,11)$ (Figura 12, Apêndice B, Tabela 20).

Os canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) pertencem a uma grande família de proteínas de membrana, os quais são regulados por ligantes, tendo por base a sua sensibilidade ao ATP intracelular, que inibe sua atividade. Tem sido relatado que os K^+_{ATP} se encontram envolvidos em uma variedade de funções fisiopatológicas do estômago, dentre elas estão à regulação do fluxo sanguíneo, secreção de ácido gástrico e contratilidade do estômago (TOROUDI *et al.*, 1999; SILVERTHORN, 2003).

A glibenclamida, droga utilizada como antidiabética, pertence à classe das sulfoniluréias que atuam fechando os canais K^+_{ATP} , exercendo a sua principal ação sobre as células β , estimulando assim a secreção de insulina e por fim reduzindo o nível plasmático da glicose (KATZUNG, 2005). Já o Diazóxido (DZO) um vasodilatador que

ativa e abre os canais K^+_{ATP} em diversos tecidos, age causando hiperpolarização da membrana plasmática e redução da atividade elétrica (ASHCROFT e GRIBLLE, 2000; JAHANGIR *et al.*, 2001).

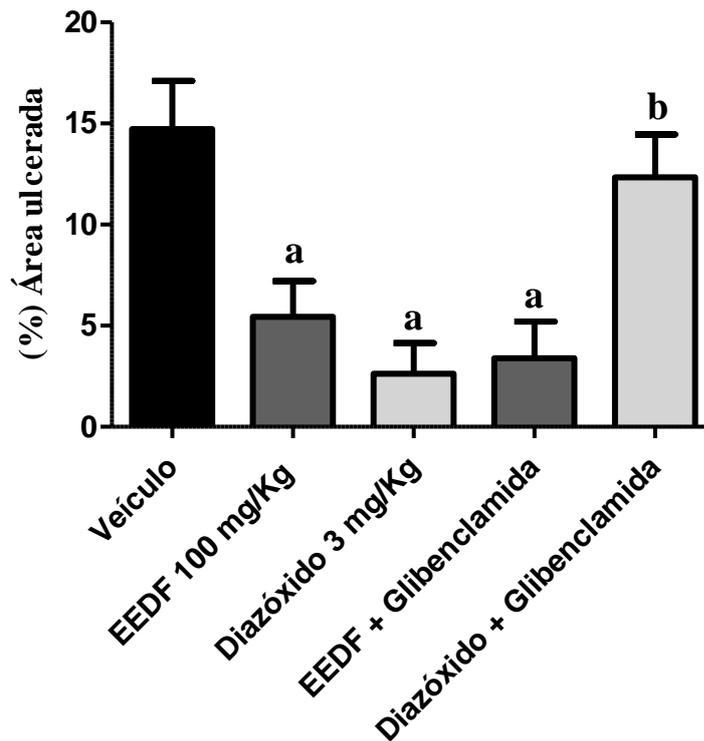


Figura 12 – Envolvimento dos Canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}) no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os animais foram tratados previamente com Veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), ou EEDF (100 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Diazóxido (DZO) (3 mg/Kg, i.p.) foi administrado 30 min. antes dos animais receberem etanol. Nas combinações, Glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) foi administrado 30 min ou 1 h após os animais receberem DZO (Grupo DZO + Glibenclamida) ou EEDF 100 mg/Kg (grupo EEDF + Glibenclamida). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=6 animais por grupo). ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,01$ vs DZO (3 mg/Kg) (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

A capacidade dos fármacos glibenclamida e DZO alterarem a resposta de algumas drogas tem sido aceita como evidência para sugerir o envolvimento dos canais K^+_{ATP} nos eventos biológicos que resultam em gastroproteção (SAKAI *et al.*, 1999). No presente

estudo, foi avaliado a participação dos canais K^+_{ATP} na atividade antiulcerogênica do EEDF no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. O efeito protetor do EEDF não foi revertido de forma significativa na presença da droga glibenclamida, sugerindo assim, que os canais K^+_{ATP} parecem não estar envolvidos com o efeito antiulcerogênico do extrato.

5.2.6 *Envolvimento das prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do EEDF*

A administração de etanol aos animais que foram previamente tratados apenas com veículo (1% *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.) produziu grande percentagem de área ulcerada ($4,59 \pm 1,00$). A área ulcerada pelo agente lesivo etanol foi significativamente diminuída com o pré-tratamento de EEDF 100 mg/Kg, v.o. ($1,16 \pm 0,49$) e Misoprostol 0,016 mg/Kg, v.o. ($0,64 \pm 0,33$) quando comparados ao grupo tratado apenas com veículo. Quando associado à Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) o efeito antiulcerogênico do extrato não foi revertido ($0,69 \pm 0,27$), diferentemente do Misoprostol que teve seu efeito revertido pela Indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas ($4,55 \pm 0,70$) (Figura 13, Apêndice B, Tabela 21).

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINE's), como a indometacina, são conhecidos por produzirem efeitos tóxicos renais e por induzir danos gástricos através de múltiplos mecanismos. Essa droga atua inibindo o metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela via das ciclooxigenases (COX), alterando assim o equilíbrio entre os fatores agressores e protetores da mucosa do estômago promovendo várias desordens no organismo como: aumento da acidez, redução do fluxo sanguíneo, bloqueio ou redução da síntese de prostaglandinas citoprotetoras (PGE_2 e PGI_2), além de causar ação irritante no estômago (GONZALEZ *et al.*, 2001)

A atividade protetora das prostaglandinas na mucosa gástrica é mediada pelo aumento na produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção do ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e na manutenção do fluxo sanguíneo durante a exposição a agentes irritantes (BATISTA *et al.*, 2004; CAMPOS, 2008). As prostaglandinas também ajudam a acelerar o processo de cicatrização de úlceras em modelos experimentais e em humanos (SONTAG *et al.*, 1994; HAWKEY *et al.*, 1998), porém os mecanismos responsáveis por este efeito ainda não são

totalmente esclarecidos. No entanto a capacidade das prostaglandinas reduzirem a secreção de ácido gástrico contribui para que ocorra a aceleração da cicatrização de úlceras (WALLACE, 2008).

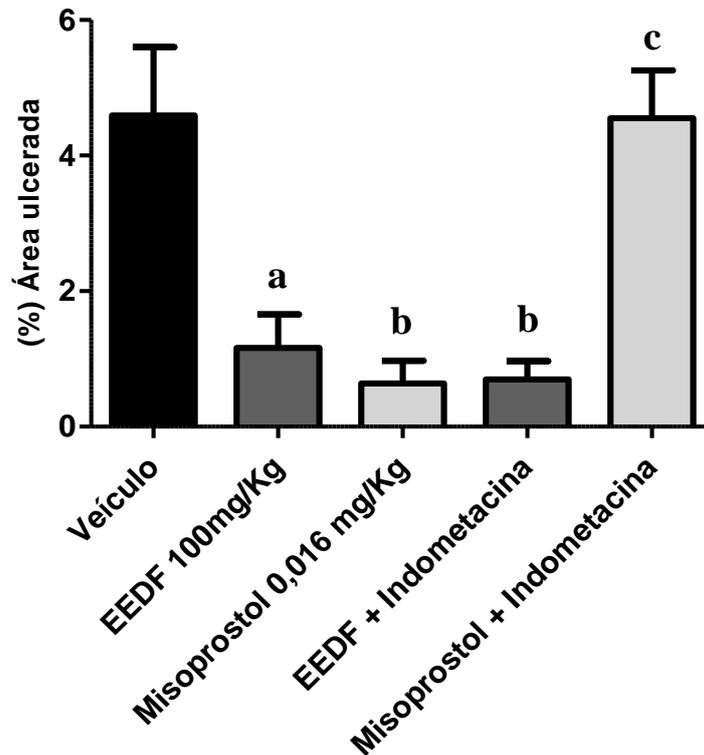


Figura 13 – Envolvimento das Prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os animais receberam veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), Misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) ou EEDF (100 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, Indometacina (10 mg/Kg, v.o.) foi administrado 1 h após do EEDF 100 mg/Kg ou Misoprostol 0,016 mg/Kg. Os valores representam a média ± E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=6 animais por grupo). ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,001$ vs controle veículo; ^c $p < 0,001$ vs Misoprostol (0,016 mg/Kg) (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

No estudo do envolvimento das prostaglandinas, o misoprostol (0,016 mg/Kg), um análogo das prostaglandinas do tipo E1 (PGE1), inibiu significativamente o aparecimento de lesões gástricas induzidas pelo etanol, quando comparado com o grupo controle veículo. Essa droga age inibindo a secreção de ácido gástrico, além de aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa e a secreção de muco e bicarbonato (RANG *et al.*, 2004). A atividade gastroprotetora do EEDF não foi revertida na presença da droga Indometacina.

Nesse sentido pode-se dizer que o efeito antiulcerogênico do EEDF possivelmente não está envolvido com a participação das prostaglandinas.

5.2.7 *Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF*

Os animais tratados apenas com veículo (1% *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.) mostraram, após a administração de etanol absoluto, a área de lesão da mucosa gástrica de $16,81 \pm 2,86$. A administração prévia de EEDF (100 mg/Kg, v.o.) e Clonidina (0,01 mg/Kg, i.p.) reduziram de forma significativa o percentual de lesão gástrica ($5,32 \pm 1,83$) e ($5,02 \pm 1,82$) em comparação ao grupo tratado com veículo ($16,81 \pm 2,86$), correspondendo a um percentual de inibição de 63,69% e 65,32%, respectivamente. A administração da ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) reverteu o efeito protetor da Clonidina ($14,25 \pm 1,82$). O mesmo foi observado no EEDF (100 mg/Kg) quando associado a ioimbina, um bloqueador dos receptores noradrenérgicos α_2 o qual teve seu efeito protetor revertido de forma significativa apresentando percentual de área ulcerada de $14,25 \pm 1,82\%$ (Figura 14, Apêndice B, Tabela 22).

A ioimbina é um antagonista adrenérgico α_2 seletivo, encontrada na casca da árvore *Pausinystalia yohimbe* e na raiz de *Rauwolfia*. É um alcalóide indolalquilâmico, cuja estrutura química assemelha-se à reserpina, e é utilizada para reduzir ou melhorar problemas de ereção (HOFFMAN *et al.*, 1996).

