



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona squamosa L.***

HELOÍSA HELENA FERREIRA DE SOUZA

CRATO, CE

2012

HELOÍSA HELENA FERREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona squamosa L.***

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.

Orientador: Prof^ª. Dra. Marta Regina Kerntopf

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

CRATO, CE

2012

S729a Souza, Heloísa Helena Ferreira de.

Avaliação das atividades biológicas *in vivo* e *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L.[manuscrito] / por Heloísa Helena Ferreira de Souza. – 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. *Annona squamosa*.. 2. Atividade antibacteriana. 3. Atividade gastroprotetora. I. Título.

CDD: 581.636

HELOÍSA HELENA FERREIRA DE SOUZA

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós – Graduação *Stricto sensu* 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.

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Annona squamosa L.***

BANCA EXAMINADORA

Profa. 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. José Galberto Martins da Costa (Avaliador interno)

Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe (Avaliador externo)

Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Suplente)

Universidade Regional do Cariri – URCA

A **Deus**, por permitir a realização deste trabalho

Aos meus pais José Valdo de Souza e Francisca Ferreira de Souza, pela dedicação e incentivo na condução da minha educação

A minhas irmãs Robéria e Valdelane, pelo amor e conselhos dados

Aos meus amores Sanne Anderson (esposo), e meu filho Heitor que vai chegar

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em especial a minha mãe, mulher digna de todo o meu amor e respeito. Juntas vencemos muitos desafios!

Ao meu pai, que me ensinou bons princípios, a importância da amizade e a escutar músicas antigas!

A minha irmã Robéria, “mãe intelectual”. Obrigada pelo primeiro livro que me deu (A República dos bichos), me incentivando a ler desde cedo;

A minha irmã Valdelane, “mãe de criação”. Obrigada por ajudar a criar uma irmã “caçula”;

A toda minha família: Junior (irmão); Josevânia (cunhada); Minhas afilhadas e sobrinhos: Gabriela, Carol, Lucas, Alice, Victor, Livia e Vivian; Vó (Vedi), tia (Luci) e primos. Amo vocês!

Ao meu marido Sanne, pelo amor, paciência e compreensão em todos os momentos. Te amo!

A família de meu marido que agora considero como minha também: Graça (sogra), Reginaldo (sogro), Ana Eliza (cunhada), Emanuel (cunhado), Goretthe (sogra-2), tias e tios (Núbia, Lúcia, Cosma, Zé Rubens, Maninho e os demais);

A Gizélia “mulher de força” por estar sempre disponível a ajudar. Obrigada!

As minhas grandes amigas: Luciana e Monize; Meu amigo Tião e sua família amável que tenho um imenso carinho;

Aos meus amigos de graduação: Luciene, Tânia, Pedro, Aninha, Emídia, Sara, Rafaela, (...);

A minha orientadora Profa. Marta Regina Kerntopf, pela orientação, apoio e sensibilidade em compreender minhas dificuldades. Meu carinho e reconhecimento;

Ao meu co- orientador Prof. Irwin Rose Alencar de Menezes, pela valorosa orientação na realização deste trabalho;

Aos colaboradores Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, Prof. Dr. Álamo Feitosa Saraiva, por todo apoio;

A Germana pela grande colaboração em nosso trabalho!

Ao meu amigo Rogério um grande conselheiro!

A Equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, em especial Flaviana, Katiúcia e Saulo pela ajuda nos testes e a grande amizade;

Ao Laboratório de Produtos Naturais, em especial a Fabíola, Fábio e Thiago (boinha).

Aos professores do programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular pelo conhecimento repassado ao longo da trajetória;

A equipe do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, pela grande parceria ao longo desses anos: Angélica, Daniele, Laura, Alaiane, Kelly, Renata, Luis, Walter, Natasha, Damiana e Barbosa. Em especial a Ana luiza, Anita, Luis Jardelino e Andreza.

A minha grande amiga Norma (irmã siamesa), pela grande parceria e bela amizade que tivemos ao longo de nossa caminhada como alunas de IC e de mestrado;

Aos meus amigos do mestrado: Mariana, Gerlânia, Samara, Helenicy, Flaviana, Teógenes, Renata, Morgana, Olga, Débora, Jaqueline, Katiúcia, Edinardo. Uma turma unida!

Aos Coordenadores do mestrado do programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida e o Prof. Dr. Allison Pontes Pinheiro;

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular Maria Lenira e Maria Anderciele pela gentileza em nos receber;

A todos os funcionários da URCA, em especial Sylvanna, Fernando, Gilmar e Marcos pela atenção;

A Universidade Regional do Cariri – URCA;

A Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ pelos animais cedidos para pesquisa;

A Funcap pelo suporte financeiro;

A CAPES pelo suporte financeiro;

“Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro.”

Chico Xavier

RESUMO

A *Annona squamosa* L. (Annonaceae), é conhecida como pinha, ata e fruta-do-conde, e possui atividades biológicas como: anti-helmíntica, hepatoprotetora, antiinflamatória, antidiabética e antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários e avaliar as atividades antibacteriana e gastroprotetora do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (EEAS) e frações. A caracterização das principais classes de metabólitos secundários (taninos, flavonóides e alcalóides) presentes no EEAS foi realizada através de prospecção fitoquímica. A avaliação da atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição, e a partir de concentrações subinibitórias (CIM 1/8) foi avaliada a atividade moduladora do EEAS associado a alguns aminoglicosídeos, frente às cepas bacterianas *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. A atividade gastroprotetora do EEAS nas doses de 100 e 300mg/Kg (v.o.), foi avaliada através dos modelos de lesão gástrica aguda induzida por etanol, etanol acidificado e indometacina. Para verificar os possíveis mecanismos envolvidos na proteção da mucosa gástrica contra erosões provocadas pelo etanol, foi avaliado o envolvimento do óxido nítrico endógeno, canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), prostaglandinas (PGs), receptores α -adrenérgicos, receptores histamínicos (H_2) e motilidade gastrointestinal. O modelo de úlcera gástrica crônica foi induzido por ácido acético 30%. O extrato bruto das folhas de *A. squamosa* e suas frações (hexânica, acetato de etila e metanólica) não apresentaram atividade antibacteriana clinicamente relevante, sendo que as concentrações inibitórias foram $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. No entanto, o extrato combinado com alguns aminoglicosídeos apresentou efeito sinérgico frente às linhagens multirresistentes de *E. coli* 27 e *S. aureus* 358. O EEAS nas doses de 100 e 300 mg/Kg (v.o.), demonstrou efeito gastroprotetor nos modelos de úlcera gástrica aguda avaliados, sendo que os resultados sugerem que essa ação possivelmente envolva a participação do óxido nítrico e prostaglandinas. No modelo de úlcera crônica o EEAS (100 mg/Kg, v.o.) também apresentou ação gastroprotetora significativa. Os resultados demonstraram que a espécie *A. squamosa* representa uma fonte em potencial para novos estudos que comprovem sua utilização como forma alternativa para doenças gastrointestinais.

Palavras – Chave: *Annona squamosa*. Atividade antibacteriana. Atividade gastroprotetora.

ABSTRACT

The *Annona squamosa* L. (Annonaceae), is known as pine, minutes and custard apple. It has biological activities as anti-helminthic, hepatoprotective, anti-inflammatory, antidiabetic and antioxidant. This study aimed to elucidate the main classes of secondary metabolites, to evaluate the antibacterial and gastroprotective of the ethanol extract of leaves of *Annona squamosa* (EEAS). The characterization of the major classes of secondary metabolites (tannins, flavonoids and alkaloids) present in the EEAS was performed by phytochemical screening. The evaluation of the antibacterial activity was determined by the microdilution method, using subinhibitory concentrations (MIC 1/8) in order to evaluate the modulator action of aminoglycosides against some bacterial strains *Escherichia coli* 27 and *Staphylococcus aureus* 358. The gastroprotective activity of the EEAS in doses of 100 and 300mg/kg (p.o), was evaluated using models of acute gastric lesions induced by ethanol, acidified ethanol and indomethacin. To check the possible mechanisms involved in the integrity of gastric mucosa against erosion caused by ethanol, we examined the involvement of endogenous nitric oxide, ATP-dependent potassium channels (KATP), prostaglandins (PGs), α -adrenergic receptor, histamine (H₂) and motility gastrointestinal. The model of chronic gastric ulcer induced by acetic acid was 30%. The crude extract of leaves of *A. squamosa* and its fractions: hexane, ethyl acetate and methanol showed no clinically relevant antibacterial activity, and inhibitory concentrations were all ≥ 1024 mg / mL. However, the extract combined with some aminoglycoside showed a synergistic effect in the face of multidrug-resistant strains of *E. coli* 27 and *S. aureus* 358. The EEAS at doses of 100 and 300 mg/kg (p.o), showed gastroprotective effect in models of acute gastric ulcer evaluated, and the results suggest that this action probably involves the participation of nitric oxide and prostaglandins. In chronic ulcer model the EEAS (100mg/kg, p.o) also showed significant gastroprotective action. The results showed that the species *A. squamosa* represents a potential source for new studies to prove its use as an alternative way to gastrointestinal diseases.

Keywords : *Annona squamosa*. Antibacterial activity. Gastroprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da <i>Annona squamosa</i> L.	23
Figura 2 – Anatomia do estômago	25
Figura 3 – Esquema de secreção de HCl pela célula parietal	28
Figura 4 – Exsicata da espécie <i>Annona squamosa</i> L.	40
Figura 5 – Metodologia de obtenção do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Annona squamosa</i>	42
Figura 6 – Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por etanol absoluto	56
Figura 7 – Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por etanol acidificado	57
Figura 8 – Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por indometacina	58
Figura 9 – Envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	59
Figura 10 – Envolvimento dos canais de K ⁺ dependentes de ATP na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	60
Figura 11 – Envolvimento das prostaglandinas na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	61
Figura 12 – Envolvimento dos receptores noradrenérgicos alfa ₂ na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	62
Figura 13 – Envolvimento dos receptores histamínicos (H ₂) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	63
Figura 14 – Efeito do EEAS sobre a motilidade intestinal dos camundongos	64
Figura 15 – Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por ácido acético 30%	65
Figura 16 – Evolução da massa corpórea dos animais no teste de úlcera crônica induzida por ácido acético	66
Figura 17 – Determinação do consumo de ração dos animais no teste de úlcera crônica induzida por ácido acético	66

Figura 18 – Determinação do consumo de água dos animais no teste de úlcera crônica induzida por ácido acético	67
Figura 19 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	108
Figura 20 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores em modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado	108
Figura 21 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores em modelo de lesão gástrica induzida por indometacina	109
Figura 22 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento do óxido nítrico	110
Figura 23 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento dos canais de K ⁺ dependentes de ATP	111
Figura 24 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento das prostaglandinas	112
Figura 25 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores noradrenérgicos alfa ₂	113
Figura 26 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores histamínicos (H ₂)	114
Figura 27 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelo lesões gástrica crônica induzida por ácido acético 30%.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais	43
Tabela 2 – Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos	45
Tabela 3 – Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de <i>Annona squamosa</i>	54
Tabela 4 – Atividade moduladora do extrato e frações de <i>Annona squamosa</i> contra <i>E. coli</i> na concentração subinibitória (MIC/8 em µg/mL).	55
Tabela 5 – Atividade moduladora do extrato e frações de <i>Annona squamosa</i> contra <i>S. aureus</i> na concentração subinibitória (MIC/8 em µg/mL).	55
Tabela 6 – Efeito do EEAS no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto	97
Tabela 7 – Efeito do EEAS no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado	98
Tabela 8 – Efeito do EEAS no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina	99
Tabela 9 – Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	100
Tabela 10 – Papel dos canais de K ⁺ dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	101
Tabela 11 – Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	102
Tabela 12 – Papel dos receptores noradrenérgicos alfa ₂ no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	103
Tabela 13 – Papel dos receptores histamínicos (H ₂) no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	104
Tabela 14 – Efeito do EEAS sobre a motilidade intestinal	105
Tabela 15 – Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por ácido acético 30%	106

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 – *Analysis of Variance* (Análise de variância)

AMPc – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica

ATP – Trifosfato de adenosina

Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio

β – Beta

BHI – *Brain Heart Infusion*

CAT – Catalase

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

CE – Estado do Ceará (Brasil)

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CIM – Concentração inibitória mínima

CIM/8 – Concentração subinibitória

COX – Cicloxigenase

COX-1 – Cicloxigenase do tipo 1

COX-2 – Cicloxigenase do tipo 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

DZO – Diazóxido

ECL – Células enterocromafins

EEAS – Extrato etanólico de *Annona squamosa*

eNOS ou NOS-3 – òxido 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

g – Grama(s)

GC's - Guanilil ciclase solúvel

GMPc – Adenosina 3'-5'-monofosfato cíclica

GSH – Glutathiona reduzida

GPx – Glutathiona peroxidase

GSSH – Glutathiona oxidada

GTP – Guanosina trifosfato

h – Hora(s)

HCDAL – Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima

HCl – Ácido Clorídrico

HIA – *Heart Infusion Agar*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

i.p. – Via intraperitonal

iNOS ou NOS-2 – Óxido nítrico sintetase induzível

IBP – Inibidor da bomba de prótons

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
Mg (OH)₂ – Hidróxido de magnésio
MPO – Mieloperoxidase
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
n – Número da amostra
nNOS ou NOS-1 – Óxido nítrico neuronal
NO – Óxido Nítrico
NOS – Óxido Nítrico Sintase
O₂⁻ - Superóxido
ONOO⁻ - Peroxinitritos
OMS – Organização Mundial de Saúde
p – Nível de significância
PG's – Prostaglandinas
ERO – Espécies reativas de oxigênio
SCN – Sistema nervoso central
s.c. – Subcutânea
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	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Dados Botânicos	22
2.1.1 <i>Família Annonaceae</i>	22
2.1.2 <i>Annona squamosa L.</i>	23
2.2 Atividade biológica	24
2.3 Anatomia e fisiologia gástrica	24
2.3.1 <i>Secreção ácida gástrica</i>	26
2.3.2 <i>Mecanismos de defesa da mucosa gástrica</i>	29
2.3.2.1 <u>Proteção pré-epitelial</u>	29
2.3.2.2 <u>Proteção epitelial</u>	30
2.3.2.3 <u>Proteção subepitelial</u>	32
2.4 Úlcera péptica	33
2.5 Terapêutica antiulcerogênica	35
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAIS	40
4.1.1 <i>Material Botânico</i>	40
4.1.2 <i>Obtenção do extrato e fracionamento</i>	41
4.1.3 <i>Prospecção fitoquímica</i>	43
4.2 Drogas e reagentes	43
4.2.1 <i>Material permanente e equipamentos utilizados</i>	44
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana	44

<i>4.3.1 Linhagens bacterianas</i>	44
<i>4.3.2 Testes de suscetibilidade de microorganismos</i>	45
<u>4.3.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)</u>	45
<u>4.3.2.2 Modulação de antibióticos</u>	45
4.4 Animais	46
4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora	46
<i>4.5.1 Lesão gástrica aguda induzida pela administração de etanol em camundongos</i>	46
<i>4.5.2 Lesão gástrica aguda induzida pela administração de etanol acidificado em camundongos</i>	47
<i>4.5.3 Lesão gástrica aguda induzida pela administração de indometacina em camundongos</i>	47
<i>4.5.4 Investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do EEAS em modelos de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i>	48
<u>4.5.4.1 Envolvimento do Óxido Nítrico</u>	48
<u>4.5.4.2 Envolvimento dos canais de K⁺ dependentes de ATP</u>	49
<u>4.5.4.3 Envolvimento das Prostaglandinas</u>	49
<u>4.5.4.4 Envolvimento dos Receptores noradrenérgicos alfa₂</u>	50
<u>4.5.4.5 Envolvimento dos Receptores histaminicos (H₂)</u>	50
<i>4.5.5 Efeito do EEAS sobre a motilidade gastrointestinal</i>	51
<i>4.5.6 Lesão gástrica crônica induzida por ácido acético</i>	51
4.6 Análise estatística	52
5. RESULTADOS	54
5.1 Prospecção fitoquímica	54
5.2 Atividade antimicrobiana	54
5.3 Avaliação do efeito gastroprotetor e mecanismo de ação do EEAS	56
<i>5.3.1 Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por etanol absoluto</i>	56

<i>5.3.2 Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por etanol acidificado</i>	57
<i>5.3.3 Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por indometacina (AINEs)</i>	58
<i>5.3.4 Envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i>	59
<i>5.3.5 Envolvimento dos canais de K⁺ dependentes de ATP na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i>	60
<i>5.3.6 Envolvimento das prostaglandinas na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i>	61
<i>5.3.7 Envolvimento dos receptores noradrenérgicos alfa₂ na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i>	62
<i>5.3.8 Envolvimento dos receptores histaminicos (H₂) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto</i>	63
5.4 Efeito do EEAS sobre a motilidade intestinal de camundongos	64
5.5 Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por ácido acético	65
6. DISCUSSÃO	69
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE	95

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (OMS, 1998).

Na história mais recente, o uso de plantas medicinais tornou-se mais avançado, envolvendo o isolamento de princípios ativos como potenciais fitofármacos (LARSSON *et al.*, 2008; RISHTON, 2008). De 1994 até 2007, aproximadamente metade dos fármacos aprovados e liberados para uso foram baseados em fitoconstituintes. Mais de cem compostos de origem natural estão em estudos clínicos e aproximadamente a mesma quantidade, em estudos pré-clínicos (HARVEY, 2008). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% dos habitantes do planeta fazem uso de algum tipo de recurso vegetal como instrumento de cura para suas doenças (LEITE *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais de todo mundo, mantém em prática o consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL *et al.*, 2002). No Brasil o tratamento de algumas doenças com plantas e extratos vegetais é um hábito bastante difundido, devido a uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e, devido a sua grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, podendo ser assim modelo para a síntese de inúmeros fármacos (JORGE *et al.*, 2004; SIMÕES, 2007).

A natureza oferece uma fonte inesgotável de novas estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência, uma grande possibilidade para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou

tratamento adequado, o que justifica o grande interesse da indústria farmacêutica por plantas medicinais (CALIXTO, 2003).

Várias plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento de distúrbios gastrintestinais. A primeira droga sistematicamente efetiva contra úlceras gástricas, a carbenoxolone, foi descoberta como resultado de pesquisas com *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), comumente usada pelos indígenas (AKTAR & MUNIR, 1989).

Dados na literatura demonstram a grande variedade de substâncias químicas isoladas de plantas que apresentam atividade antiulcerogênica e contra distúrbios do trato gastrintestinal, como por exemplo, o trabalho de GUEDES (2008) que testou o ácido centipédico, um diterpeno de *Egletes viscosa* (macela).

Nesse contexto, se faz necessário através da pesquisa científica validar as atividades biológicas da *Annona squamosa* que estão relacionados aos distúrbios do trato gastrointestinal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dados Botânicos

2.1.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae pertence ao grupo das plantas Eucotiledôneas, clado das Magnolideas. Este clado é constituído por quatro ordens, Canallales, Laurales e Piperales, sendo a ordem Magnoliales representada pelas famílias Magnoliaceae, Myristicaceae e Annonaceae (SOUZA & LORENZI, 2008).

Classificação taxonômica segundo CRONQUIST (1981):

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Magnoliídae
Ordem	Magnoliales
Família	Annonaceae Juss.

Algumas características botânicas relevantes para identificar as espécies desta família são o odor forte do corte do tronco ou ramos, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, conhecida popularmente como envira e pela aparência de marcas de chamas no corte transversal do tronco (JOLY, 2002).

Os espécimes de Annonaceae são plantas de hábito arbóreo raramente arbusto, subarbusto ou lianas; folhas alternas, dísticas, simples, sem estípulas, margem inteira. Inflorescência cimosa, às vezes reduzida a uma única flor; flores usualmente grandes e vistosas, em geral bissexuadas, diclamídeas; cálice trímero-tetrâmero, diassépalo; corola formada por 1-2 verticilos de 3(-4) pétalas. Fruto apocárpico ou sincárpico, bacáceo ou menos frequentemente folicular (*Anaxagorea*, *Xylopia*) (SOUZA & LORENZI, 2008).

A Annonaceae é uma família com distribuição predominantemente tropical, que inclui 130 gêneros e 2200 espécies. No Brasil ocorrem 33 gêneros e cerca de 250 espécies. As Annonaceae ocorrem em praticamente todas as formações naturais do Brasil, com destaque para *Xylopia aromatica* (pimenta-de-macaco) e *Annona crassiflora* (marolo), nos cerrados, que servem como fonte de renda para populações

locais. A pinha, ata ou fruta do conde (*Annona squamosa*) e a graviola (*Annona muricata*) são espécies originárias da América Central, frequentemente cultivadas no Brasil, em especial no Nordeste, com frutos que são consumidos *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (SOUZA & LORENZI, 2008).

2.1.2 *Annona squamosa* L.

O gênero *Annona* inclui aproximadamente 140 espécies tropicais com várias espécies nativas sendo conhecidas popularmente por fruta-do-conde, pinha, graviola, beribá e cabeça de negro. As espécies mais comuns no Brasil são *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. reticulata*, *A. tenuiflora* e *A. squamosa* (HIRUMA- LIMA & DI STASI, 2003).

A espécie *Annona squamosa* é conhecida popularmente como pinha, ata ou fruta-do-conde. É originária da América Central, provavelmente da região das Antilhas, encontra-se distribuída em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, foi introduzida no Estado da Bahia, e vem se destacando como cultura de importância em vários estados da região do Nordeste, dentre eles Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco (DONADIO, 1997; ARAÚJO *et al.*, 1999).

Figura 1- Ilustração da *Annona squamosa* L.



Foto da autora.

Localização: Distrito Ponta da Serra/Crato-CE. Janeiro de 2012.

2.2 Atividade Biológica

As folhas da *Annona squamosa* foram descritas na literatura tendo como propriedades: anti-helmintico sobre os nematoides *Ascaridiagali* (FERNANDES *et al.*, 2009); antimicrobiano e pesticida, sendo sua atividade antimicrobiana relacionada a presença de flavonóides (KOTKAR *et al.*, 2001; PATEL & KUMAR, 2008); efeito hepatoprotetor (RAJ *et al.*, 2009); atividade antiinflamatória (AMADOR *et al.*, 2006); atividade antidiabética em ratos que tiveram o diabetes induzido por estreptozotocina/nicotinamida (SHIRWAIKAR *et al.*, 2004) e atividade antioxidante (SHIRWAIKAR *et al.*, 2004).

O estudo do fruto (pericarpo) da *A. squamosa* apresentou os constituintes (-)-enta-cauro-16-ena-19-óico ácido e 17-dihidroxi-enta-caurano-19-óico ácido com potencial antitumoral frente a células de linfoma (BEENA & REMANI, 2008).

As sementes apresentam uma atividade vasorelaxante que é atribuída ao composto isolado cicloesquamocina B, um octapeptideo cíclico (MORITA *et al.*, 2006); demonstra atividade toxica frente ao *Aedes albopictus* (KEMPRAJ & BHAT, 2011).

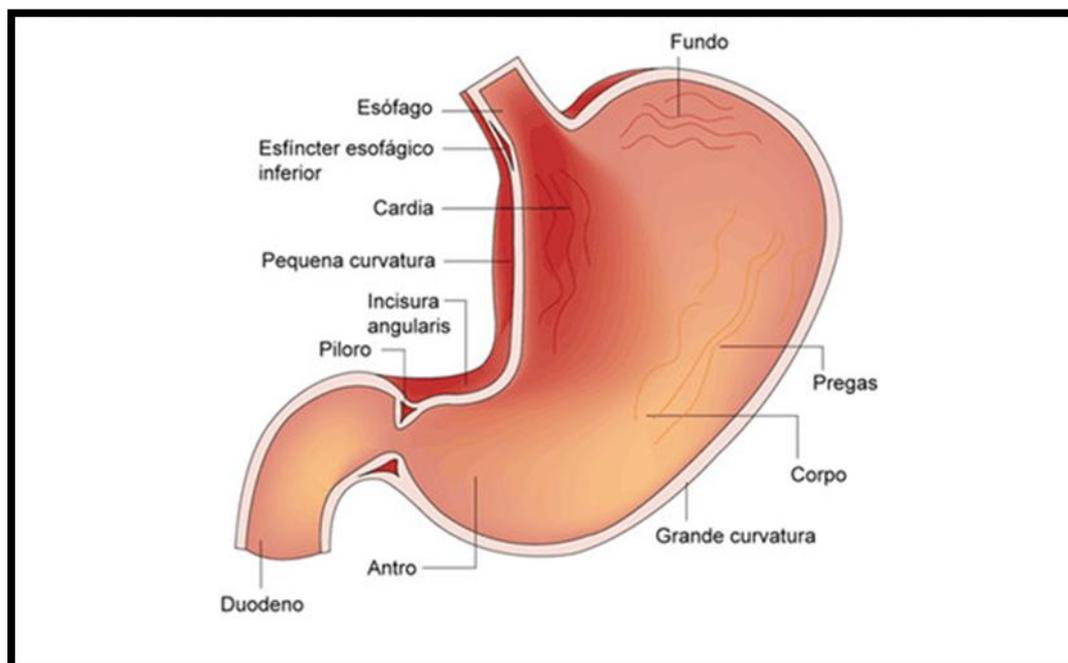
O composto 18- acetoxi-*ent*-caur-16-eno isolado das cascas da *A. squamosa* apresenta atividade analgésica e antiinflamatória (CHAVAN *et al.*, 2011). Recentemente foi descrito a atividade antiulcerogênica dos galhos da *A. squamosa* (YADAV *et al.*, 2011).

2.3 Anatomia e fisiologia gástrica

Anatomicamente o estômago é dividido em cárdia, fundo, corpo e antro pilórico (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).

Figura 2- Anatomia do estômago



Fonte: <http://fotos.sapo.pt/tudradioterapia/fotos/?uid=aTlmluNTUjtrlQdbD5Yi>

De forma funcional, a mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares, constituídas de vários tipos celulares. A porção glandular cardíaca está localizada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior e contém primariamente células glandulares secretoras de muco. Por outro lado, a porção glandular oxíntica compreende as células parietais secretoras de ácido clorídrico, abrangendo cerca de 80% do estômago (fundo e corpo), células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina. A porção glandular pilórica abrange 20% da área total do estômago (antro), apresenta os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, excetuando as células principais e incluem as células G, produtoras de gastrina (JAIN *et al.*, 2007).

O estômago protege-se da lesão mecânica e da digestão pela secreção de duas substâncias: muco e íon bicarbonato (HCO_3^-), secretados respectivamente pelas células

caliciformes e epiteliais. O muco e o íon bicarbonato têm a função de fornecer uma camada lubrificada e tamponada de líquido viscoso sobre a mucosa gástrica, na qual o pH é mantido elevado e onde as enzimas proteolíticas gástricas não são ativas. O estômago também secreta o fator intrínseco, que é essencial para a absorção de vitamina B12. Qualquer irritação local à mucosa estimula a produção de mediadores locais como as prostaglandinas, o que aumenta a produção de muco e íon bicarbonato, e também leva a outras alterações teciduais que promovem a cicatrização da lesão local (DAVIES *et al.*, 2002).