Os α_2 -receptores são encontrados no sistema nervoso central e periférico, em tecidos não-neuronais, como plaquetas, fígados, pâncreas, rim, olhos, onde exercem funções fisiológicas específicas. Podem ser pré ou pós-sinápticos e estão funcionalmente ligados a uma proteína G inibitória (HAYASHI, 1993). Os α_2 -receptores pré-sinápticos regulam a liberação de noradrenalina e ATP através de mecanismo de retroalimentação negativo e regulação da secreção do ácido gástrico, sendo também efetivos na proteção contra agentes químicos, como AINE's e etanol. Assim, quando ativados por α_2 -agonistas inibem a liberação de noradrenalina. Já a ativação dos receptores- α_2 pós-sinápticos situados na musculatura lisa dos vasos promove vasoconstrição (CASEY, 1988; GYIRES *et al.*, 2000).

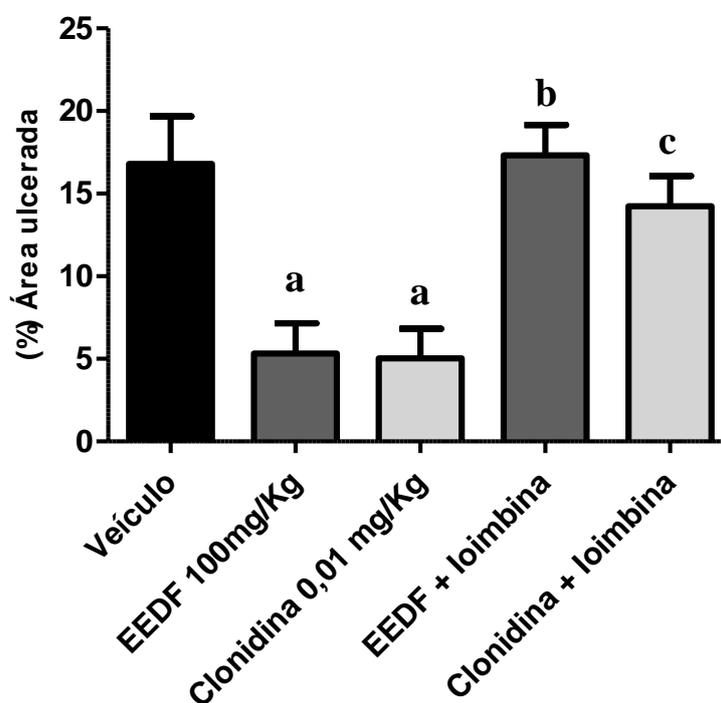


Figura 14 – Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os animais receberam veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Clonidina (0,01 mg/Kg, i.p.) 1 h ou 30 min antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, Ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) foi administrado 1h ou 30 min após do EEDF 100 mg/Kg, v.o.) e Clonidina 0,01 mg/Kg. Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=6 animais por grupo). ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,01$ vs EEDF 100 mg/Kg; ^c $p < 0,01$ Clonidina 0,01 mg/Kg (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

A estimulação dos receptores α_2 -adrenérgicos no trato gastrointestinal pode aumentar a absorção de cloreto de sódio e de líquido e inibir a secreção de bicarbonato (CHANG *et al*, 1986). Estudos realizados por Gyires (2000 e 2001) demonstraram que receptores opioides e α_2 -adrenérgicos estão envolvidos no mecanismo de gastroproteção no modelo de úlcera induzida por etanol acidificado. Segundo o autor existe uma interação entre receptores pré-sinápticos e α_2 -adrenérgicos e sistema opióide e que a droga clonidina pode induzir gastroproteção por mecanismos centrais.

No presente estudo, tanto o EEDF (100mg/Kg) quanto a Clonidina, tiveram seu efeito gastroprotetor revertido de forma significativa na presença da droga ioimbina, um

alcalóide indólico que atua como antagonista seletivo dos receptores α_2 -adrenérgico. A presença de alcalóides na constituição do EEDF pode nos sugerir que estes estejam envolvidos nesse tipo de mecanismo gastroprotetor, já que estes compostos apresentam ação biológica normalmente sobre o sistema nervoso central (BIAVATTI e LEITE, 2005). Esses resultados demonstram que a atuação do EEDF é dependente da via dos receptores noradrenérgicos α_2 .

5.2.8 *Envolvimento dos receptores H_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF*

Camundongos tratados apenas com veículo (1% *Tween* 80 em solução salina 0,9%, v.o.) mostraram, após a administração de etanol absoluto, a área de lesão da mucosa gástrica de $15,11 \pm 1,48$. A administração prévia de EEDF (100 mg/Kg, v.o.) e Ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) reduziram de forma significativa o percentual de lesão gástrica ($6,54 \pm 1,50$) e ($0,54 \pm 0,22$) em comparação ao grupo tratado com veículo ($15,11 \pm 1,48$), correspondendo a um percentual de inibição de 51,51% e 98,07%, respectivamente. A administração de histamina (3 mg/Kg, s.c.) não foi capaz de reverter o efeito protetor do EEDF (100 mg/Kg, v.o.). Entretanto, o inverso ocorreu com a Ranitidina (40 mg/Kg, s.c.), a qual teve sua ação protetora revertida pela histamina ($18,41 \pm 2,65$) (Figura 15, Apêndice B, Tabela 23).

A histamina é produzida no estômago pelas células enterocromafins (ECL) e estocada em vesículas secretoras, sendo esta liberada após alguns estímulos, principalmente de gastrina e acetilcolina (MÖSSNER e CACA, 2005). Quando liberada, a histamina estimula a secreção de ácido gástrico nas células parietais diretamente pela ligação em receptores H_2 . Estes receptores são acoplados a proteína G, e quando ativados, estimulam a adenilato ciclase com geração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). A histamina também estimula a secreção ácida indiretamente através da sua ligação a receptores H_3 , acoplados nas células D produtoras de somatostatina. Quando ativados, esses receptores inibem a secreção de somatostatina (substância que possui função de inibir a secreção do ácido por suprimir a liberação de gastrina, mediante retroalimentação negativa) (KAZUMORI *et al.*, 2004).

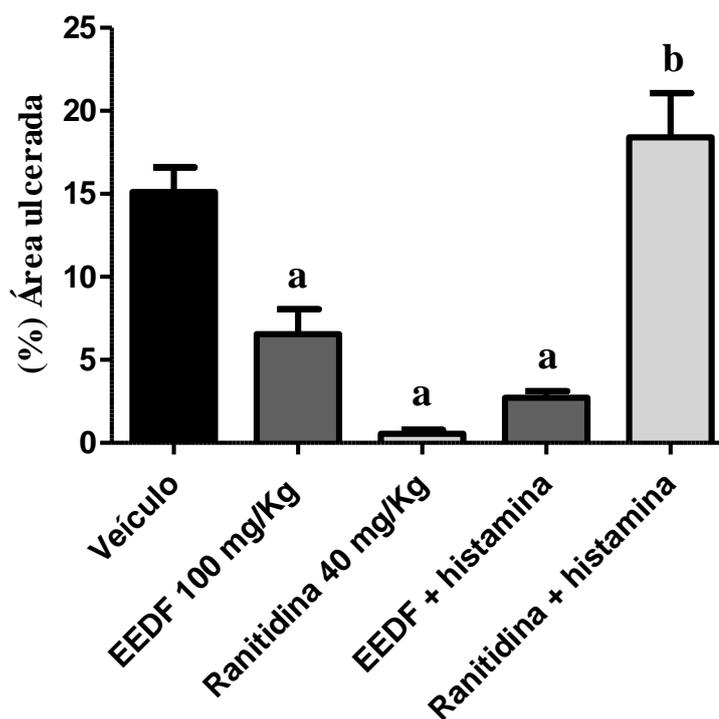


Figura 15 – Envolvimento dos receptores H_2 no efeito antiulcerogênico do EEDF em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os animais receberam veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) 1 h ou 30 min antes da administração do etanol (0,2 mL/animal, v.o.). Nas combinações, Histamina (3 mg/Kg, s.c.) foi administrado 1h ou 30 min após do EEDF 100 mg/Kg, v.o.) Ranitidina (40 mg/Kg, s.c.). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=6 animais por grupo). ^a $p < 0,001$ vs controle veículo; ^b $p < 0,001$ Ranitidina 40 mg/Kg (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

Em meados da década de 70, a supressão farmacológica da secreção ácida gástrica foi efetivada com a introdução dos antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos (cimetidina e ranitidina) e, até 1990, foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro. Na atualidade, existem quatro antagonistas H_2 utilizados clinicamente: cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina, os quais promovem a redução da secreção do ácido ao competir reversivelmente com a histamina pela sua ligação aos receptores H_2 nas células parietais, diminuindo os níveis de AMPc. O desenvolvimento de fármacos inibidores da bomba de prótons $H^+/K^+ATPase$ (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol), acarretou numa acentuada redução no uso dos antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos. Esses fármacos são medicamentos extremamente eficazes na inibição da secreção do ácido gástrico, resultando em melhoras significativas nas taxas de cicatrização de úlceras gástricas e duodenais, além de serem os medicamentos mais

utilizados no tratamento e prevenção dos distúrbios ácido-pépticos (YUAN, *et al.*, 2006; BRUNTON, *et al.*, 2006).

Entretanto, tanto os antagonistas de receptores H₂ quanto os inibidores da bomba de prótons, podem apresentar alguns efeitos adversos quando utilizados cronicamente devido à supressão do ácido gástrico. Dentre esses efeitos, destacam-se o desenvolvimento da hipergastrinemia (resultante da menor liberação de somatostatina a partir das células D, que ocorre subsequente à supressão da secreção ácida) e o aumento do risco de infecção bacteriana (como pela *Helicobacter pylori*), ressaltando-se que esses dois problemas podem levar à formação de câncer gástrico (YUAN, *et al.*, 2006; BRUNTON, *et al.*, 2006).

A avaliação do envolvimento dos receptores H₂ na atividade antiulcerogênica do EEDF no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol demonstrou que o efeito gastroprotetor do EEDF não foi revertido na presença da histamina, sugerindo assim que a gastroproteção do extrato não está envolvida na modulação dos receptores histamínicos. Por outro lado, a droga Ranitidina (40 mg/Kg), um antagonista dos receptores H₂, teve seu efeito antiulcerogênico bloqueado pela histamina.

5.2.9 Avaliação do EEDF sobre a motilidade intestinal

A percentagem da distância percorrida pelo marcador (vermelho de fenol 0,05%) no intestino delgado foi de 55,23±5,39% nos animais tratados apenas com veículo. O EEDF na dose de 100 mg/Kg, via oral, apresentou semelhante percentagem do percurso intestinal do marcador (53,13±2,47%) obtida pelo grupo veículo, demonstrando que o EEDF não afeta significativamente a motilidade intestinal.

A atropina (0,01 mg/Kg, v.o.), um antagonista muscarínico, reduziu de maneira significativa o trânsito intestinal (37,41±5,51%) quando comparado ao grupo controle (55,23±5,39%) (Figura 16, Apêndice B, Tabela 24).

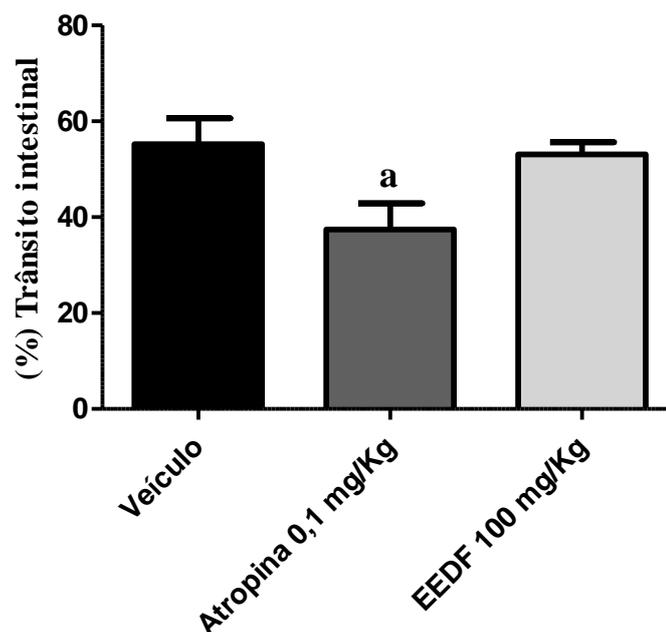


Figura 16 – Efeito do EEDF sobre a motilidade intestinal em camundongos. Os animais receberam veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), EEDF (100 mg/Kg, v.o.) ou Atropina (0,01 mg/Kg, v.o.). Após 1 h dos tratamentos, foi administrado o marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%, v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. (n=8 animais por grupo). ^a $p < 0,05$ vs controle veículo (ANOVA e Teste de *Student Newman Keuls*).

De acordo com Melo *et al.* (2007) a motilidade gastrointestinal é considerada um evento complexo que envolve interação entre as vias neurais, hormonais e neuromusculares, promovendo o movimento aboral do material alimentar.

Diversas substâncias endógenas desempenham papel na regulação da motilidade gastrointestinal, como: gastrina, colecistocinina (CCK), motilina, substância P, 5-Hidroxitriptamina e o hormônio inibidor da liberação de gastrina (bombesina) estimulam a motilidade. Por outro lado, secretina, glucagon, peptídeo intestinal vasoativo, encefalina e o hormônio inibidor da secreção de somatostatina, atuam inibindo a motilidade. Estas substâncias regulam a motilidade do trato gastrointestinal através de sua ação em neurotransmissores, atuando em receptores da dopamina tipo 2, receptores 5-Hidroxitriptamina e receptores opióides presentes no plexo mioentérico (EVANS, 1998; SASAKI *et al.*, 2003). Além desses, encontramos ainda a ação da grelina (CHEN, *et al.*, 2009), melatonina (KANDIL *et al.*, 2010) e leptina (HATA *et al.*, 2009) sobre a motilidade do trato gastrintestinal.

No presente estudo, o envolvimento da via colinérgica no mecanismo de ação gastroprotetor do EEDF, foi avaliado pelo modelo experimental que determina a taxa de trânsito intestinal.

A proteção da mucosa gástrica dar-se-ia através do aumento do trânsito intestinal promovendo uma aceleração do esvaziamento gástrico, diminuindo assim o efeito agressor do ácido no estômago e duodeno. A taxa de esvaziamento gástrico está relacionada ao mecanismo neurohumoral, o qual depende de uma inervação vagal intacta. Com isso, os neurônios mioentéricos da parede gástrica sofrem a ação de vários neurotransmissores, dentre eles a Acetilcolina, considerado o maior regulador da motilidade intestinal, atuando através dos receptores muscarínicos M_1 e M_3 (HANSEN, 2003).

O EEDF não alterou de forma significativa o trânsito intestinal, sugerindo que a via colinérgica não tem participação no mecanismo de ação gastroprotetor do extrato.

5.2.10 Efeito do EEDF sobre lesões gástricas induzidas por ácido acético

A lesão gástrica induzida pelo ácido acético produziu uma média de área lesada no grupo veículo de $(9,42 \pm 1,23)$. Entretanto, o omeprazol (30 mg/Kg, v.o.), foi capaz de reduzir significativamente a área de lesão em 74,44% ($2,04 \pm 0,69$) quando comparado ao grupo veículo. Da mesma forma, o tratamento com o EEDF na dose de 100 mg/Kg v.o., reduziu a área de lesão gástrica de 50,76% ($4,05 \pm 1,20$) (Figura 17, Apêndice B, Tabela 25). Os parâmetros avaliados de evolução de massa corpórea, consumo de ração e água durante todo o período (14 dias), não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos tratados (Figuras 18, 19, e 20).

Estudos realizados por Okabe e Pfeiffer (1972), demonstraram que a aplicação de ácido acético na superfície serosa de estômagos em ratos resulta em úlceras muito semelhantes às observadas em humanos em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização. Além disso, esse modelo de úlcera gástrica envolve alterações nos níveis de prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico, citocinas e na quantidade de muco (KOBAYASHI *et al.*, 2001).

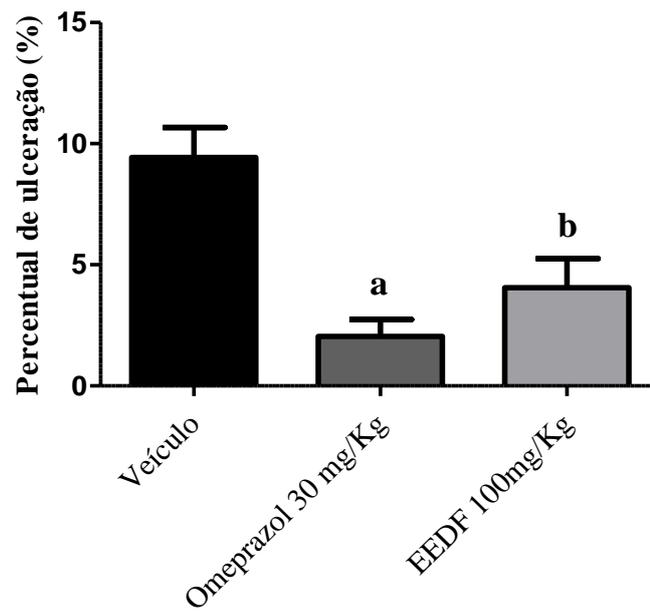


Figura 17 – Efeito do EEDF em lesões gástricas induzidas por ácido acético 30%. O gráfico representa o índice de lesão da mucosa gástrica induzida por ácido acético 30%, após 14 dias de tratamento com veículo (1% de *Tween* 80 em solução salina 0,9, v.o.), Omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) ou EEDF (100 mg/Kg, v.o.). Os valores representam a média \pm E.P.M. da percentagem de área gástrica ulcerada (n=6 animais por grupo). ^a $p < 0,001$ vs controle veículo; ^b $p < 0,01$ vs controle veículo (ANOVA e Teste *Tukey*).

Figura 18 – Representação da evolução de massa corpórea dos animais tratados durante o período de 14 dias (ANOVA e Teste *Bonferroni*).

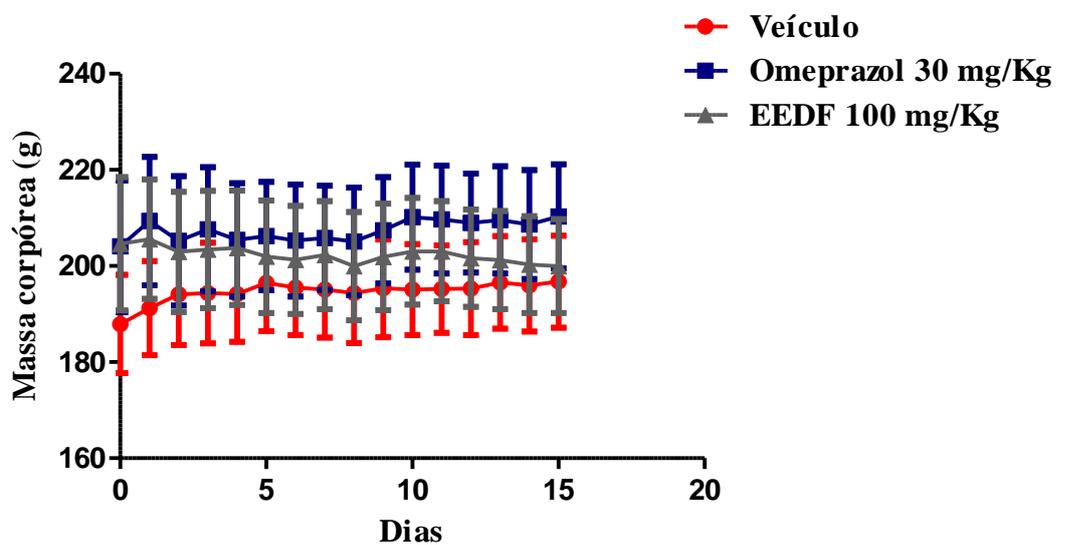


Figura 19 – Representação do consumo de ração dos animais tratados durante o período de 14 dias (ANOVA e Teste *Bonferroni*).