2.3.1 Secreção Ácida gástrica

A regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, o qual envolve mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico os quais convergem para a etapa final da secreção de HCl (SCHUBERT, 2004).

Os neurotransmissores ou hormônios básicos que estimulam diretamente a secreção pelas glândulas gástricas são acetilcolina, a gastrina e a histamina. Todas atuam por meio de sua ligação inicial a receptores existentes sobre as células secretoras. A acetilcolina estimula a secreção de todos os tipos celulares secretores nas glândulas gástricas, incluindo a secreção de pepsinogênio pelas células pépticas, de ácido clorídrico pelas células parietais, de muco pelas células mucosas, e de gastrina pelas células de gastrina. Por outro lado, tanto a gastrina quanto a histamina estimulam acentuadamente a secreção de ácidos pelas células parietais, porém exercem efeito muito menos intenso de estimulação das outras células. Algumas outras substâncias também estimulam as células secretoras gástricas, como aminoácidos circulantes, cafeína e, possivelmente, álcool. Todavia, os efeitos estimulantes dessas substâncias são muito pequenas em comparação com a acetilcolina, a gastrina e a histamina (GUYTON & HALL, 2011).

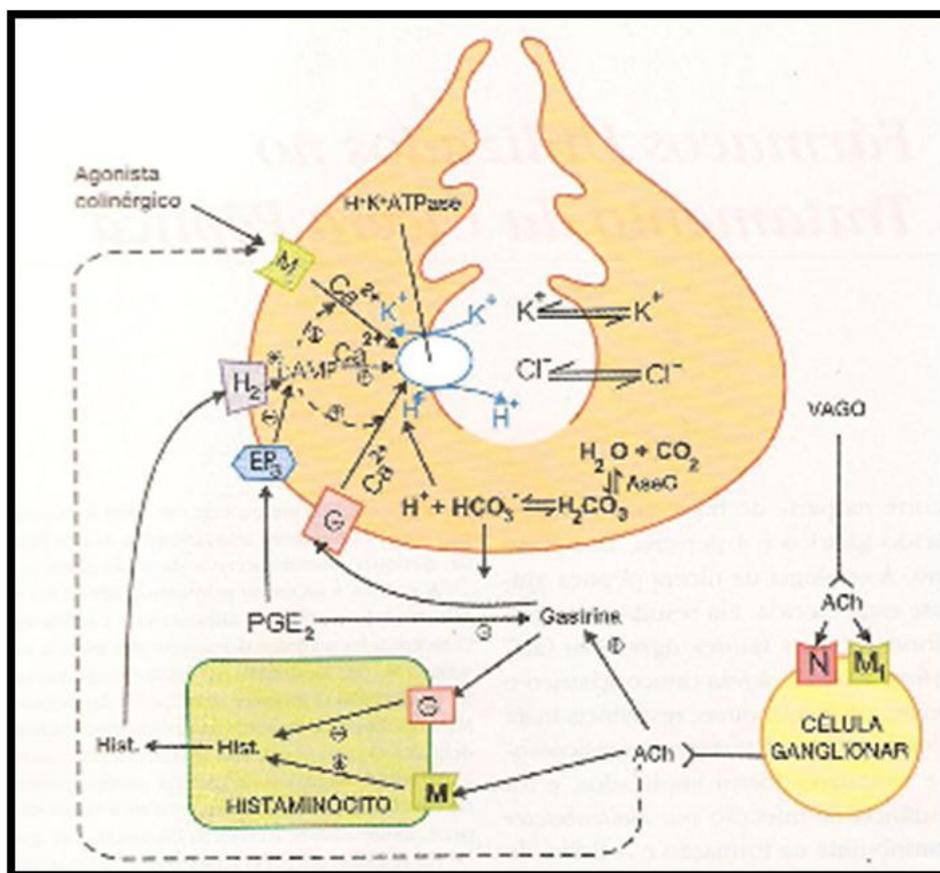
A secreção do ácido clorídrico gástrico ocorre na célula parietal através da H^+ K^+ - adenosina trifosfatase (H^+ / K^+ ATPase – bomba de prótons). O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas e absorção de ferro, cálcio e vitamina B-12, além de prevenir o desenvolvimento bacteriano e outras infecções entéricas (SCHUBERT & PEURA, 2008). A H^+ / K^+ ATPase consiste de duas subunidades, a subunidade α (a qual

contem o sítio catalítico da enzima, responsável pela troca iônica do H^+ intracelular pelo K^+ luminal), e a subunidade β (responsável pela estabilidade estrutural e funcional da enzima, protegendo a enzima de possível degradação) (SCHUBERT e PEURA, 2008; SCHUBERT, 2004). A troca iônica (H^+ / K^+) promovida pela bomba de prótons é acompanhada pela extrusão de íons cloro, da célula parietal, via canais de cloro localizados na membrana apical da célula parietal. Os íons de H^+ e Cl^- ligam-se formando o ácido clorídrico, que atingirá o lúmen gástrico (SCHUBERT e PEURA, 2008).

A estimulação nervosa da secreção gástrica pode ser iniciada por sinais que se originam no cérebro, em particular no sistema límbico, ou no próprio estômago. Os sinais desencadeados no estômago podem ativar dois tipos diferentes de reflexos: (1) reflexos longos, que são transmitidos da mucosa gástrica até o tronco cerebral e, a seguir, de volta ao estômago pelos nervos vagos e (2) reflexos curtos, que se originam localmente e são transmitidos pelo sistema nervoso entérico local (GUYTON & HALL, 2011).

O sistema nervoso central regula o mecanismo principal responsável pelo início da secreção gástrica em resposta a uma antecipação do alimento através da liberação de acetilcolina pelos neurônios eferentes vagais. Diretamente a acetilcolina liga-se a receptores M_3 na membrana basolateral das células parietais e indiretamente estimula a liberação de histamina das células do tipo enterocromafins (ECL) no fundo gástrico e a liberação de gastrina das células G do antro gástrico (ROBERTS & MCDONALD, 2003; BRUNTON *et al.*, 2006). A histamina liberada pelas células ECL ativa as células parietais de maneira parácrina através da interação com receptores H_2 . A gastrina liberada das células G estimula as células parietais diretamente através da ligação com receptores CCK_2 (CCK_B) presentes na membrana da célula ou indiretamente estimulando a liberação de histamina das ECL. Além dos estímulos centrais, a gastrina pode ser liberada através da distensão local do estômago e composição química do conteúdo gástrico. A ligação da acetilcolina, gastrina e histamina com seus respectivos receptores acoplados a proteína G ativam segundos mensageiros. A ativação das vias que dependem do Ca^{2+} intracelular pela gastrina e acetilcolina e/ou de AMPc pela histamina, ativam a H^+ , K^+ /ATPase nas células parietais, resultando na secreção ácida estomacal (BRUNTON *et al.*, 2006).

Figura 3 - Esquema de secreção de HCl pela célula parietal. AseC, anidrase carbônica; Hist. Histamina; ACh., acetilcolina; G, receptor de gastrina/colecistocinina (CCK₂); M, receptor muscarínico; N, receptor nicotínico; H₂, receptor H₂ de histamina; EP₃, receptor de prostaglandina.



Fonte: Adaptado de TRIPATHI, 2006.

A somatostatina é o principal fator inibitório da secreção ácida. No estômago as células produtoras de somatostatina estão intimamente ligadas a células alvo para somatostatina, como as células parietais, ECL e células G, sejam por via direta ou indiretamente pela circulação (SCHUBERT e PEURA, 2008). Um aumento da acidez no lúmen ativa a liberação de somatostatina no antro e fundo do estômago para que esta exerça um efeito inibitório sobre a secreção. As prostaglandinas (PGs) inibem a secreção de ácido por ação direta nas células parietais ou indiretamente pela inibição de gastrina. Nas células parietais, as PG inibem a secreção ácida por inibir a secreção de histamina (ATAY *et al.*, 2000).

2.3.2 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

A integridade da mucosa gástrica é mantida devida ao balanço entre fatores agressores e mecanismos de defesa (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001). A doença gástrica se estabelece quando é rompido o equilíbrio entre os fatores agressivos (secreção gástrica de ácido, pepsina, AINEs, álcool, infecção por *Helicobacter pylori*) e os de defesa da mucosa (fluxo sanguíneo, muco, HCO_3^- , secreção, prostaglandinas, etc) (MORIMOTO *et al.*, 1991). Os mecanismos de defesa da mucosa gastrointestinal podem ser divididos didaticamente em pré-epitelial, epitelial e subepitelial e que funcionam em conjunto para prevenir a lesão da mucosa (FLEMSTROM & ISENBERG, 2001).

2.3.2.1 Proteção pré-epitelial

O epitélio gástrico é coberto por uma camada contínua de muco e bicarbonato, os quais constituem os mais importantes fatores protetores pré-epiteliais contra a auto digestão da mucosa gástrica pelo ácido e pela pepsina (MOJZIS *et al.*, 2000).

O muco gástrico consiste de um gel viscoso, elástico, aderente e transparente formado por 95% de água e 5% de glicoproteínas (REPETTO & LLESUY, 2002). A camada de muco funciona como uma barreira física protetora entre o epitélio e o lúmen contra agentes nocivos, enzimas, microorganismos e pepsina presente no lúmen. Além disso, mantém o gradiente de pH próximo a neutralidade, impedindo danos a mucosa gástrica. O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon (LAINE *et al.*, 2008). A secreção do muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como PGE_2 e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas como os anti-inflamatórios não esteroidais e sais biliares causam a dissipação do muco, levando à lesão gástrica (LAINE *et al.*, 2008).

A secreção pré-epitelial de bicarbonato consiste de uma secreção estável junto à camada de gel aderente, criando um gradiente de pH perto da neutralidade na superfície das células epiteliais, o qual promove a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e duodeno contra o ácido secretado no lúmen. O bicarbonato secretado pelas células epiteliais é retido pelo muco viscoso originando um revestimento pegajoso, viscoso e alcalino. Quando o alimento é ingerido, as taxas de secreção tanto de muco quanto de

bicarbonato aumentam. A taxa máxima de secreção de bicarbonato é de aproximadamente 10% da taxa de secreção de HCL (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

O bicarbonato alcança o epitélio via circulação sanguínea bem como a da conversão de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ em HCO_3^- pela anidrase carbônica intracelular. A secreção de HCO_3^- é induzida por estímulo colinérgico, pelas PGs e pela presença de um baixo pH luminal, enquanto que a sua secreção é inibida pelo estímulo simpático (adrenoreceptores α_2) (FLEMSTROM & ISEMBERG, 2001).

2.3.2.2 Proteção epitelial

A proteção epitelial compreende primeiramente os aspectos anatômicos, uma vez que as células epiteliais gástricas têm propriedades intrínsecas de proteção tanto por disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica. As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração de células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou pela divisão de células do cólo glandular que migram até o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (LAINE *et al.*, 2008).

Quando barreiras iniciais são transpostas, são ativados mecanismos complexos de proteção, como o sistema antioxidante (DONG & KAUNITZ, 2006). Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas constantemente durante alguns processos, como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), durante o metabolismo de xenobióticos e durante a resposta inflamatória. O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ERO pelas enzimas oxidases de mucosa como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase, encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria (DONG & KAUNITZ, 2006). Espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são moléculas altamente reativas que interagem

indiscriminadamente com macromoléculas essenciais, como o DNA, proteínas e lipídeos. Assim, defesas antioxidantes são necessárias para manter a homeostase celular (CNUBBEN *et al.*, 2001).

As enzimas que promovem a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e H_2O_2 incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa S-transferase (GST) (BAYIR H.,2005). A segunda linha de defesa antioxidante é realizada por alguns compostos de moléculas químicas pequenas, incluindo vitaminas, flavonóides da dieta, carotenóides, ácido úrico e glutationa (GSH) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

A SOD tem a função em condições de estresse oxidativo de remover ânions superóxidos do ambiente celular pela conversão de dois radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (FATTMAN *et al.*, 2003). Durante um processo inflamatório, neutrófilos liberam ânions superóxido, os quais ativam células endoteliais e aumentam ainda mais a infiltração de neutrófilos (MASINI *et al.*, 2002). Estudos relataram que a SOD apresenta um alto poder inibitório da inflamação através da modulação da apoptose dos neutrófilos (YASUI & BABA, 2006).

A CAT é uma enzima tetramérica encontrada em todos os organismos aeróbios (SCANDALIOS, 2005). Ela metaboliza o peróxido de hidrogênio (formado na reação com SOD) em água e oxigênio de maneira rápida. A CAT tem um papel protetor importante contra os efeitos tóxicos dos peróxidos gerados nos peroxissomos e os remove com grande eficácia (SIRAKI *et al.*, 2002).

O H_2O_2 também pode ser catabolizado pela GPx, que possui um papel crítico na defesa contra o estresse oxidativo. Existem dois tipos de enzimas: a GPx dependente de selênio (Se) e a GPx independente de Se. A GPx dependente de Se é capaz de reduzir o H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos, enquanto que a GPx independente de Se é inativa com o H_2O_2 e só catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos (MATÉS, 2000; CNUBBEN *et al.*, 2001).

Glutationa S-transferase (GST) é uma superfamília de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos a GSH, produzindo compostos menos reativos. A GST participa da defesa contra o estresse oxidativo devido à capacidade desta enzima em detoxificar compostos endógenos que causam danos (CNUBBEN *et al.*, 2001).