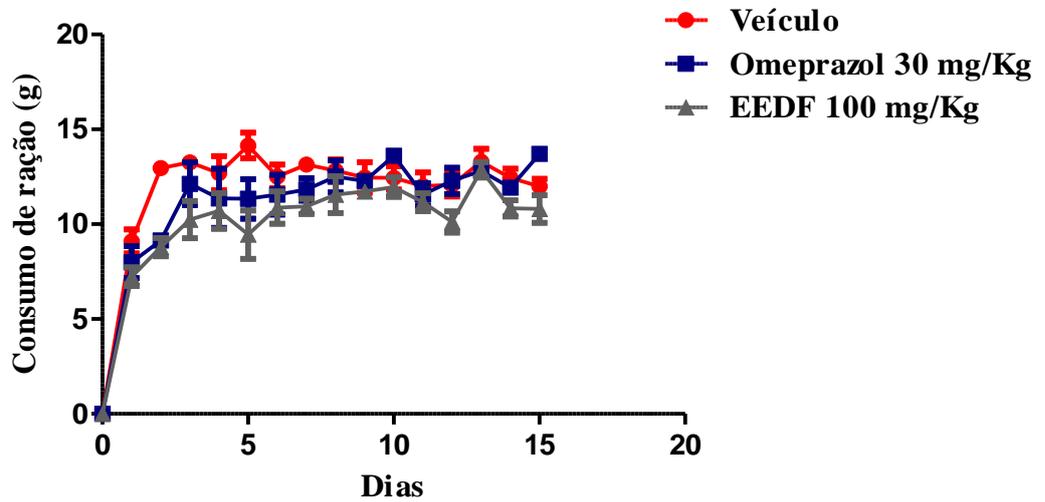
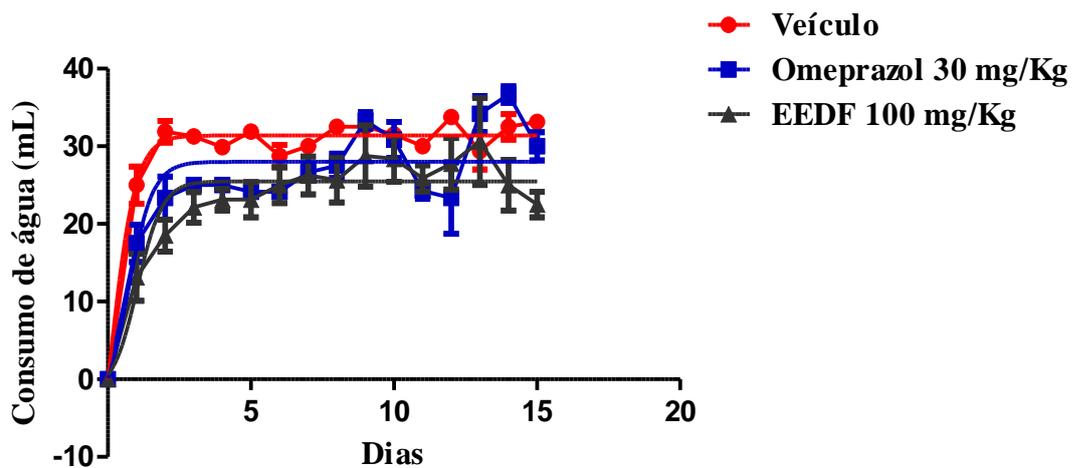


Figura 20 – Representação do consumo de água dos animais tratados durante o período de 14 dias (ANOVA e Teste *Bonferroni*).



Deve-se ressaltar que a cicatrização da úlcera é um processo complexo que envolve a migração e proliferação celular, replicação de células epiteliais junto à margem da úlcera para restabelecer a arquitetura glandular e angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera (TARNASWSKI, 2005). Portanto, a cura da úlcera se torna um processo complexo que envolve a migração e proliferação de células epiteliais e inflamatórias, envolve a síntese e degradação de moléculas da matriz extracelular e componentes de tecido conectivo, além da síntese de fatores de crescimento e citocinas que, juntos fazem da cicatrização um processo bem ordenado (TARNASWSKI *et al.*, 1995).

Os resultados apresentados nesse estudo demonstram que o tratamento dos animais por 14 dias com omeprazol (30 mg/Kg) reduziu significativamente a úlcera gástrica induzida por ácido acético. De modo semelhante, o tratamento com o EEDF (100 mg/Kg) também protegeu de maneira significativa a mucosa gástrica das lesões causadas pelo ácido acético. Diversos estudos já demonstraram que o omeprazol acelera a cicatrização de úlceras gástricas (induzidas por ácido acético) e duodenais (OLSEN, *et al.*, 1988; TAKEUCHI, *et al.* 1999). A melhora na cicatrização de úlceras gástricas promovido pela droga omeprazol, deve-se basicamente, à supressão da secreção do ácido gástrico. No entanto, os mecanismos de cicatrização do tecido envolvem múltiplas etapas como a formação do tecido de granulação, contração do tecido ulcerado e re-epitelização, sendo provável que esses inibidores da bomba de prótons promovam a cicatrização ao afetarem uma dessas etapas, além de inibir a produção de ácido (TAKEUCHI, *et al.* 1999).

O entendimento dos mecanismos que levam a formação das lesões gástricas crônicas ainda é pouco compreendido e existem poucas informações com relação ao processo inflamatório e formação de ROS no desenvolvimento e restabelecimento deste tipo de lesão (POTRICH, 2009). No presente estudo, os resultados demonstram que o tratamento por via oral com o extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* promoveu a melhora da úlcera gástrica crônica induzida por ácido acético, sugerindo que o efeito protetor do EEDF pode estar relacionado, em parte a atividade antioxidante atribuída aos flavonóides presentes em sua constituição química.

Na avaliação de ganho ou perda de massa corpórea, e consumo de ração e água dos animais, os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados durante o período de 14 dias.

5.3 Atividade antibacteriana

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na avaliação da concentração inibitória mínima do EEDF, foram testados o extrato bruto etanólico e suas frações: hexânica, acetato de etila e metanólica. Os resultados apresentados da CIM para todas as amostras foram $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, valor este que não demonstra relevância clínica.

5.3.2 Avaliação da atividade moduladora

As Tabelas 14 e 15 demonstram atividade moduladora sinérgica ou antagônica aos antibióticos Canamicina, Amicacina, Neomicina ou Gentamicina em associação ao extrato bruto etanólico e as frações já citadas anteriormente. Os microrganismos testados foram as linhagens bacterianas multirresistentes de *Escherichia coli* (27) e *Staphylococcus aureus* (358).

Frente à bactéria multirresistente *E. coli* (27), as frações acetato de etila e metanólica demonstraram sinergismo quando associadas ao antibiótico Canamicina, havendo uma redução da CIM para $625 \mu\text{g/mL}$. Na associação da Amicacina com as frações hexânica e acetato de etila observou-se uma redução da CIM para $78,12$ e $312,5 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para a Neomicina, tanto o extrato bruto quanto as frações hexânica e metanólica promoveram diminuição da CIM em $156,25 \mu\text{g/mL}$. Já o antibiótico Gentamicina provocou antagonismo quando associado a todas as amostras testadas (Tabela 14).

Tabela 14 – Atividade moduladora de *Duguetia furfuracea* frente à bactéria *E. coli* (27) com: extrato bruto etanólico, fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica.

<i>E. coli</i> 27	+EEDF	+FH	+FAE	+FM	Controle
Canamicina	2.500	2.500	625	625	2.500
Amicacina	1.250	78,12	312,5	2.500	>2.500
Neomicina	156,25	156,25	312,5	156,25	625
Gentamicina	1.250	625	312,5	1.250	19,53

EEDF: Extrato Etanólico de *Duguetia furfuracea*; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FM: Fração Metanólica.

Em relação à bactéria multirresistente *S. aureus* (358), o extrato bruto etanólico quando associado com o antibiótico Canamicina, obteve uma redução da CIM de 78,12 µg/mL. Já a Amicacina quando combinada com o extrato bruto etanólico e com as frações hexânica e metanólica promoveram uma redução da CIM em 156,25 µg/mL. O extrato bruto etanólico em associação a Gentamicina, apresentou sinergismo reduzindo a CIM do antibiótico para 2,44 µg/mL (Tabela 15).

Tabela 15 – Atividade moduladora de *Duguetia furfuracea* frente à bactéria *S. aureus* (358) com: extrato bruto etanólico, fração hexânica, fração acetato de etila e fração metanólica.

<i>S. aureus</i> 358	+EEDF	+FH	+FAE	+FM	Controle
Canamicina	78,12	312,5	312,5	312,5	312,5
Amicacina	156,25	156,25	625	156,25	625
Neomicina	312,5	312,5	312,5	312,5	312,5
Gentamicina	2,44	19,53	19,53	19,53	19,53

EEDF: Extrato Etanólico de *Duguetia furfuracea*; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FM: Fração Metanólica.

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de diferentes patologias, destacando-se as infecciosas, tem sido extensivamente utilizada pelo homem, mesmo não apresentando comprovação científica (VERDI *et al.*, 2005). Nota-se que por outro lado, a grande incidência de infecções, principalmente aquelas causadas em indivíduos imunocomprometidos, justifica a realização de estudos científicos para a descoberta de novos compostos terapêuticos de origem vegetal (MITSCHER *et al.*, 1987; CARRICONDE *et al.*, 1996).

Os compostos naturais, seja de origem vegetal e animal podem causar alteração do efeito de antibióticos, seja potencializando ou antagonizando a atividade antibiótica (COUTINHO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados deste estudo pode-se perceber que tanto o extrato quanto as frações atuaram de maneira sinérgica quando associadas aos aminoglicosídeos, mostrando assim efeito potencializador (sinergismo) e favorecendo uma atividade antibacteriana aos mesmos. Também foi observado um efeito antagônico dos produtos naturais em associação com o aminoglicosídeo Gentamicina frente a *E. coli* (27). Esse mesmo efeito também foi observado nos estudos realizados por Veras *et al.*, (2011), os quais relataram um aumento considerável na CIM entre produtos naturais e aminoglicosídeos.

Segundo Granowitz e Brown (2008), os efeitos antagônicos do uso combinado de antibióticos podem ser atribuídos a quelação mútua. Behling *et al.*, (2004), atribuíram a atividade antioxidante dos flavonóides, às suas propriedades quelantes. Este efeito possivelmente explica a redução na atividade dos antibióticos aminoglicosídeo na presença do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea*, que demonstrou a presença de flavonóides através da prospecção fitoquímica realizada.

Os resultados observados na espécie confirmam com os encontrados por Bento (2010), onde o extrato das folhas de *Annona muricata* demonstrou efeito potencializador frente às mesmas cepas testadas, sendo espécies pertencentes à mesma família. Sugere-se que o efeito sinérgico apresentado pelo o extrato e as frações pode ser devido à presença de compostos que apresentam atividade antibacteriana como flavonóides e taninos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

- ✓ A prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas da espécie *Duguetia furfuracea* (EEDF) identificou a presença de taninos condensados, chalconas, auronas, catequinas, flavononas e alcalóides;
- ✓ O EEDF demonstrou atividade antiulcerogênica em modelos clássicos de úlcera aguda (etanol_{abs}, indometacina e etanol acidificado);
- ✓ O estudo do mecanismo antiulcerogênico o EEDF indicou um possível envolvimento do óxido nítrico (NO) e dos receptores noradrenérgicos α_2 no seu efeito gastroprotetor;
- ✓ Não foi observado efeito do EEDF sobre a motilidade gastrointestinal, sugerindo que o EEDF é desprovido de efeito anticolinérgico;
- ✓ O EEDF demonstrou atividade cicatrizante das lesões ulcerativas no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético;
- ✓ Tanto o EEDF quanto as frações (hexânica, acetato de etila e metanólica) não apresentaram atividade antibacteriana do ponto de vista clínico, com valores de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$;
- ✓ No teste de modulação da atividade de antibióticos aminoglicosídeos, o EEDF e as frações demonstraram um efeito sinérgico quando associadas aos antibióticos Canamicina, Amicacina, Neomicina e Gentamicina frente às bactérias multirresistentes *Escherichia coli* (27) e *Staphylococcus aureus* (358);
- ✓ Os resultados obtidos nesse estudo fornecem evidências para uma futura utilização terapêutica de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) como ferramenta medicamentosa.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, E. O.; BASTAKI, S. A.; CHANDRANATH, I. S.; HASAN, M.; FAHIM, M.; ADEM, A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n.27, p. 4154-4160, 2005.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AKTAR, M. S.; MUNIR, M. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanum nigrum*, *Brassica oleraceae* and *Ocimum basilicum* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, p. 163-176, 1989.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress, **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA, C. F. **Etnobotânica nordestina: estratégia de vida e composição química como preditores do uso de plantas medicinais por comunidades locais na Caatinga**. Dissertação (Mestrado – área de concentração em etnobotânica) – Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 66, 2004.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, EMBRAPA-CPAC, 1998.
- ALQASOUMI, S.; AL-SOHAIBANI, M.; AL-HOWIRINY, T.; AL-YAHYA, M.; RAFATULLAH, S. Rocket “*Eruca sativa*”: A salad herb with potential gastric antiulcer activity. **World Journal Gastroenterology**, v. 15, n. 16, p. 1958-1965, 2009.
- AOI, M.; AIHARA, E.; NAKASHIMA, M.; TAKEUCHI, K. Participation of prostaglandin receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **American Journal of Physiology**, v. 287, p. 96-103, 2004.
- ARAÚJO, K. P. C.; BLAZQUEZI F. J. H. Anatomia microvascular do estômago canino e lesão gástrica provocada por antiinflamatórios não esteróides. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 14-18, 2007.
- ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F. M. New windows on the mechanism of action of K ATP channel openers. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 11, p. 439-445, 2000.
- AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Update**, v. 4, p. 106-117, 2001.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, p. 443, 1999.

BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B.; PIETRO, M. L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; BRITO, B. A. R. S. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, p. 584-590, 2006.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C., ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, M.L.P.. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentary Nutrition**, v. 15, p. 285-292, 2004.

BENTO, E. B. **Bioprospecção Farmacológica de Plantas Medicinais Cultivadas no Nordeste do Brasil: Avaliação do Efeito Citoprotetor e Antimicrobiano da *Annona muricata* Linnaeus (Graviola)**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular), Universidade Regional do Cariri, Crato, 2010.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERTGES, L. C.; BARRETO, B. B.; RESENDE, J. A.; MAGALHÃES, J. C.; ALMEIDA, T. V. **Efeito do suco de limão na prevenção das lesões gástricas induzidas pelo Diclofenaco Sódico** In: Resumos - XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica – UFJF. Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas - Walter Machado Couto, 2006.

BIVATTI, M. W.; LEITE, S. N. **Práticas de Farmacognosia**. 1ª reimpressão: UNIVALI, Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

BONTEMPO, M. **Medicina natural**. São Paulo: Nova Cultural, p. 584, 1994.

BRITO, H. O.; NORONHA, E. P.; FRANÇA, L. M.; BRITO, L. M. O.; PRADO, M. S. A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89 (3), p. 180-184, 2008.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. United States of America: McGraw-Hill Companies, Inc., 2006.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos, 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, D. A. **Efeito Gastroprotetor da 3,6 – dimetoxi – 6”, 6” – dimetil – [2”, 3”]: 7,8] – cromenoflavona Isolada de *Lonchocarpus araripensis* Bentham em camundongos e Possíveis Mecanismos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; SIQUEIRA, J. M. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuraea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 647-649, 2005.

CAROLLO, C. A.; HELLMANN-CAROLLO, A. R.; SIQUEIRA, J. M.; ALBUQUERQUE, S. Alkaloids and a flavonoids from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea* - Annonaceae. **Journal of Chilean Chemical Society**, v. 51, p. 837-841. 2006.

CARRICONDE, C.; MORES, D.; VON FRITSCHEN, M.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Plantas medicinais e alimentícias. **Centro Nordestino de Medicina Popular**, Olinda, p. 45-47, 1996.

CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Studies in Aporphine Alkaloids I. Alkaloids of a Brazilian *Duguetia*. **Farmacology Edition. Sciences**, v. 25, p. 442-443, 1970.

CASEY, P. J.; GILMAN, A. G. G protein involvement in receptor-effector coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 2577-2580, 1988.

CHAN, F. L.; LEUNG, W. K. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 360, p. 933-941, 2002.

CHANG, E. B.; FEDORAK, R. N.; FIELD, M. Experimental diabetic diarrhea in rats: intestinal mucosal denervation hypersensitivity and treatment with clonidine. **Gastroenterology**, v.91, p. 564-569, 1986.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (Soursop Family). In: **Flowering Plants of Neotropics**, SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. (eds.). Botanical Garden, New York. p. 18-20, 2004.

CHEN, C.Y.; ASAKAWA, A.; FUJIMIYA, M.; LEE, S.D.; INUI, A. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. **Pharmacology Reviews**, v. 61(4), p. 430-81, 2009.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology**. v. 95, p. 253-256, 2001.

CHUNG, K. T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and lated compounds on the growth of intestinal bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 1053-1060, 1998.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6, 2003.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.141-152, 2001.

CORRÊA, A. D., BATISTA, R. S., QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 5 ed. Petrópolis, RJ: Vozes, p. 247, 2002.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Produção de plantas medicinais, condimentares e aromáticas no Estado do Paraná. In: CORREA, J. R. C.; GRAÇA, L. R.; SCHEFFER, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v. 6, 2 ed., Rio de Janeiro, Imprensa nacional, 1978.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

DANGELO, J.G; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DE BRUYNE, T.; PIETRERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemistry and Systematic Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIN, O. S.; KAKINAMI, S. H. Medicinal plants populary used in Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DJAHANGUIRI, B.; SCAND, J. **Gastroenterology**, v. 4 (3), p. 265-257, 1969.

DONG, M. H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal Mucosal Defense. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 22, pg.599-606, 2006.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 404-421, 2001.

DUFRESNE, M.; SEVA, C.; FOURMY, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 805-847, 2006.

ENCICLOPÉDIA MULTIMÍDIA DO CORPO HUMANO. Planeta DeAgostini, 6 CDROM., 2000.

ESTEVAM, C. S.; CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, E. V. F; ARAÚJO NETO, V.; LEOPOLDO, P. T. G; FERNANDES, R. P. M.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z.; SANT'ANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 299-303, 2009.

EVANS, D. Gastric emptying and adynamic ileus. **Equine Veterinary Journal**, New Market, v. 30, n. 4, p. 278-279, 1998.

FAGUNDES, F. A; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C; VALADARES, M. C; *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.24-29, 2005.

FECHINE, I. M.; NAVARRO, V. R.; DA CUNHA, E. V. L. SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 267-269, 2002.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; DA CUNHA, E. V. L. SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; BARBOSA FILHO, J. M. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 17-19, 2002.

GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Plantas consideradas medicinais ocorrentes na Reserva Biológica Municipal do Poço Bonito, Município de Lavras, Minas Gerais. **Daphne**, v. 8, n. 2, p. 57-68, 1998.

GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C.; Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.

GOTTSBERGE, I. S. **O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas.** In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Oréades. n. 14-15, p. 15-30. 1987.

GRANOWITZ, E.V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, v. 24, p. 421-442, 2008.

GYIRES, K.; MULLNER, K.; FURST, S.; RONAI, A.Z. Alpha-2 adrenergic and opioid receptor-mediated gastroprotection. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 94, p.117-121, 2000.

GYIRES, K.; MULLNER, K.; RONAI, A.Z. Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defense in the rat. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 95 (1-6), p. 189-196, 2001.

HANSEN, M. B. Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. **Physiological Research**, v. 52, p. 1-30, 2003.

HATA N, MURATA S, MAEDA J, YATANI H, KOHNO Y, YOKONO K, OKANO H. Predictors of gastric myoelectrical activity in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 43(5), p. 429-36, 2009.

HAWKEY, C. J.; KARRASCH, J. A.; SZCZEPAŃSKI, L.; WALKER, D. G.; BARKUN A.; SWANNELL, A. J.; YEOMANS, N. D. Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Omeprazole versus misoprostol for NSAID-induced ulcer management (OMNIUM) study group. **New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 727-734, 1998

HAYASHI, Y.; MAZE, M. Alpha-2 adrenoceptor agonists and anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 71, p. 108-118, 1993.

HIRUMA-LIMA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406-409, 2009.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-biological Interactions**, v.139, n.1, p.1-21, 2002.

HOFFMAN, B. B.; LEFKOWITZ, R. J. Catecholamines, Sympathomimetic Drugs, and Adrenergic Receptor Antagonists. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9 ed. New York: Mac Millan., p. 199-248, 1996.

HOLZER, P. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 16, p. 469-478, 2000.

HORN, J. The Proton-Pump Inhibitors: Similarities and Differences. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 3, 2000.

JAHANGIR, A.; TERZIC, A.; SHEN, W. Potassium channel openers: therapeutic potential in cardiology and medicine. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 2, n. 12, p. 1995-2010, 2001.

JAVADPOUR, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.3107-3113, 1996.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal Organic Chemistry**, v. 47, p. 3151-3153, 1982.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 93-100, 2004.

KANDIL, T.S.; MOUSA, A.A.; EL-GENDY, A.A.; ABBAS, A.M. The potential therapeutic effect of melatonin in Gastro-Esophageal Reflux Disease. **BMC Gastroenterology**, v. 10, p. 7, 2010.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: Básica e Clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review ingastrointestinal injury and protection. **Journal Gastrointestinal Hepatology**, v. 15, 2000.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M. A. K. Transforming growth factor-directly augements histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat entochromaffin-like cells. **American Journal Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, p. 508-514, 2004.

KOBAYASHI T, OHTA Y, YOSHINO J, NAKAZAWA S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 23-30, 2001.

KONTUREK, P. C.; BROZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J.; TAUT, A.; KWEICIEN, S.; PADJO, R.; SLIWOWSKI, Z.; HAHN, E. G. Bacterial lipopolysaccharide protects gastric mucosa against acute injury in rats by activation of genes for cyclooxygenases and endogenous prostaglandins. **Digestion**, v. 59, p. 284-297, 1998.

KONTUREK P. C. H.; BROZOWSKI, T.; MEIXNER, H.; PTAK, A.; HAHN, E. G.; KONTUREK, S. J. Central and peripheral neural aspects of gastroprotective and ulcer healing effects of lipopolysaccharides. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 52, p. 611-623, 2001.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H⁺ and duodenal HCO₃⁻ secretion: the role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, p. 15-27, 2004.