2.3.2.3 Proteção subepitelial

A circulação sanguínea é um dos mais importantes componentes de defesa da mucosa a agentes irritantes. Quando ácidos ou outros irritantes entram na camada subepitelial, neurônios aferentes sensoriais medeiam um rápido aumento no fluxo sanguíneo da mucosa, permitindo a rápida remoção das substâncias tóxicas (WALLACE *et al.*, 2001). As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), os quais protegem a mucosa gástrica contra fatores agressores e se opõem a ação danosa de vários agentes vasoconstritores como os leucotrienos C₄, tromboxano A₂ e endotelina. PGI₂ e NO mantêm a viabilidade endotelial e previnem a aderência de plaquetas e leucócitos nas células endoteliais de microvasos, prevenindo assim o comprometimento da microcirculação (WALLACE, 2001; LAINE *et al.*, 2008).

A geração contínua de PGE₂ e PGI₂ é crucial para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrozantes. Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados e/ou facilitados pelas prostaglandinas. Elas inibem a secreção ácida, estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, aumentam o fluxo sanguíneo, aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa. Prostaglandinas também inibem a ativação de mastócitos, leucócitos e aderência plaquetária no endotélio vascular. A maioria das ações protetoras das PG na mucosa gástrica é mediada principalmente por receptores do tipo EP₁, EP₃ e EP₄ (LAINE *et al.*, 2008). A PGE₂ tem uma função dual na secreção ácida gástrica, sendo que em baixas concentrações, inibe a secreção e, em altas concentrações, estimula a secreção ácida gástrica (DING *et al.*, 1997). A ação inibitória e estimulatória seriam promovidas pela ativação de receptores EP₃ e EP₄, respectivamente. Além disso, a PGE₂ tem efeito estimulatório sobre a secreção de bicarbonato no estômago via receptores EP₁, enquanto no duodeno, a ação ocorre via receptores EP₃ (TAKEUCHI *et al.*, 1999).

O óxido nítrico (NO) é outro agente importante na proteção e manutenção da integridade gástrica. O NO é um gás volátil, formado a partir da L-arginina, cuja reação de oxidação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três diferentes isoformas de NOS, das quais, duas são constitutivamente expressas (óxido nítrico sintase neuronal - nNOS ou NOS-1; e óxido nítrico sintase endotelial - eNOS ou OS-3), e uma terceira que é induzida (óxido nítrico sintase induzida - iNOS ou NOS-2).

O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e a sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas. O NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (DUSSE *et al.*, 2003). A GMPc por sua vez ativam as proteínas quinases G (PKG), iniciando uma cascata de fosforilação para obter a função efetora (DENNINGER *et al.*, 2001).

No trato gastrointestinal, o NO atua na manutenção da homeostase, sendo responsável por múltiplas funções fisiológicas bem como na integridade do epitélio gástrico e da barreira de muco. Além disso, atua como vasodilatador e, portanto, regula o fluxo sanguíneo gástrico (LANAS, 2008). A administração de L-NAME (inibidor da NOS) acentua as lesões gástricas induzidas por etanol e aumenta a atividade da H^+K^+ /ATPase, enquanto doadores de NO (nitroprussiato) reparam as lesões induzidas por etanol e inibem a atividade ATPásica em ratos (BULUT *et al.*, 1999).

2.4 Úlcera Péptica

Úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos podem estar destruídos. O termo "úlceras pépticas" compreende tanto as úlceras gástricas (estomacais) como as duodenais. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno, onde 90% estão localizados a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro como o corpo na pequena curvatura (25%) (MILANI & CALABRO, 2001)

As úlceras gástricas têm sido alvo de intensos estudos nas pesquisas atuais, devido ao crescente número de pessoas acometidas por esta doença. Segundo relatos históricos, a doença da úlcera péptica estava focalizada em alterações na secreção ácido gástrica e de pepsina, tendo como estratégia de tratamento a supressão ácida. Hoje, a hipersecreção gástrica associada com a Síndrome de Zollinger-Ellison, hiperplasia das

células-G, um aumento na quantidade de células parietais e a ausência de equilíbrio fisiológico entre hormônios gástricos antagonistas, gastrina e somatostatina têm importante resultado na doença da úlcera péptica, entretanto a estimulação da secreção de ácido clorídrico e pepsina podem estar relacionadas com hipersensibilidade colinérgica e ação parassimpática, funcionando como co-fator em danos erosivos na mucosa gástrica (YUAN *et al.*, 2006).

Hábitos da sociedade moderna como o tabagismo, ingestão de álcool, utilização crescente de drogas antiinflamatórias não-esteroidais para osteoartrite, artrite reumatóide e prevenção de doenças vasculares e o estresse, têm contribuído para o aumento do número de casos desta doença (HALTER *et al.*, 2001; YUAN *et al.*, 2006).

Atualmente é bem conhecido que o uso de AINEs induz úlceras pépticas quando usados por períodos prolongados. O efeito sistêmico mais importante dos AINEs, em termos de induzir úlcera gástrica refere-se à sua habilidade de suprimir a síntese de PGs (WALLACE, 2008). De fato, vários estudos têm demonstrado que o uso de AINEs convencionais, ou inibidores seletivos de COX-2, provocam ulceração gastrointestinal tanto em animais experimentais quanto em humanos. A habilidade dos AINEs em provocar ulceração gastrointestinal foi primeiramente demonstrada há mais de 60 anos atrás e, desde então, grande atenção tem sido dada a produção de antiinflamatórios que sejam desprovidos deste efeito adverso (WALLACE, 2001).

Outro fator de grande importância no desenvolvimento de úlceras gástricas é o consumo de álcool pela população, que pode produzir erosão gástrica aguda hemorrágica. A ingestão excessiva pode resultar em gastrite caracterizada por edema, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (JAHOVIC *et al.*, 2007; MATSUHASHI *et al.*, 2007). Além disso, em modelos experimentais o etanol tem efeito ulcerogênico e necrotizante que resulta em dano direto da mucosa. Em culturas de células, o etanol tem sido descrito como capaz de retardar a restauração do epitélio gástrico por provocar danos no "citoesqueleto" dessas células (MATSUHASHI *et al.*, 2007). O etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de PGs e consequente redução da produção de muco, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa gástrica, desordem da microcirculação e isquemia, resultando na produção de EROs (PAN *et al.*, 2008).

Na atualidade o *H. pylori* também é apontado como um fator envolvido no desencadeamento das lesões gástricas ulcerativas. Trata-se de um bastonete gram-

negativo, flagelado em forma de espiral e que coloniza o estômago e o duodeno e é apontado como um importante fator de risco para úlceras gastroduodenais, sendo sua transmissão inter-humana (PASSOS, 2007; LINZ & SCHUSTER, 2007). Metade da população mundial está infectada por este microrganismo, porém 80% desses indivíduos permanecem sem nenhuma evidência clínica de doença e somente uma pequena percentagem desenvolve sintomas relacionados à sua presença (AMIEVA & EL-OMAR, 2008).

A *H. pylori* ataca o sistema imune e causa uma inflamação crônica, por diversos mecanismos, podendo danificar o sistema de defesa da mucosa através da redução da camada de muco, diminuindo a circulação sanguínea na mucosa, e interagindo com o epitélio gástrico em todos os estágios de infecção, além de aumentar a secreção de ácido gástrico. O mecanismo de lesão difere entre úlceras gástricas e duodenais. A úlcera duodenal é essencialmente uma doença relacionada com *H. pylori* e é causada principalmente por um aumento na quantidade de ácido e pepsina; já a úlcera gástrica, é mais comumente associada com a ingestão de AINEs, embora a infecção por *H. pylori* possa estar presente. Em todas as condições, as úlceras são associadas com um desequilíbrio entre fatores protetores e agressores, sendo a inflamação a principal causa deste desequilíbrio (YUAN *et al.*, 2006).

2.5 Terapêutica antiulcerogênica

Por mais de um século, as úlceras pépticas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaHCO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de alumínio (Al(OH)_3) e hidróxido de magnésio (Mg(OH)_2) ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. 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 rantidina) e, até 1990, foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro. Atualmente, existem quatro antagonistas H_2 utilizados clinicamente:

cimetidina, ranitidina, famotidina, 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. Mais tarde, com o desenvolvimento dos inibidores da bomba de prótons H^+/K^+ ATPase (IBP), houve uma acentuada redução no uso dos antagonistas de receptores H_2 histaminérgicos. Os IBP (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol) são medicamentos extremamente eficazes na inibição da secreção do ácido gástrico, resultando em melhoras significativas nas taxas de cicatrização de úlceras gástricas e duodenais (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

Tanto os antagonistas de receptores H_2 quanto os IBPs, podem apresentar alguns efeitos adversos quando utilizados cronicamente devido à supressão do ácido gástrico. Dentre esse efeitos, destacam-se o desenvolvimento da hipergastrinemia (resultante da menor liberação de somatostatina a partir das células D, que ocorre subsequentemente à supressão da secreção ácida) e o aumento do risco de infecção bacteriana (como pela *Helicobacter pylori*), ressaltando-se que esse dois problemas podem levar à formação de câncer gástrico (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

Em virtude de efeitos colaterais provocados pelo uso prolongado desses fármacos, se faz necessário a investigação de drogas alternativas para o tratamento de doenças ácido-pépticas.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as atividades *in vivo* e *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L. (EEAS).

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (EEAS);
- Avaliar a atividade antibacteriana e efeito modulatório do EEAS e suas frações (hexânica, acetato de etila e metanólica);
- Verificar a atividade gastroprotetora do EEAS em modelos de lesão gástrica aguda induzida por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina;
- Avaliar o envolvimento do óxido nítrico (NO), canais de K⁺ dependentes de ATP, prostaglandinas, receptores noradrenérgicos alfa₂ e receptores histamínicos (H₂) na atividade gastroprotetora do EEAS em lesões gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos;
- Avaliar o efeito do EEAS sobre a motilidade gastrointestinal de camundongos;
- Verificar a atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético;
- Avaliar o ganho de massa corpórea e consumo de ração e água no modelo de úlcera crônica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 MATERIAIS

4.1.1 Material Botânico

As folhas da espécie *Annona squamosa* utilizadas em nossos experimentos foram coletadas no Distrito Ponta da Serra situado no município de Crato –CE. Uma amostra representativa da espécie contendo flor e fruto foi depositada e identificada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri –URCA, sob o registro #5539.

Figura 4 - Exsicata da espécie *Annona squamosa* L.



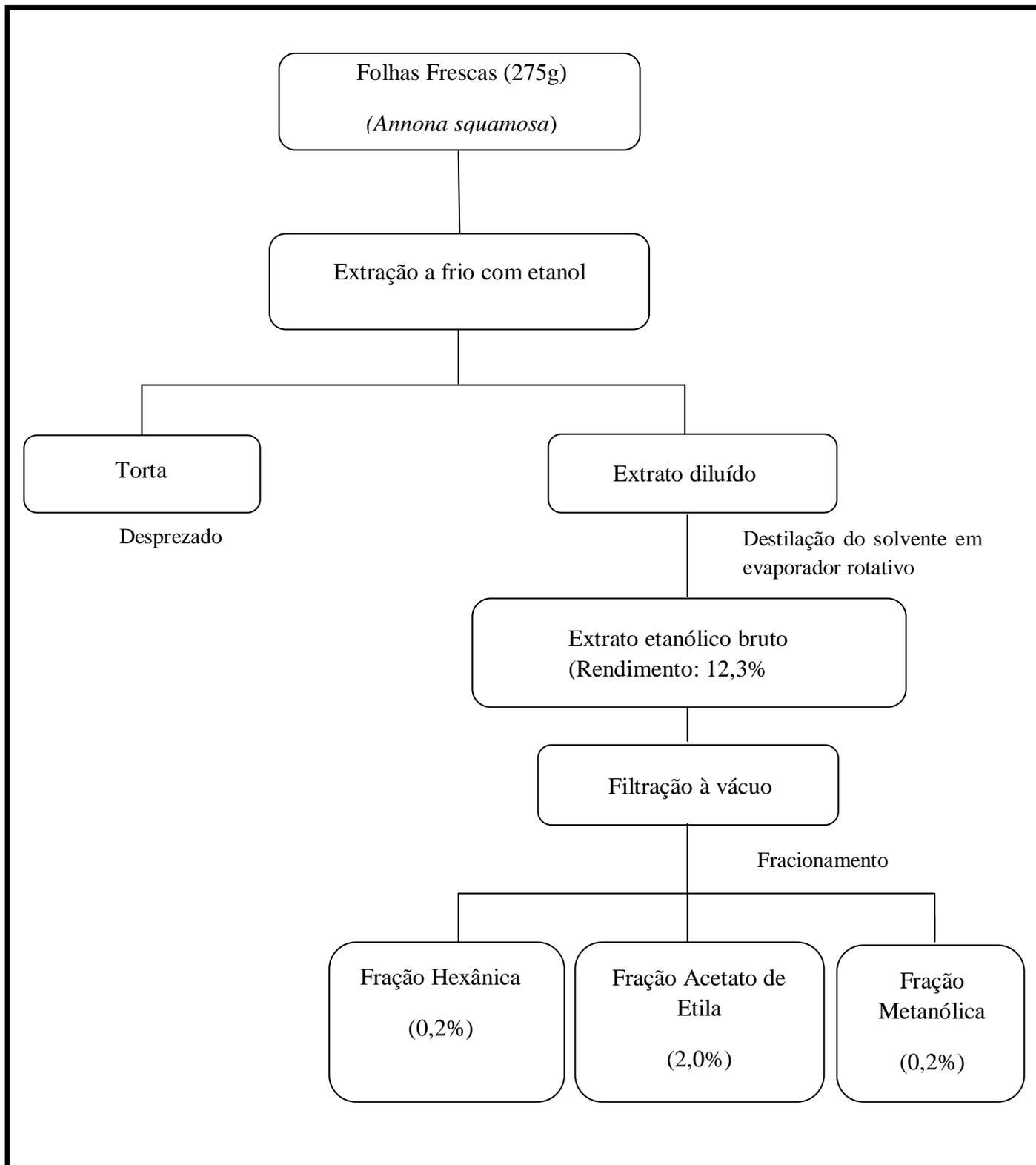
Fonte: Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima-URCA.