KWIECIÉN, S.; BRZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C. H.; KONTUREK, S. J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 761-773, 2002.

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

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

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, p.2-4, 2008.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole, 2008.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783, 1982.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 300-306. 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 512, 2002.

LU, H.; GRAHAM, D. Y. New development in the mechanistic understanding of peptic ulcer diseases. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 3, p. 431-437, 2006.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-Eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 65-98. 2001.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVEIRA, J. Essential Oil Composition from *Duguetia* Species (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 60-63, 2006.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 329–338, 2003.

MANN, C. M.; MARKHAN, J. L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essencial oils. **Journal of applied microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MAROTTA, F.; TAJIRI, H.; SAFRAN, P.; FESCE, E.; IDEO, G. Ethanol related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. **Digestion**, v. 60, p. 538-543, 1999.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFG, p. 220, 2000.

MASUDA, E.; KAWANOP, S.; NAGAN, K.; TSUJI, S.; TAKEI, Y.; TSUJI, M.; OSHITA, M.; MICHIDA, T.; KOBAYASHI, I.; NAKAMA, A.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T. Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Gastroenterology**, v. 108, p. 58-64, 1995.

MATIAS, E. F. F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* (velame), *Ocimum gratissimum* (alfavaca) e *Cordia verbenaceae* (erva-baleeira)**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular), Universidade Regional do Cariri, Crato, 2010.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Pharmacology Letters**, v. 65, n. 2, p. 27-32, 1999.

MATTOS, L. A. J. Hábitos alimentares. **Revista prática hospitalar**, Rio de Janeiro, n. 19, p. 61-62, 2002.

MATU, N. E.; VAN STADEN, J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p. 35-41, 2003.

MAYER, B. **Mecanismos envolvidos nas ações antiúlcera e anti-secretora ácida dos extratos da *Salvia officinalis* L.** Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MCQUAID, K.R. Fármacos utilizados no tratamento de doenças gastrintestinais. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 865-891, 2005.

MELO, P.U.; PALHARES, M.S.; FERREIRA, C. Adynamic ileus in horses: pathophysiology and treatment. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 49-58, 2007.

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

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MITSCHER, L. A.; DRANKE, S.; GOLLOPUDI, S. R.; OKWUTE, S. K. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 1025-1040, 1987.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. **Japanese Journal Pharmacology**, v. 44, p. 43-50, 1987.

MOELLERING Jr., R. C. **Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Práctice. Euromédice. Ed. Médicas. 2000.**

MÖSSNER J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal Clinical Investigation**, v.35, n.8, p.469-75, 2005.

MOURE, A.; CRUZ, J. M; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINERO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial, Citotoxic, and Antifungal Alkaloids from *Duguetia hadrantha*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 5, p. 559-562, 2001.

NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 675-678, 1999.

NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A. D.; ASSUNÇÃO, A. C. S.; PIMENTA, L. P. S. Annonaceous acetogenins from leaves of *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v. 26, n.3, p.319-322, 2003.

NAHAVANDI, A.; DEHPUR, A. R.; MANI, A. R.; HOMAYOUNFAR, H.; ABDOLI, A. NG-nitro-L-arginine methylester is protective against ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 370, p. 283-286, 1999.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5 ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.

OKABE, S.; PFEIFFER, C. J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **American Journal of Physiology**, v. 17, p. 619 – 629, 1972.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W. IZUMATANI, A.; SOUBE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HADAMA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 27, p. 124-129, 2006.

OLSEN, P.S.; THERKELSEN, K.; POULSEN, S.S. Effect of Omeprazole and Cimetidine on Healing of Chronic Gastric Ulcers and Gastric Acid Secretion in Rats. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 155, p. 305 – 310, 1988.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PAN, J. S.; HE, S. Z.; XU, H. Z.; ZHAN, X. J.; YANG, X. N.; XIAO, H. M.; SHI, H. X.; REN, J. L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 5857-5867, 2008.

PEREIRA, N. F. G.; CAROLLO, C. A.; GARCEZ, W. S.; SIQUEIRA, J. M. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 512-516, 2003.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora paraibana: Annonaceas Juss. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.

POTRICH, F. B. **Atividade Gastroprotetora do Extrato Bruto Hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.: Envolvimento do Sistema Antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA-SPI, p. 320, 1994.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A.P. **Flores e frutos do cerrado – guia de campo ilustrado-baseado na flórua da reserva particular do patrimônio natural “Linda Serra dos Topázios” Cristalina-Goiás-Brasil**. Brasília: Ed. UnB: São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, p. 226, 2000.

QUINN, K. J.; SMITH, A. G.; CAMMARANO, C. M. Convergent total synthesis of squamostolide. **Tetrahedron**, v. 63, p. 4881-4886, 2007.

RAGHUNATH, A. S.; O'MORAIN, C.; MCLOUGHLIN, R. C. Review article: the long-term use of proton-pump inhibitors. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, n. 22, p. 55-63, 2005.

RAHGOZAR, M.; PAZOKITOROUDI, H.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Diazoxide, a K (ATP) opener, accelerates restitution of ethanol or indomethacin-induced gastric ulceration in rats independent of polyamines. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 3, p. 290-296, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora. Tradução da 5 ed. americana, 2004.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v.77, p.433-443, 1979.

ROBERTS, I. I. L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. New York: McGraw-Hill, p. 687-731, 2001.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Role of Endogenous Nitric Oxide and Prostaglandin in Duodenal Bicarbonate Response Induced by Mucosal Acidification in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 6, p. 1208-1216, 2001.

RODRIGUES, P. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; AGUIAR, L. A.; NUNESPINHEIRO, D. C. S. Atividade antioxidante e gastroprotetora de produtos naturais em animais experimentais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 116-123, 2008.

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1052-1055, 2009.

SAKAI, K.; AKIMA, M.; KATSUYAMA, I. Effects of Nicorandil on Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rats: A Possible Role of KATP Channels. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 51-57, 1999.

SANGALLI, A. **Levantamento e caracterização de plantas nativas com propriedades medicinais em fragmentos de florestas e de cerrado de Dourados-MS, numa visão etnobotânica**. Monografia (Licenciatura Plena) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Mao Grosso do Sul, Dourados, p. 70, 2000.

SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; KLEIN JUNIOR, L. C.; NIERO, R.; FALONI, S. A. Antiulcer effects of *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 334-339, 2010.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SASAKI, N.; YAMADA, H.; HARA, S. Medicinal treatment to equine gastrointestinal dysfunction. **Journal Equine Science**, Toquio, v. 14, n. 2, p. 37-49, 2003.

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

SCHUBERT, M.L.; SHAMBUREK, R.D. Control of acid secretion. **Gastroenterology Clinical of North of the American**, v. 19, p. 1-25, 1990.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SEAGER, J. M.; HAWKEY, C. J. Indigestion and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Medical Association**, v. 323, p. 1236-1239, 2001.

SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. D.; BODLA, R. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 171-175, 2004.

SIKIRIC, P.; MAROVIC, A.; MATOZ, W.; ANIC, T.; BULJAT, G.; MIKUS, D.; STANCIC-ROKOTOV, D.; SEPAROVIC, J.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z.; RUCMAN, R.; PETEK, M.; ZIGER, T.; SEBECIC, B.; ZORICIC, I.; TURKOVIC, B.; ARALICA, G.; PEROVIC, D.; DUPLANCIC, B.; LOCRIC-BENCIC, M.; ROTKVIC, I.; MISE, S.; JAGIC, V.; HAHN, V. A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Journal of Physiology**, v. 93, n. 6, p. 505-512, 1999.

SILVA, S. R. **Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília: Fundação Pró-Natureza-FUNATRA, p. 109, 1998.

SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 475-479 , 2006.

SILVA, D. B. **Estudo fitoquímico e a avaliação alelopática das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. F. – Annonaceae.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

SILVA, M. S.; SIANI, A. C.; PIZARRO, A. P. B.; BITTENCOURT, F. S. N.; RIBEIRO, I. Q. C.; CASARA, J.; GUILHERMINO, J. F.; CALIXTO, J. B.; AUCELIO, J. G.; ANTONIOLLI, A. R.; BATISTA, J. S.; MOTA, C. N. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado de Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 815-829, 2006.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.** 2 ed. Barueri, SP: Manole, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6 ed. Porto Alegre: Ed-UFSC, 2007.

SINGH, S.; KHAJURIA, A.; TANEJA, S. C.; KHAJURIA, R. K.; SINGH, J.; JOHRI, R. K.; QAZI, G.N. The gastric ulcer protective effect of boswellic acids, a leukotriene inhibitor from *Boswellia serrata*, in rats. **Phytomedicine**, v. 15, p. 408-415, 2008.

SIQUEIRA, J. M., ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - annonaceae, Biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p. 9-13, 2007.

SONTAG, S. J.; SCHNELL, T.G.; BUDIMAN-MAK, E.; ADELMAN, K.; FLEISCHMANN, R.; COHEN, S.; ROTH, S.H.; IPE, D.; SCHWARTZ, K.E. Healing of NSAID-induced gastric ulcers with a synthetic prostaglandin analog (enprostil). **American Journal of Gastroenterology**, v. 89, p. 1014-1020, 1994.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, p. 640, 2005.

STURGES, C. P. Doenças do trato alimentar. In: DUNN, J. K. **Tratado de medicina interna de pequenos animais.** 1 ed. São Paulo: Roca, p. 367-443, 2001.

SUGAMOTO, S.; KAWAUCH, S.; FURUKAWA, O.; MIMAKI, H.; TAKEUCHI, K. Role of Endogenous Nitric Oxide and Prostaglandin in Duodenal Bicarbonate Response Induced by Mucosal Acidification in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 6, p. 1208-1216, 2001.

SZELENYI, I.; BRUNE, K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Disease Science**, v. 33, n. 07, p. 865-871, 1988.

TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 19, p.416-426, 1969.

TAKEUCHI, K.; KONAKA, A.; NISHIJIMA, M.; KATO, S.; YASUHIRO, T. Effects of pantoprazole, a novel H⁺/K⁺-ATPase inhibitor, on duodenal ulcerogenic and healing responses in rats: A comparative study with omeprazole and lansoprazole. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 14 p. 251 - 257, 1999.

TARNAWSKI, A.; TANQUE, K.; SANTOS, M. A.; SARFEH, I. J. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v.30, p.9-14, 1995.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FICHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; ANDRADE, F. D. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of four extracts from the barks wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

TORMO, J. R.; GALLARDO, T.; ARAGÓN, R.; CORTES, D.; ESTORNELL, E. Specific interaction of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial Complex I. **Chemico-Biological Interactions**, v. 122, p. 171-183, 1999.

TOROUDI, H.P.; RAHGOZAR, M.; BAKHTIARIAN, A.; DJAHANGUIRI, B. Potassium channel modulators and indometacin-induced gastric ulceration in rats. **Scandinavian Journal Gastroenterology**, v. 34, n. 10, p. 962-966, 1999.

TULASSAY, Z.; HERSZE'NYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 99-108, 2010.

UZUN, H.; SIMSEK, G.; AYDIN, S.; UNAL, E.; KARTER, Y.; YELMEN, N. K.; VEHID, S.; CURGUNLU, A.; KAYA, S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. **World Journal Gastroenterology**, v. 11 (4), p. 600-604, 2005.

VÁZQUEZ-RAMÍREZ, R.; OLGUÍN-MARTÍNEZ, M.; KUBLI-GARFIAS, C.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficusindica mucilage*. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 27, p. 4318-4324, 2006.

VERAS, H. N. H.; SANTOS, I. J. M.; SANTOS, A. C. B.; FERNANDES, C. N.; MATIAS, E. F. F.; LEITE, G. O.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin *in vitro*. **Current topics in nutraceutical research** v. 9, n. 1, p. 25-30, 2011.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

WALLACE, J.L.; MILLER, M.J. Nitric Oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1, p. 19-23, 2001.

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

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews October**, v. 88 (4), p. 1547-1565, 2008.

WALMSLEY, M. The structure and function of drug pumps. **Trends in microbiology**, v. 9, p. 71-79, 2001.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781, 2000.

WILLARD, M. D. Afecções do estômago. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4 ed. São Paulo: Manole, v. 2, p. 1583-1617, 1995.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, 2006.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 219-231, 2005.

ANEXO

ANEXO

ANEXO A – Documento de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA-UNIFOR).



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

PARECER N.º. 001/2011

Projeto de Pesquisa: Bioprospecção da atividade farmacognóstica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* A St.-Hil."

Pesquisador Responsável: Marta Regina Kerntopf

Data de apresentação ao CEUA: 18/04/11

Registro no CEUA: 11-002

Parecer: Aprovado Ad Referendum na data de 01/06/2011

Prof. Adriana Rolim Campos Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabelas de resultados sobre os testes antiulcerogênico com dados dos percentuais da área ulcerada e de redução de lesão gástrica.

Tabela 16 – Efeito do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	25,51 ± 3,14	-
Omeprazol 30 mg/Kg	4,45 ± 0,84 ^a	81,57
EEDF 100 mg/Kg	6,88 ± 2,08 ^a	68,72
EEDF 300 mg/Kg	1,06 ± 0,54 ^a	94,42

Valores expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 17 – Efeito do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (AINE).

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	7,42 ± 1,46	-
Omeprazol 30 mg/Kg	2,20 ± 0,69 ^a	67,57
EEDF 100 mg/Kg	2,85 ± 0,88 ^b	58,11
EEDF 300 mg/Kg	2,42 ± 0,97 ^a	61,94

Valores expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,05$ vs controle veículo (ANOVA *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 18 – Efeito do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	21,74 ± 2,52	-
Omeprazol 30 mg/Kg	5,52 ± 0,79 ^a	74,04
EEDF 100 mg/Kg	8,68 ± 1,85 ^a	56,64
EEDF 300 mg/Kg	7,15 ± 1,77 ^a	63,24

Valores expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,001$ vs controle veículo (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 19 – Envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	24,87 ± 4,13	-
EEDF 100 mg/Kg	5,44 ± 1,77 ^a	75,18
L-arginina 600 mg/Kg	0,21 ± 0,12 ^a	98,90
EEDF 100 mg/Kg + L-NAME (10 mg/Kg)	16,07 ± 4,68 ^b	-
L-arginina 600 mg/Kg + L-NAME (10 mg/Kg)	23,91 ± 2,57 ^c	-

Valores expressos em média ± E.P.M. ^ap<0,001 e p<0,05 vs controle veículo; ^bp<0,05 vs EEDF 100 mg/Kg; ^cp<0,001 vs L-arginina (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 20 – Envolvimento dos canais de K⁺-ATP-dependentes (K_{ATP}⁺) no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	14,72 ± 2,39	-
EEDF 100 mg/Kg	5,44 ± 1,77 ^a	57,90
DZO 3 mg/Kg	2,61 ± 1,51 ^a	75,91
EEDF 100 mg/Kg + GLIB. 5 mg/Kg	3,39 ± 1,81 ^a	69,60
DZO + GLIB. 5 mg/Kg	12,34 ± 2,11 ^c	-

Valores expressos em média ± E.P.M. ^ap<0,01 vs controle veículo; ^bp<0,01 vs DZO (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*). DZO: Diazóxido; GLIB.: Glibenclamida.

Tabela 21 – Envolvimento das prostaglandinas no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	4,59 ± 1,00	-
EEDF 100 mg/kg	1,16 ± 0,49 ^a	70,70
Misoprostol 0,016 mg/Kg	0,64 ± 0,33 ^b	65,24
EEDF 100 mg/Kg + INDO. (10 mg/Kg)	0,69 ± 0,27 ^b	82,80
Misoprostol 0,016 mg/Kg + INDO. (10 mg/Kg)	4,55 ± 0,70 ^c	-

Valores expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,01$ vs controle veículo; ^c $p < 0,001$ vs Misoprostol (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*). INDO.: Indometacina.

Tabela 22 – Envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	16,81 ± 2,86	-
EEDF 100 mg/Kg	5,32 ± 1,83 ^a	63,69
Clonidina 0,01 mg/Kg	5,02 ± 1,82 ^a	65,32
EEDF 100 mg/Kg + Ioimbina 2 mg/Kg	17,33 ± 1,82 ^b	2,65
Clonidina 0,01 mg/Kg + Ioimbina 2 mg/Kg	14,25 ± 1,82 ^c	-

Valores expressos em média ± E.P.M.). ^a $p < 0,01$ vs controle veículo; ^b $p < 0,01$ vs EEDF 100 mg/Kg; ^c $p < 0,01$ vs Clonidina (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 23 – Envolvimento dos receptores H₂ no efeito antiulcerogênico do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	15,11 ± 1,48	-
EEDF 100 mg/Kg	6,54 ± 1,50 ^a	51,51
Ranitidina 40 mg/Kg	0,54 ± 0,22 ^a	98,07
EEDF 100 mg/Kg + Histamina 3 mg/Kg	2,71 ± 0,39 ^a	95,42
Ranitidina 40 mg/Kg + Histamina 3 mg/Kg	18,41 ± 2,65 ^c	-

Valores expressos em média ± E.P.M.). ^a*p*<0,001 vs controle veículo; ^b*p*<0,001 vs Ranitidina 40 mg/Kg; (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 24 – Efeito do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre a motilidade intestinal.

Grupo	Distância percorrida pelo marcador (%)
Veículo	55,23±5,99
Atropina (0,01 mg/Kg)	37,41±5,51 ^a
EEDF 100 mg/Kg	53,13±2,47

A tabela mostra valores em percentagem de área gástrica ulcerada, expressos como média ± E.P.M. Valores expressos em média ± E.P.M. ^a*p*<0,05 vs controle veículo; (ANOVA e teste de *Student-Newman-Keuls*).

Tabela 25 – Efeito do extrato etanólico das folhas de *Duguetia furfuracea* (EEDF) sobre as lesões gástricas induzidas por ácido acético.

Grupo	Área ulcerada	Inibição (%)
Veículo	9,42 ± 1,23	-
Omeprazol 30 mg/Kg	2,04 ± 0,69 ^a	74,44
EEDF 100 mg/Kg	4,05 ± 1,20 ^b	50,76

A tabela mostra valores em percentagem de área gástrica ulcerada, expressos como média ± E.P.M. Valores expressos em média ± E.P.M. ^a*p*<0,001 vs controle veículo; ^b*p*<0,01 vs controle veículo (ANOVA e teste de *Tukey*).

APÊNDICE B – Figuras dos aspectos macroscópicos da mucosa gástrica dos estômagos e roedores.

Figura 21 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol_{abs}.

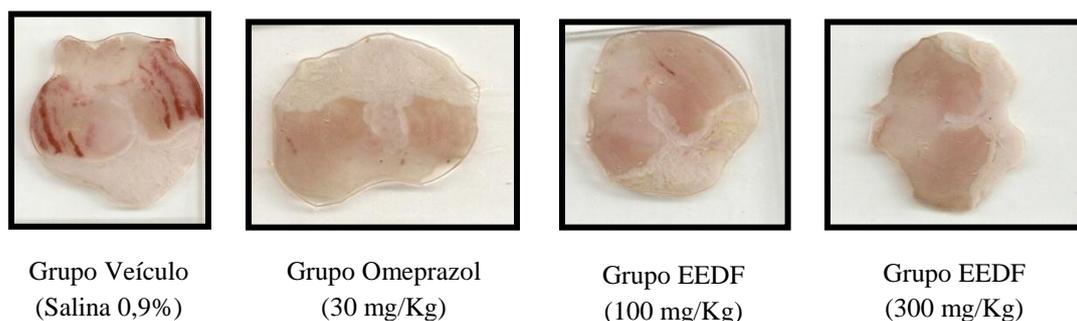


Figura 22 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por indometacina.

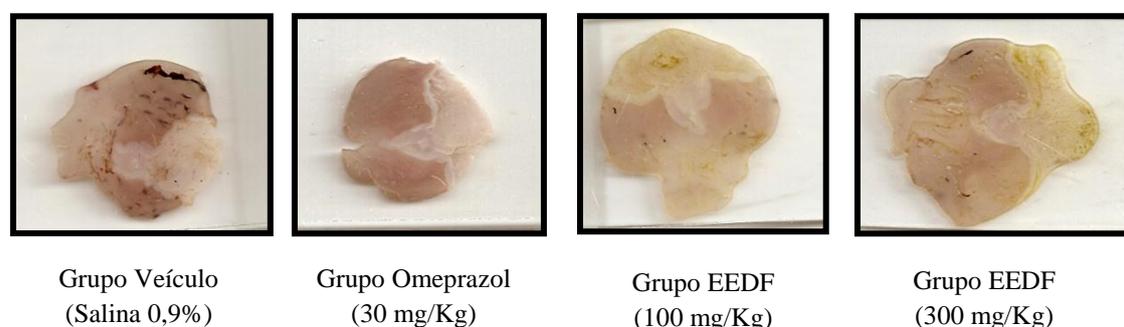


Figura 23 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado.