4.1.2 Obtenção do extrato e fracionamento

O extrato etanólico foi obtido pelo método de extração exaustiva à frio (MATOS, 1997). Foram utilizadas folhas frescas de *Annona squamosa* (275g), que foram previamente trituradas e submetidas à extração com etanol P.A. por 72h. Em seguida o solvente foi destilado em evaporador rotativo a 80° C sob pressão reduzida, sendo o extrato bruto obtido pesado (10,2g) e armazenado a temperatura ambiente (Figura 5).

O fracionamento do extrato etanólico foi realizado utilizando-se 5g, sob filtração à vácuo usando-se os solventes P.A: Hexano, Acetato de etila e Metanol (Figura 5).

Figura 5 - Metodologia de obtenção do extrato etanólico e frações das folhas de *Annona squamosa*.



4.1.3 Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos para identificação das classes de metabólitos secundários foram realizados seguindo a metodologia descrita por MATOS (1997). Nos ensaios são observados mudança de cor ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

4.2 Drogas e reagentes

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

SUBSTÂNCIA	ORIGEM
Atropina	Sigma, U.S.A.
Ácido acético P.A.	Fluka, Alemanha
Ácido clorídrico (HCL)	Sigma, U.S.A.
Amicacina	Sigma ChemicaCo, U.S.A.
Canamicina	Sigma ChemicaCo, U.S.A.
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	Syntec, Brasil
Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®)	Syntec, Brasil
Clonidina	Sigma, U.S.A.
Diazóxido	Sigma, U.S.A.
Etanol P.A.	Dinâmica, Brasil
Gentamicina	Sigma ChemicaCo, U.S.A.
Glibenclamida	Sigma, U.S.A.
Histamina	Sigma, U.S.A.
Indometacina (Indocid®)	Merck Sharp &Dohme, Brasil
Ioimbina	Sigma, U.S.A.
L-arginina	Sigma, U.S.A.
Misoprostol	Continental Pharma, Itália
Neomicina	Sigma ChemicaCo, U.S.A.
N-nitro-L-arginina-metilestar (L-NAME)	Sigma, U.S.A.
Omeprazol	Medley, Brasil
Ranitidina	Geolab, Brasil

Solução Fisiológica NaCl 0,9%	FARMACE, Brasil
Vermelho de fenol	Synth, Brasil

4.2.1 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
- Estufa de secagem e esterilização
- Fios de sutura
- Materiais de biossegurança
- Material cirúrgico
- Pipetas automáticas (Maxipette)
- Placas de microtitulação
- Rotaevaporador (Fisatom)
- Relógios
- Seringas estéreis (1 mL, 3 mL e 5 mL)
- Tubos Eppendorffs
- Vidrarias gerais

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.3.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas seis linhagens de bactérias padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC25923; *Escherichia coli* ATCC10536; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442; *Klebsiella pneumoniae* ATCC4362 e os isolados clínicos de *E. coli* 27 e *S. aureus* 358, cujo perfil de resistência está descrito na Tabela 2. Todas as linhagens foram obtidas do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba -UFPB.

Tabela 2 - Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Imi, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net

Ast-Aztreonam; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicilina; Amox-Amoxicilina, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazidimida; Cip-Ciprofloxacina; Clo-Clorafenicol; Imi-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim; Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo- Neomicina; Para- Paramomicina; But-Butirosina; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina.

4.3.2 Testes de suscetibilidade de microrganismos

4.3.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

O método utilizado foi o da microdiluição em caldo. As substâncias foram preparados pela dissolução de 10 mg do composto (extrato bruto e frações) em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO-MERCK), iniciando com uma concentração de 10 mg / mL. A solução resultante foi diluída para 1024 µg/mL usando água destilada e estéril. Os microrganismos padrão foram inoculados em BHI 3,7% até chegar a de 10⁵ UFC/mL. Nas placas de microdiluição foram distribuídos 100µL do BHI 10% e inóculo em cada poço e em seguida procedeu-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do extrato ou frações, variando nas concentrações de 512 a 8 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C (JAVADPOUR *et al.*, 1996). A revelação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se o reagente resazurina, sendo que a coloração azul representa a ausência de crescimento e a coloração vermelha crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado de acordo com a NCCLS (2003).

4.3.2.2 Modulação de antibióticos

Na verificação da atividade moduladora da ação de antibióticos frente às cepas testadas, utilizou-se o método modificado por SATO *et al.*, (2004), onde a solução do

extrato ou frações foram testadas em concentração sub-inibitória (MIC/8) de 128 μ g/mL. Foram distribuídos 100 μ L de uma solução contendo BHI 10%, inóculo e extrato/frações em cada poço no sentido alfabético da placa. Em seguida, 100 μ L da droga foi misturado ao primeiro poço, procedendo-se a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações dos aminoglicosídeos variaram gradualmente de 5000 a 2,44 μ g/mL.

4.4 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (20-30g) e ratas variedade *Wistar* (180-230g), provenientes da Universidade Regional do Cariri e Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte. Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas e mantidos sob temperatura média de 26° C, em ciclos de claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Todos os protocolos seguiram estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Fortaleza- UNIFOR, com parecer nº 011/2010.

4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora

4.5.1 Lesão gástrica aguda induzida pela administração de etanol absoluto em camundongos

As lesões gástricas agudas induzidas por etanol seguiram metodologia descrita por ROBERT *et al.*, (1979).

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, divididos em grupos (n=6) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h com acesso livre a água. Estes animais foram tratados, com veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (EEAS) nas concentrações de 100 e 300 mg/Kg (v.o.), ou omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL/animal v.o.). Decorridos 30 min, os animais foram anestesiados com solução de xilazina 0,01 mL (i.p.) e cetamina 0,02mL (i.p.), em seguida sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com solução salina 0,9% e comprimidas entre duas lâminas. As imagens foram

escaneadas e digitalizadas, com posterior análise através do “software” (*Image J*). A área lesionada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico.

4.5.2 Lesão gástrica aguda induzida pela administração de etanol acidificado em camundongos

No modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol acidificado a metodologia seguida foi descrita por MIZUI e colaboradores (1987).

Camundongos de ambos os sexos divididos em grupos (n=6) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h com acesso livre a água. Estes animais foram tratados, com veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (EEAS) nas concentrações de 100 e 300 mg/Kg (v.o.), ou omeprazol (30 mg/Kg, v.o.), 1 h antes de receberem 0,2 mL de uma solução 0,3 M de ácido clorídrico (HCl) em etanol a 60 %. Decorridos 1 h, os animais foram anestesiados com solução de xilazina 0,01 mL (i.p.) e cetamina 0,02mL (i.p.), e em seguida sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidas entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise através do “software” (*Image J*). A área lesionada foi expressa em termos de percentagem em relação à área total do corpo gástrico.

4.5.3 Lesão gástrica aguda induzida pela administração de indometacina em camundongos

As lesões gástricas aguda induzida por indometacina seguiram a metodologia descrita por DJAHANGUIRI (1969).

Camundongos de ambos os sexos divididos em grupos (n=6) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h com acesso livre a água. Estes animais foram tratados, com veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.), extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (EEAS) nas concentrações de 100 e 300 mg/Kg (v.o.), ou omeprazol (30mg/Kg, v.o.), 1 h antes de receberem indometacina (10 mg/Kg, v.o.) e

após 3 h da administração do agente lesivo, foram repetidos os tratamentos com o veículo, extrato e o omeprazol. Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram anestesiados com solução de xilazina 0,01 mL (i.p.) e cetamina 0,02mL (i.p.), e em seguida sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidas entre duas lâminas. As imagens foram escaneadas e digitalizadas, com posterior análise através do “software” (*Image J*). A área lesionada foi expressa em termos de porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

4.5.4 Investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do EEAS em modelos de lesões gástricas induzida por etanol absoluto

4.5.4.1 Envolvimento do Óxido Nítrico (MATSUDA *et al.*, 1999)

Camundongos de ambos os sexos, divididos em grupos (n=8) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h, foram tratados com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), L-NAME (10 mg/Kg, i.p.) um inibidor não específico das enzimas NO sintetases, L-Arginina (600 mg/Kg, v.o.) um substrato da NO sintetase, ou veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.).

O envolvimento do óxido nítrico foi avaliado pela administração do EEAS (100 mg/Kg, v.o.), L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) 1 h antes do L-NAME (10 mg/Kg, i.p.), sendo que após 30 min foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos foram analisados conforme descrito anteriormente. O controle lesionado recebeu solução salina (0,2 mL/animal) 30 min antes da administração do etanol e após 30 min o sacrifício.

Empregou-se ainda, L-arginina (600 mg/Kg v.o.) sozinha e o EEAS (100 mg/Kg, v.o.) sozinho, 1 h antes do etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.) e decorridos 30 min da administração, os animais foram anestesiados e sacrificados e realizada a análise estomacal.

4.5.4.2 Envolvimento dos Canais de K⁺ dependentes de ATP (RAHGOZAR *et al.*, 2001)

Foram empregados camundongos de ambos os sexos, divididos em grupos (n=8) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h. Foram tratados com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) um bloqueador dos canais de K⁺ dependentes de ATP, diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) um vasodilatador que abre os canais de K⁺ dependentes de ATP, ou veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.).

O envolvimento dos canais dependentes de ATP foi avaliado pela administração do EEAS (100 mg/Kg, v.o.), diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) 1 h, 30 min (respectivamente) antes da glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), sendo que após 30 min foi administrado etanol _{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos foram analisados conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu solução salina (0,2 mL/animal) 30 min antes da administração do etanol e após 30 min o sacrifício. Um grupo de animais recebeu EEAS (100 mg/Kg, v.o.) 1 h antes do etanol absoluto, decorridos 30 min da administração deste, os animais foram anestesiados e sacrificados.

Administrou-se o diazóxido (3 mg/Kg, i.p.), sozinho, 30 min antes do etanol _{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) e decorridos 30 min da administração, os animais foram anestesiados e sacrificados e realizada a análise estomacal.

4.5.4.3 Envolvimento das Prostaglandinas (MATSUDA *et al.*, 1999)

Utilizaram-se camundongos de ambos os sexos, divididos em grupos (n=8) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h. Foram tratados com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), indometacina (10 mg/Kg, v.o.) um supressor da síntese de PGS, misoprostol (0,016mg/Kg, v.o.) análogo das prostaglandinas do tipo E1, ou veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.).

O envolvimento das prostaglandinas foi avaliado pela administração do EEAS (100 mg/Kg, v.o.), misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) 1 h antes da indometacina (10mg/Kg, v.o.), sendo que após 2 h destes foi administrado etanol _{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos foram analisados conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu solução salina (0,2 mL/animal) 30 min antes da administração do etanol e após 30 min o sacrifício.

O misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) e o EEAS (100 mg/Kg, v.o.) foram administrados sozinho, 1 h antes do etanol_{abs} (0,2mL/animal, v.o.) e decorridos 30 min, os animais foram anestesiados e sacrificados e realizada a análise estomacal.

4.5.4.4 Envolvimento dos Receptores noradrenérgicos alfa₂ (LAPA *et al.*, 2008)

Foram empregados camundongos de ambos os sexos, divididos em grupos (n=8) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h. Foram tratados com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) um bloqueador dos receptores α_2 pré-sinápticos, clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) um agonista parcial dos receptores α_2 -adrenérgicos, ou veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.).

O envolvimento dos receptores noradrenérgicos alfa₂ foi avaliado pela administração do EEAS (100 mg/Kg, v.o.), clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) 1 h, 30 min (respectivamente) antes da ioimbina (2 mg/Kg, i.p.), sendo que após 30 min destes foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos foram analisados conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu solução salina (0,2mL/animal) 30 min antes da administração do etanol e após 30 min o sacrifício.

Empregou-se ainda a clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) sozinha, 30 min antes do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) e o EEAS (100 mg/Kg, v.o.) sozinho, 1 h antes do etanol_{abs} decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados e realizada a análise estomacal.

4.5.4.5 Envolvimento dos Receptores histamínicos (H₂)

Utilizaram-se camundongos de ambos os sexos, divididos em grupos (n=8) que permaneceram em jejum de sólidos por um período de 18 h. Foram tratados com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) um antagonista dos receptores H₂, histamina (3 mg/Kg, s.c.) interage com receptores H₂ das células parietais, ou veículo (solução salina a 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o.).

O envolvimento dos receptores histamínicos (H₂) foi avaliado pela administração do EEAS (100 mg/Kg, v.o.), ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) 1 h, 30 min

respectivamente antes da histamina (3 mg/Kg, s.c.), após 30 min foi administrado etanol _{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram anestesiados e sacrificados, os estômagos foram analisados conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu solução salina (0,2 mL/animal) 30 min antes da administração do etanol e após 30 min o sacrifício.

A ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) e o EEAS (100 mg/Kg, v.o.) foram administrados sozinho após 30 min, 1 h respectivamente antes do etanol _{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) e decorridos 30 min, os animais foram anestesiados e sacrificados e realizada a análise estomacal.