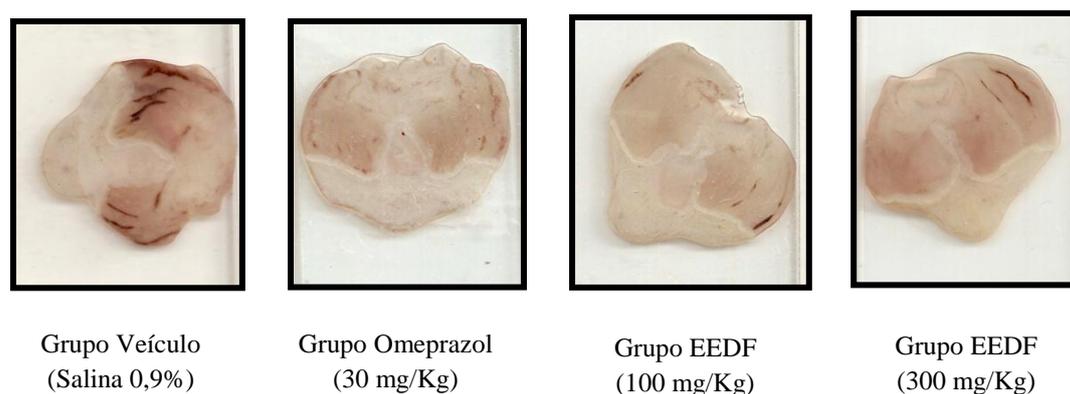


Figura 24 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento do óxido nítrico (NO).

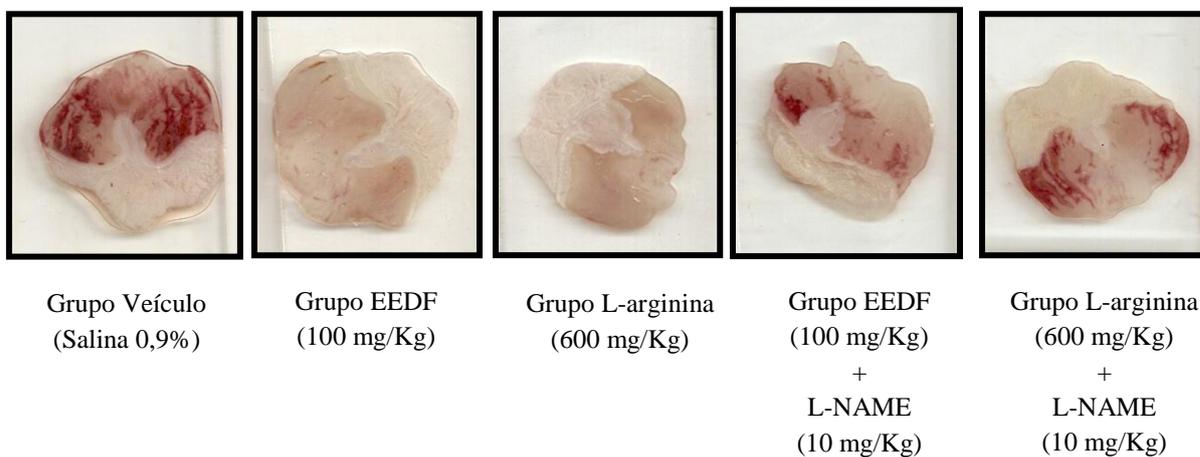


Figura 25 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento dos canais de K^+ -ATP-dependentes (K^+_{ATP}).

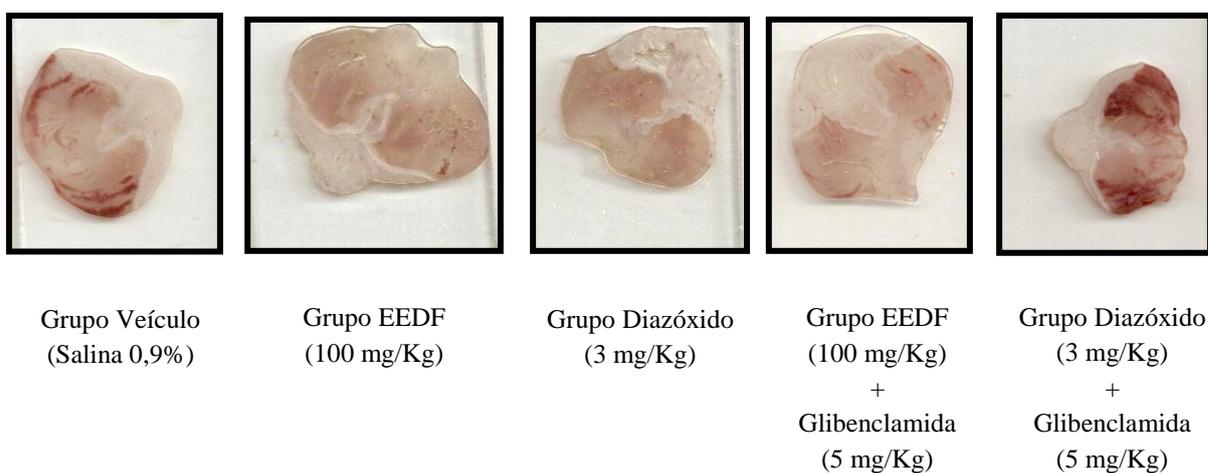


Figura 26 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento das prostaglandinas (PG's).

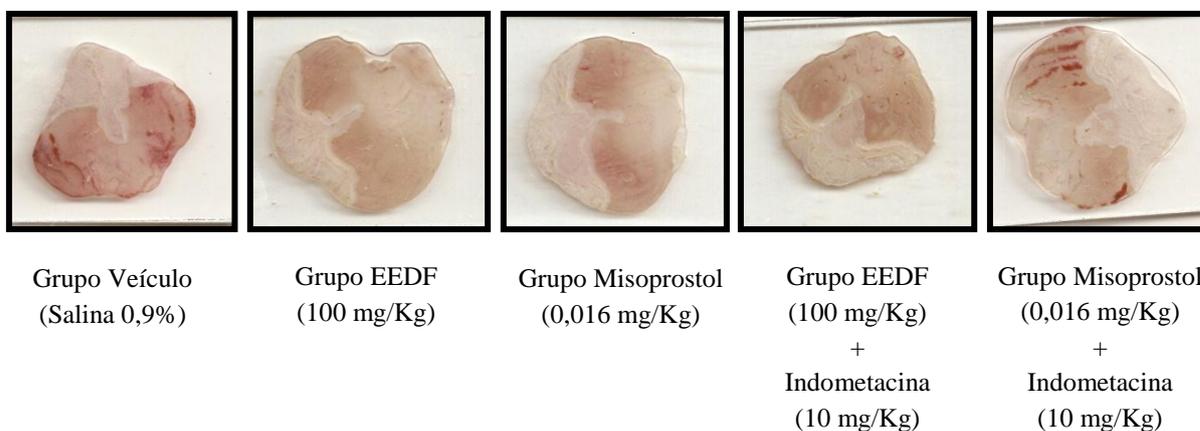


Figura 27 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores noradrenérgicos α_2 .

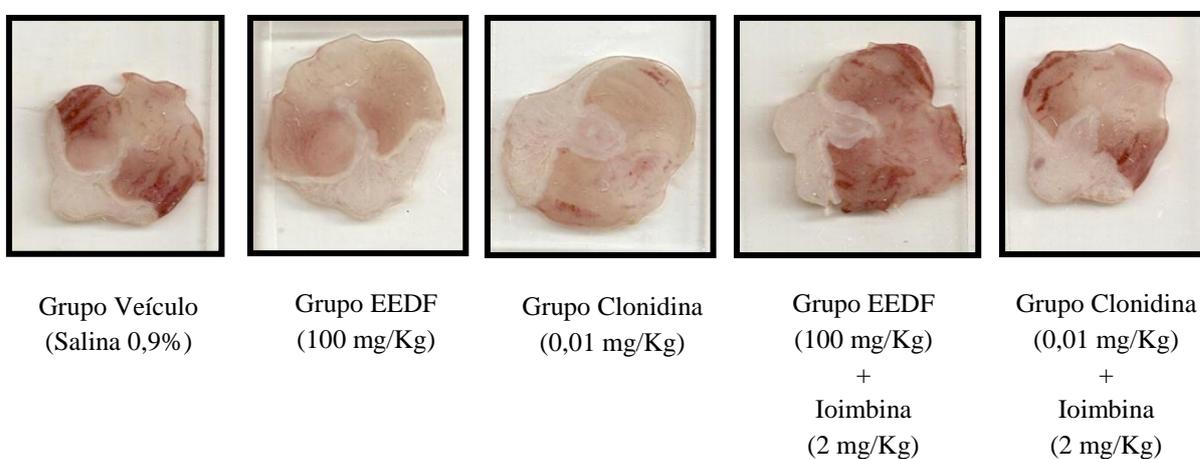


Figura 28 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores H₂.

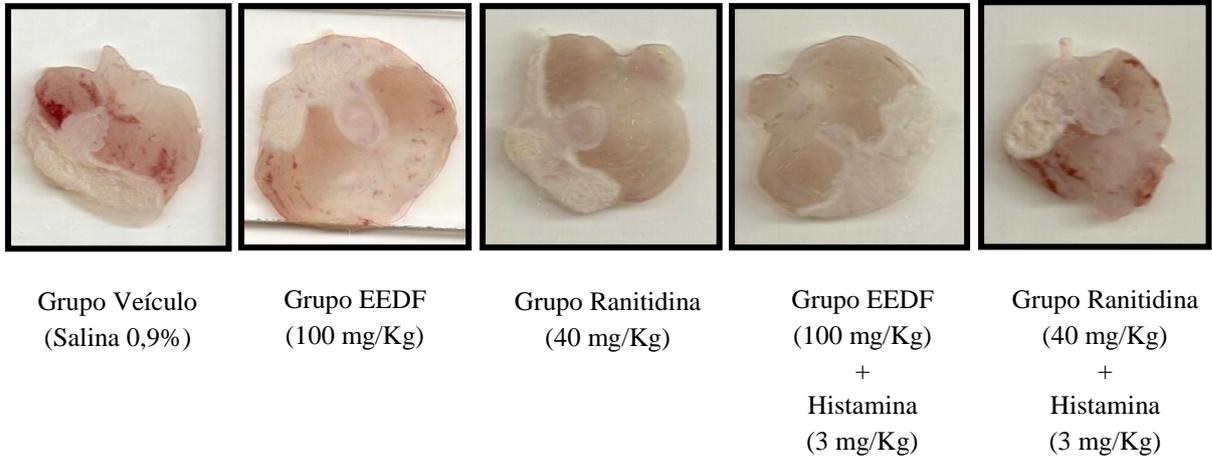


Figura 29 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelos de lesões gástricas induzidas por ácido acético 30%.