4.5.5 Efeito do EEAS sobre a motilidade gastrointestinal (LAPA *et al.*, 2008)

Esse modelo consistiu na administração de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%), no qual é avaliado o trajeto do mesmo no intestino delgado durante um período de tempo. Camundongos, em jejum de 12 h, foram pré-tratados com veículo (solução salina 0,9%, v.o.), EEAS (100 mg/Kg, v.o.) e Atropina (0,1 mg/Kg, v.o.) após 1 h foi administrado o marcador colorido (0,1 mL/10g, v.o.), decorrido 30 min da administração do marcador os animais foram anestesiados e sacrificados. A cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado foi removido. Com auxílio de uma régua, foi determinado o comprimento do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador (até a última porção que continha pelo menos 1cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado.

4.5.6 Lesão gástrica crônica induzida por ácido acético

O experimento foi realizado conforme metodologia descrita por TAKAGI *et al.*, (1969). Ratas *Wistar* (180g – 230g) foram mantidas em jejum de 24 h antes do experimento, com livre acesso a água. Os animais foram anestesiados (Solução de xilazina 6 mg/Kg; quetamina 60 mg/Kg, i.p.), e uma incisão longitudinal foi feita. A parede anterior do estômago foi exposta e injetado 50µl de ácido acético a 30% na camada subserosa anterior, na parede subserosa posterior foi aplicado 50µl de soro

fisiológico 0,9%. Após esse procedimento o estômago é lavado com solução salina e o animal é suturado. Decorrido 48 horas do procedimento, iniciou-se o tratamento diário durante 14 dias, sendo tratados com EEAS (100mg/Kg, v.o.) (essa concentração do extrato foi escolhida por ser a menor dose eficaz no estudo de proteção pelos modelos de etanol_{abs}, etanol HCl e indometacina), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.). Durante este período, também foram medidos a evolução do peso dos animais, consumo de ração e água. Após o término do tratamento os animais foram anestesiados e sacrificados, seus estômagos foram removidos e abertos pela grande curvatura.

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Student Newman Keul*, teste de ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas a partir do *Software GraphPad Prism* versão 5.0

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Prospecção Fitoquímica

Na prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *A. squamosa* (EEAS), verificou-se a presença de taninos condensados, flavonas, flavonóis, xantanas, chalconas, auronas, flavononóis, catequinas, flavononas e alcaloide, conforme evidenciado na Tabela 03.

Tabela 3 – Classes de metabólitos secundários identificados no extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L.

Classes de metabólitos	(+) presença (-) ausência
Fenóis	-
Taninos Pirogálicos	-
Taninos Condensados	+
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	+
Flavonóis	+
Xantonas	+
Chalconas	+
Auronas	+
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	+
Flavononas	+
Alcalóides	+

5.2 Atividade antimicrobiana

O extrato bruto e frações não apresentaram atividade antibacteriana clinicamente relevante no teste de concentração inibitória mínima frente às linhagens ensaiadas sendo que as concentrações inibitórias foram $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. No entanto, o extrato bruto

combinado com o aminoglicosídeo neomicina apresentou um efeito sinérgico frente às linhagens multirresistentes de *E. coli* 27 e *S. aureus* 358. A fração hexânica modulou de forma sinérgica o aminoglicosídeo neomicina frente à *S. aureus*. Sinergismo também foi observado quando se associou a fração acetato de etila com a amicacina e a gentamicina, reduzindo respectivamente o MIC destes aminoglicosídeos frente à linhagem Gram-negativa de *E. coli* 27. A fração metanólica não afetou a atividade antibacteriana dos antibióticos aminoglicosídeos quando testada em combinação, frente às linhagens multirresistentes (tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Atividade moduladora do extrato etanólico e frações de *Annona squamosa* contra *E. coli* 27 na concentração subinibitória (MIC/8em µg/mL).

Antibiótico	EC27				
	Sozinho	+EE	+FH	+FAE	+FM
Canamicina	1250	1250	1250	1250	1250
Neomicina	312,5	39,06	312,5	312,5	312,5
Amicacina	2500	2500	2500	625	2500
Gentamicina	625	625	625	156,25	625

EE: Extrato Etanólico; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FM: Fração Metanólica.

Tabela 5 - Atividade moduladora do extrato etanólico e frações de *Annona squamosa* contra *S. aureus* 358 na concentração subinibitória (MIC/8em µg/mL).

Antibiótico	SA358				
	Sozinho	+EE	+FH	+FAE	+FM
Canamicina	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06
Neomicina	19,53	4,88	4,88	19,53	19,53
Amicacina	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06
gentamicina	4,88	4,88	4,88	4,88	4,88

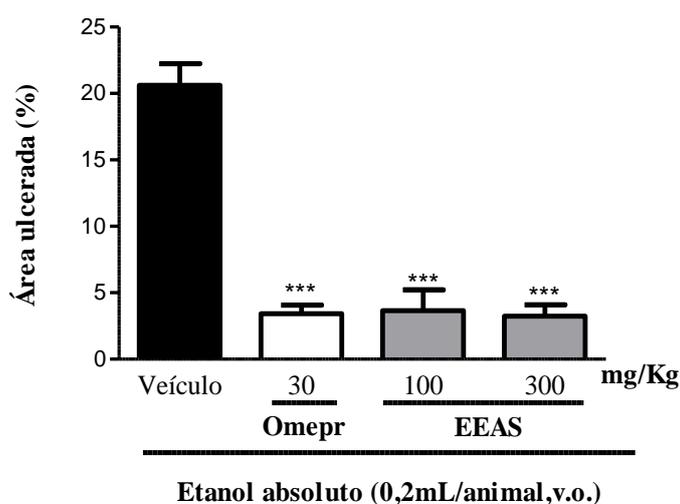
EE: Extrato Etanólico; FH: Fração Hexânica; FAE: Fração Acetato de Etila; FM: Fração Metanólica.

5.3 Avaliação sobre o Efeito Gastroprotetor e Mecanismo de Ação do EEAS

5.3.1 Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por etanol absoluto

No modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol absoluto em camundongos, o pré-tratamento com o EEAS nas doses de 100 e 300 mg/Kg preveniu a formação da lesão gástrica induzida pelo etanol (0,2mL/animal, v.o.) em 76,58% ($3,66 \pm 1,55$), 81,69% ($3,23 \pm 0,84$), respectivamente, quando comparado ao veículo (solução salina a 0,9%, 01mL/10g, v.o.) ($20,62 \pm 1,62$). O inibidor da bomba de prótons $H^+ K^+ /ATPase$ (omeprazol, 30 mg/Kg, v.o.) foi capaz de prevenir a formação de lesão gástrica em 81,78% ($3,42 \pm 0,63\%$) quando comparado ao grupo veículo (Figura 6, apêndice A, Tabela 6).

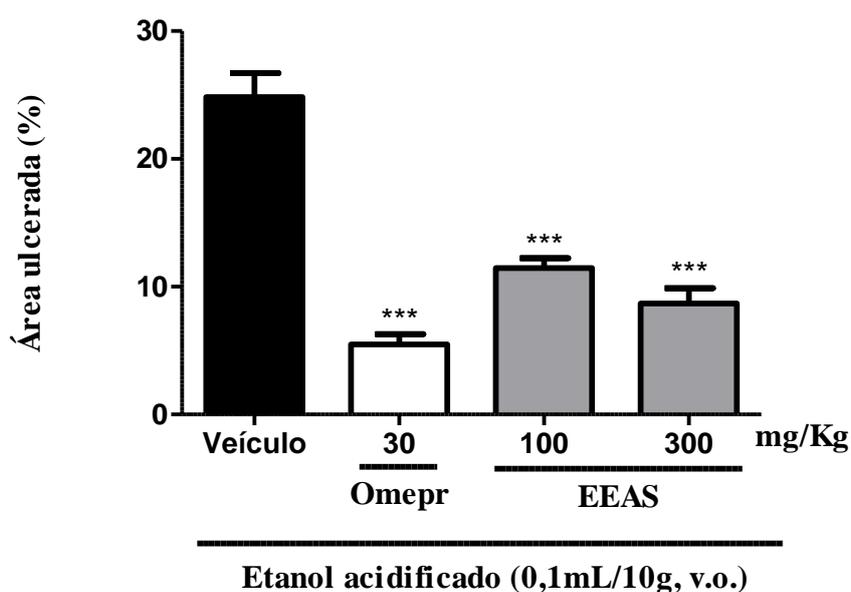
Figura 6 - Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por etanol absoluto. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1 mL/10g, v.o.), omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) e EEAS (100 e 300 mg/Kg, v.o.). Uma hora após os animais receberam etanol acidificado (0,1mL/10g/animal v.o.). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias de 6 animais. Na análise estatística, foi considerado não significante $p > 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo veículo (ANOVA e Test Student Newman Keuls).



5.3.2 Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por etanol acidificado

No modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol acidificado em camundongos, o pré-tratamento com o EEAS nas doses de 100 e 300 mg/Kg preveniu a formação da lesão gástrica induzida pelo etanol acidificado (0,2 mL/animal, v.o.) em 54,19% ($11,47 \pm 0,76$), 63,03% ($8,69 \pm 1,18$), respectivamente, quando comparado ao veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.) ($24,83 \pm 1,88$). O inibidor da bomba de prótons $H^+ K^+ / ATPase$ (omeprazol, 30 mg/Kg, v.o.) foi capaz de prevenir a formação de lesão gástrica em 75,09% ($5,48 \pm 0,81$) quando comparado ao grupo veículo (Figura 7, apêndice A, Tabela 7).

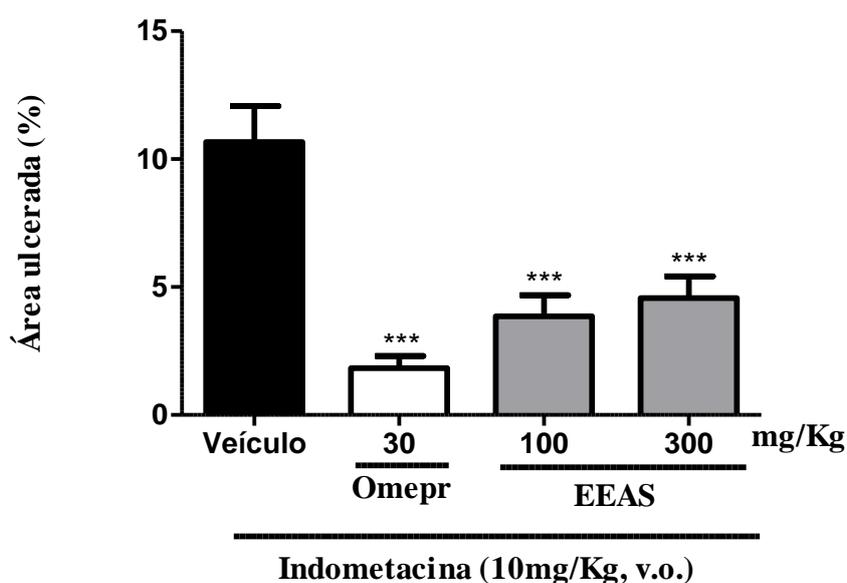
Figura 7 - Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por etanol acidificado. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1mL/10g, v.o.), omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) e EEAS (100 e 300 mg/Kg, v.o.). Uma hora após os animais receberam 0,2mL de etanol absoluto, (v.o.). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias de 6 – 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo veículo (ANOVA e Test Student Newman Keuls).



5.3.3 Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por indometacina (AINEs)

No modelo de lesão gástrica aguda induzida por indometacina em camundongos, o pré-tratamento com o EEAS nas doses de 100 e 300 mg/Kg preveniu a formação da lesão gástrica induzida pela indometacina (10mg/Kg, v.o.) em 61,27% ($3,85 \pm 0,82$), 55,14% ($4,57 \pm 0,84$), respectivamente, quando comparado ao veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.) ($10,67 \pm 1,40$). O inibidor da bomba de prótons $H^+ K^+ /ATPase$ (omeprazol, 30 mg/Kg, v.o.) foi capaz de prevenir a formação de lesão gástrica em 80,92% ($1,83 \pm 0,47$) quando comparado ao grupo veículo (Figura 8, apêndice A, Tabela 8).

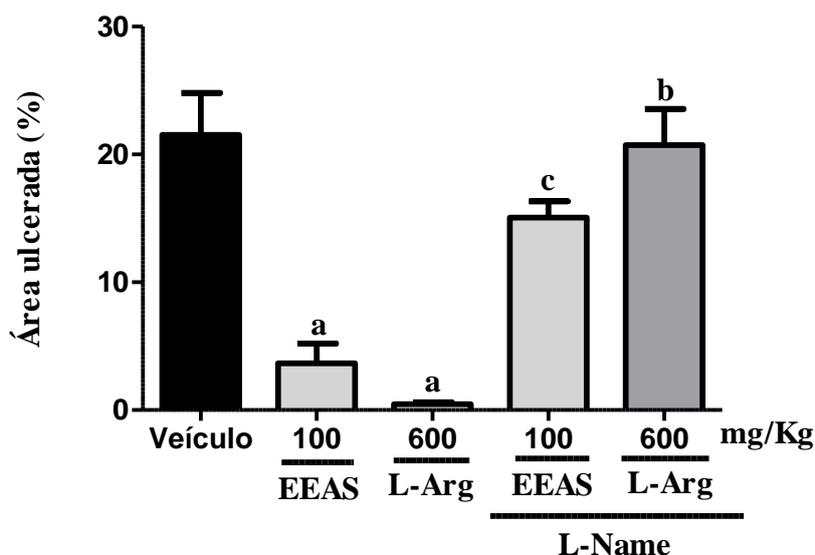
Figura 8 - Efeito do EEAS em lesões gástrica induzida por indometacina. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1mL/10g, v.o.), omeprazol (30 mg/Kg, v.o.) e EEAS (100 e 300 mg/Kg, v.o.). Uma hora após a administração de indometacina (10 mg/Kg, v.o.) e após três horas, foram repetidos os tratamentos com veículo, omeprazol e EEAS. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão das médias de 6 – 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs grupo veículo (ANOVA e Test Student Newman Keuls).



5.3.4 Envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os animais que foram tratados com L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) ou com EEAS (100 mg/Kg, v.o.) demonstraram redução significativa da lesão gástrica induzida pelo etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.) de 97,62% ($0,45 \pm 0,14$) e 78,99% ($3,66 \pm 1,55$) respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu somente veículo ($21,54 \pm 3,26$). O pré-tratamento com L-NAME (10 mg/Kg, i.p.), bloqueou a gastroproteção da L-arginina ($20,75 \pm 2,82$) e do EEAS ($15,07 \pm 1,25$) (Figura 9, apêndice A, Tabela 9).

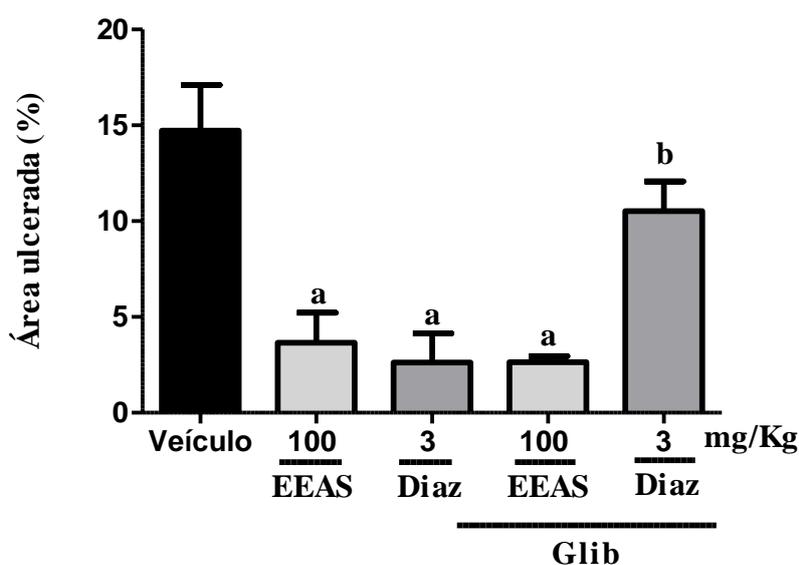
Figura 9 - Envolvimento do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Administrou-se tratamento com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (0,1 mL/10g, v.o.) e L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) 1 hora antes do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo de EEAS (100mg/Kg, v.o.) e L-arginina (600 mg/Kg, v.o.) após 1h receberam L-name (10 mg/Kg, i.p.) e decorridos 30 min receberam etanol absoluto. Foram utilizados grupos de 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e ^a $p < 0,001$ vs veículo, ^b $p < 0,001$ vs L-arginina e ^c $p < 0,001$ vs EEAS (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).



5.3.5 Envolvimento dos canais de K⁺ dependentes de ATP na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os animais que foram tratados com diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) ou com EEAS (100mg/Kg, v.o.) demonstraram uma redução significativa da lesão gástrica induzida pelo etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.) de 75,90% ($2,61 \pm 1,51$) e 69,53% ($3,66 \pm 1,55$) respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu somente veículo ($14,72 \pm 2,39$). O pré-tratamento com a glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.), um bloqueador dos canais de K⁺ dependentes de ATP, bloqueou a gastroproteção do diazóxido ($10,53 \pm 1,54$) no entanto não reverteu o efeito gastroprotetor do EEAS ($2,64 \pm 0,32$) (Figura 10, apêndice A, Tabela 10).

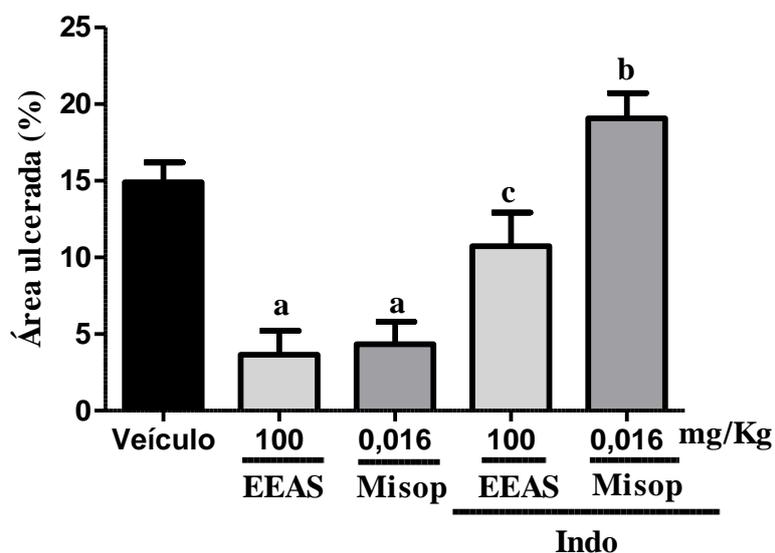
Figura 10 - Envolvimento dos canais de K⁺ dependentes de ATP na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Administrou-se tratamento com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (0,1 mL/10g, v.o.) e diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) nos determinados horários 1h; 1h; 30 min respectivamente, antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100 mg/Kg, v.o.) e diazóxido (3 mg/Kg, i.p.) após 1h; 30 min, respectivamente, receberam glibenclamida (5 mg/Kg, i.p.) e decorridos 30 min receberam etanol absoluto. Foram utilizados grupos de 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e ^a $p < 0,001$ vs veículo, ^b $p < 0,01$ vs diazóxido (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).



5.3.6 Envolvimento das Prostaglandinas na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os animais que foram tratados com misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) ou com EEAS (100 mg/Kg, v.o.) apresentaram uma redução significativa da lesão gástrica induzida pelo etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.) de 64,25% ($4,34 \pm 1,45$) e 67,853% ($3,66 \pm 1,55$) respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu somente veículo ($14,92 \pm 1,39$). O pré-tratamento com a indometacina (10 mg/Kg, v.o.), inibidor da cicloxigenase, bloqueou a gastroproteção do misoprostol ($19,08 \pm 1,64$) e do EEAS ($10,74 \pm 2,19$) (Figura 11, apêndice A, Tabela 11).

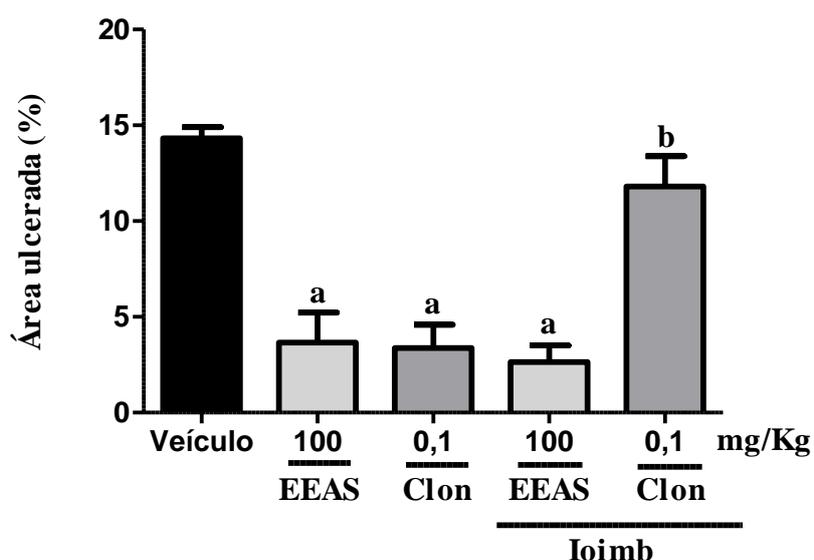
Figura 11 - Envolvimento das Prostaglandinas na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Administrou-se tratamento com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (0,1 mL/10g, v.o.) e misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) 1 hora antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100 mg/Kg, v.o.) e misoprostol (0,016 mg/Kg, v.o.) após 1 hora receberam indometacina (10 mg/Kg, v.o) e decorridos 2 horas receberam etanol absoluto. Foram utilizados grupos de 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e ^a $p < 0,001$ vs veículo, ^b $p < 0,001$ vs misoprostol e ^c $p < 0,05$ vs EEAS (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).



5.3.7 Envolvimento dos Receptores noradrenérgicos α_2 na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os animais que foram tratados com clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) ou com EEAS (100 mg/Kg, v.o.) demonstraram uma redução significativa da lesão gástrica induzida pelo etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.) de 69,26% ($3,36 \pm 1,22$) e 65,03% ($3,66 \pm 1,55$) respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu somente veículo ($14,33 \pm 0,57$). O pré-tratamento com a ioimbina (2 mg/Kg, i.p.), bloqueou a gastroproteção da clonidina ($11,81 \pm 1,57$), no entanto não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor do EEAS ($2,63 \pm 0,87$) (Figura 12, apêndice A, Tabela 12).

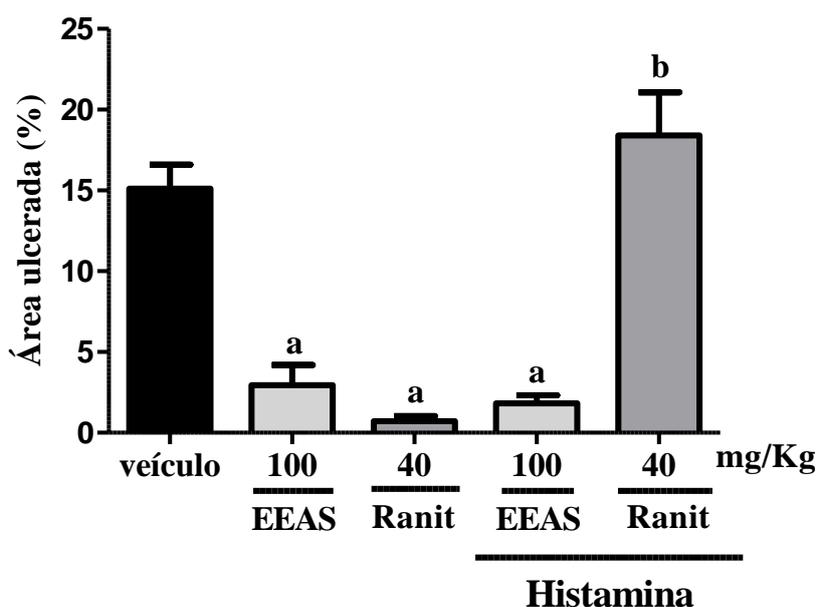
Figura 12 - Envolvimento dos Receptores noradrenérgicos α_2 na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Administrou-se tratamento com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (0,1 mL/10g, v.o.) e clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) nos determinados horários 1h; 1h; 30min respectivamente, antes do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo de EEAS (100 mg/Kg, v.o.) e clonidina (0,1 mg/Kg, i.p.) após 1h; 30 min, respectivamente receberam ioimbina (2 mg/Kg, i.p.) e decorrido 30min receberam etanol absoluto. Foram utilizados grupos de 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs veículo, $^b p < 0,001$ vs clonidina (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).



5.3.8 Envolvimento dos Receptores histamínicos (H_2) na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto

Os animais que foram tratados com ranitidina (40 mg/Kg, s.c.) ou com EEAS (100 mg/Kg, v.o.) demonstraram uma redução significativa da lesão gástrica induzida pelo etanol absoluto (0,2 mL/animal, v.o.) de 93,84% ($0,71 \pm 0,31$) e 74,78% ($2,94 \pm 1,24$) respectivamente, quando comparado ao grupo que recebeu somente veículo ($15,11 \pm 1,48$). O tratamento com a histamina (3 mg/Kg, s.c.), bloqueou a gastroproteção da ranitidina ($18,41 \pm 2,65$), no entanto não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor do EEAS ($1,83 \pm 0,49$) (Figura 13, apêndice A, Tabela 13).

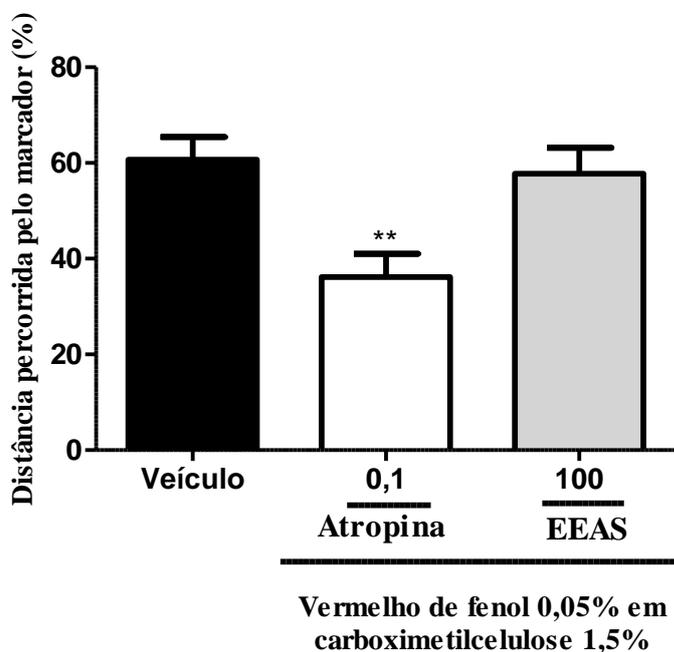
Figura 13 - Envolvimento dos Receptores histamínicos na atividade gastroprotetora do EEAS em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto. Administrou-se tratamento com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e rantidina (0,1 mg/Kg, s.c.) nos determinados horários 1h; 1h; 30min respectivamente, antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100 mg/Kg, v.o.) e ranitidina (0,1mg/Kg, i.p.) após 1h; 30 min, respectivamente receberam histamina (3 mg/Kg, s.c.) e decorrido 30 min receberam etanol absoluto. Foram utilizados grupos de 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs veículo, $^b p < 0,001$ vs ranitidina (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).



5.4 Efeito do EEAS sobre a motilidade intestinal de camundongos

A porcentagem da distância percorrida pelo marcador colocado no intestino delgado de camundongos foi de $57,78 \pm 5,32$, após tratamento prévio com EEAS. Esses resultados não foram significativamente diferentes do grupo de animais que recebeu apenas solução salina (veículo) onde o marcador percorreu $60,69 \pm 4,73$ do comprimento total do intestino. O grupo de animais que recebeu tratamento com atropina apresentou $36,12 \pm 4,88$ de trânsito intestinal. Esses resultados podem ser observados na Figura 14 e Tabela 14 (Apendice A).

Figura 14 - Efeito do EEAS sobre a motilidade intestinal de amundongos. Administrou-se tratamento com EEAS (100 mg/Kg, v.o.), veículo (0,1 mL/10g, v.o.) e atropina (0,1 mg/Kg, v.o.) 1 h antes do marcador (0,1 mL/10g, v.o). Foram utilizados grupos de 8 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $** p < 0,001$ vs grupo veículo (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).



5.5 Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por ácido acético 30%

A lesão gástrica induzida pelo ácido acético produziu uma média de área lesada de $8,69 \pm 1,27$ (grupo veículo), e o omeprazol foi capaz de reduzir a área de lesão em 72,59% ($2,04 \pm 0,69$) quando comparado ao veículo. O tratamento com o EEAS (100mg/Kg, v.o.) foi capaz de promover melhora no processo de resolução da lesão gástrica reduzindo a área de lesão em 57,53% ($3,80 \pm 0,43$) (Figura 15, apêndice A, Tabela 15). A Figura 16 demonstra o ganho e perda de massa corpórea dos animais durante os 14 dias de tratamento. A Figura 17 e 18 representa o consumo de ração e água durante o período em que os animais foram tratados. Tanto a massa corpórea, consumo de ração e água não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos tratados.

Figura 15 - Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por ácido acético 30%. Após a indução da úlcera gástrica crônica por ácido acético 30%, os animais foram tratados por um período de 14 dias com veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100mg/Kg, v.o.). A diferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste Student Newman-Keuls, onde ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao grupo veículo.

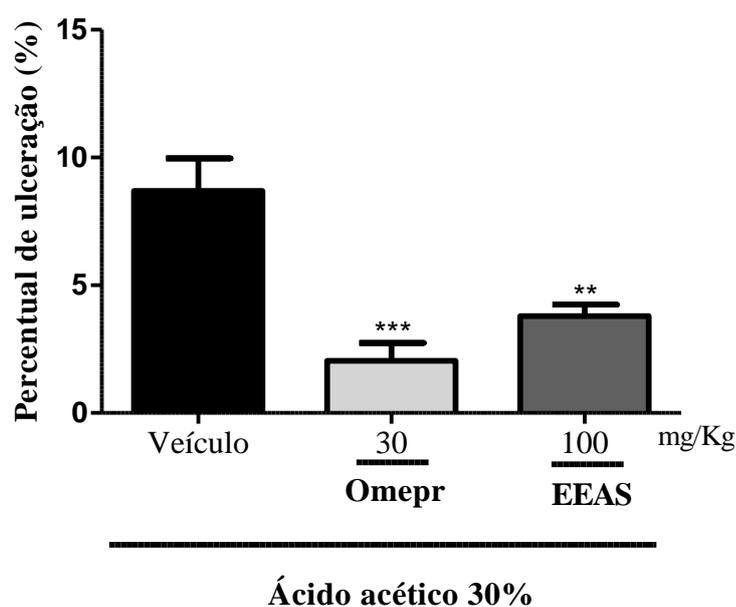


Figura 16: Gráfico representativo do ganho de massa corpórea dos animais tratados com veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100mg/Kg, v.o.), durante o período de 14 dias. (ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).

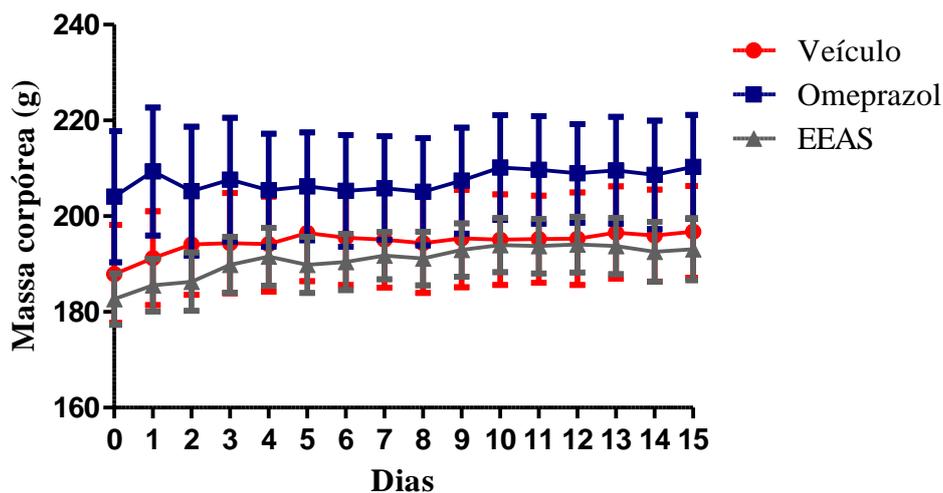


Figura 17: Gráfico representativo do consumo de ração dos animais tratados com veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100mg/Kg, v.o.), durante o período de 14 dias. (ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).

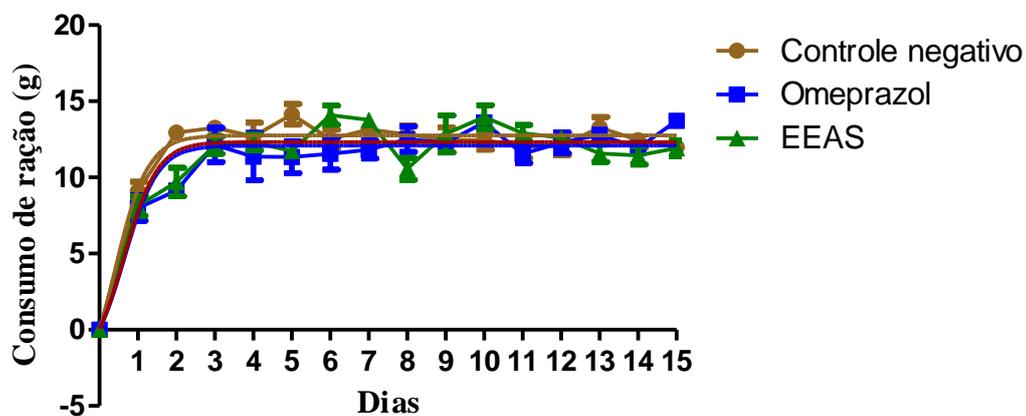
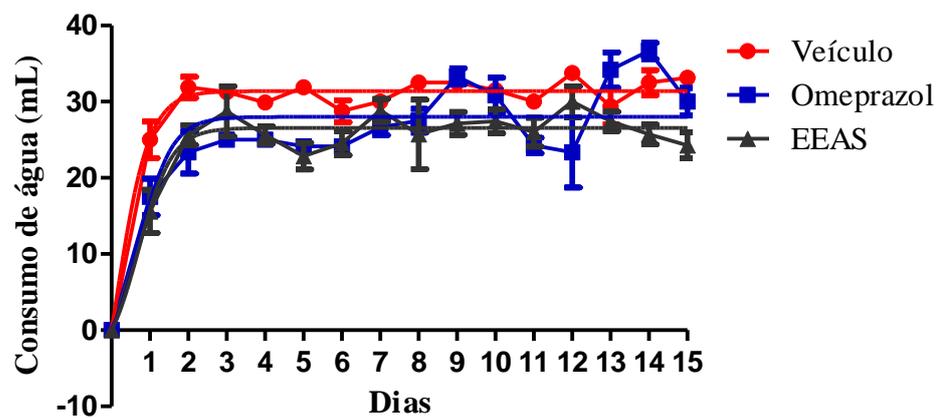


Figura 18: Gráfico representativo do consumo de água dos animais tratados com veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100mg/Kg, v.o.), durante o período de 14 dias. (ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).



6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Muitas plantas ainda não foram estudadas quanto à sua eficácia terapêutica, mas o conhecimento tradicional sobre as mesmas já as tornou parte integrante da prática médica popular, sendo utilizadas por até 90% da população economicamente carente do Nordeste, para a cura de seus problemas de saúde (MATOS, 2002).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de teste pré-clínicos com animais (CECHINEL FILHO, 1998).

BRITO e colaboradores (2008), realizaram análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa*, apresentando positividade para alcaloides, flavonoides, flavononas, triterpenóides, esteroides, flavonas, flavonóis, xantonas, saponinas, taninos e resinas. As classes de metabólitos identificadas nesse trabalho (flavonoides, taninos e alcaloides) corroboram com os dados da análise fitoquímica do artigo mencionado.

A utilização de extratos como agentes antimicrobianos apresenta um baixo risco ao aumento da resistência microbiana, por que são misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade microbiana (DAFERERA *et al.*, 2003; MATIAS *et al.*, 2010).

O extrato bruto e frações (hexânica, acetato de etila, metanólico) da *A. squamosa* não apresentaram atividade antibacteriana relevante do ponto de vista experimental. No entanto demonstrou um efeito sinérgico junto aos aminoglicosídeos testados. Os flavonoides presentes no EEAS provavelmente sejam responsáveis pelo efeito potencializador.

Segundo HELANDER *et al.* (1998); MATIAS *et al.* (2011), diversos constituintes do extrato podem aumentar a permeabilidade da membrana da célula, potencializando o efeito dos antibióticos através do aumento da penetração.

Os resultados apresentados indicam que a *A. squamosa* (Annonaceae) pode ser utilizada como uma alternativa de origem natural com potencial adjuvante de antibióticos, para o combate da resistência microbiana.

Em estudos realizados por PATEL & KUMAR (2008), screening antimicrobiano da *Annona squamosa*, os autores observaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, sendo bactérias Gram negativa e

Gram positiva e associaram essa atividade a presença de flavonóides na planta. Os resultados não coincidiram com os obtidos nesse trabalho. Essa diferença nos resultados pode ser devido à variação de cada técnica (NG *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1999). PATEL & KUMAR (2008), utiliza o método de difusão em ágar descrito por FYHRQUIST *et al.*, (2002) e o nosso estudo utiliza o método da microdiluição em caldo, atualmente considerado o mais apropriado para determinação da sensibilidade pela NCCLS (2003), já que o método da difusão em ágar pode levar a resultados enganosos. Análise comparativa de métodos foi realizada por GREGER & HADACEK (2000) e esta aponta a microdiluição como um método eficiente de determinação da concentração inibitória mínima.

KOTKAR *et al.*, (2001) realizaram análise da atividade antimicrobiana e pesticida de flavonóides parcialmente purificados das folhas da *Annona squamosa*, frente a duas linhagens de *Pseudomonas* e *Bacillus* e uma de cada de *Cellulomonas* e *Aspergillus*. Os resultados dessa pesquisa atribuem a atividade antimicrobiana dos flavonóides a uma alteração na membrana estrutural dos microorganismos testados.

A combinação de produtos naturais com drogas antimicrobianas clássicas resultando em efeito potencializador tem sido investigada em outras plantas da família Annonaceae. Foi evidenciado sinergismo de componentes presentes nas folhas da *Annona muricata* (Annonaceae) junto a alguns aminoglicosídeos (canamicina, gentamicina, amicacina e neomicina) frente às linhagens bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*. (BENTO, 2010).

Devido à alta incidência de doenças gastrointestinais tais como úlceras pépticas, refluxo gastresofágico, síndrome de Zollinger – Ellison e gastrite, a pesquisa experimental e clínica vêm se tornando foco de investigação para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (WHITTLE, 2004).

YADAV e colaboradores (2011), avaliaram o efeito antiulcerogênico do extrato etanólico dos galhos da *Annona squamosa* induzida por etanol absoluto, aspirina, ligação pilórica, histamina e contenção ao frio. Em todos os modelos avaliados o extrato etanólico dos galhos apresentou percentual de proteção superior a 50%, demonstrando um efeito gastroprotetor significativo.

Para o estudo da atividade gastroprotetora do extrato obtido das folhas da *A. squamosa*, utilizou-se os modelos de indução de lesões gástricas aguda por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina. O pré- tratamento do EEAS nas doses

testadas protegeu a mucosa dos animais contra a formação de lesões gástricas induzidas por um agente necrosante (etanol), similarmente ao omeprazol (inibidor da bomba de prótons). Sugerindo uma ação citoprotetora eficiente dos princípios ativos presentes nesse extrato. Nas lesões induzidas pelo etanol acidificado, o EEAS também foi capaz de promover uma inibição no percentual de área gástrica ulcerada semelhante ao omeprazol droga que tem mostrado possuir atividade citoprotetora (YUJI NAITO, 2007) e antioxidante (PARAMESWARI *et al.*, 2010; HIGUCHI *et al.*, 2009).

O modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol absoluto tem sido utilizado para estudar efeitos gastroprotetores de diferentes compostos, e os mecanismos envolvidos na úlcera gástrica aguda. Entretanto este modelo não representa integralmente a patologia humana, em que as lesões gástricas em roedores são superficiais, múltiplas e induzidas por diferentes mecanismos. Este modelo ainda possui grande relevância e continua sendo muito utilizado em estudos experimentais (POTRICH, 2009).

O etanol é um agente necrotizante de ação direta na mucosa gástrica e induz lesões gástricas através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, danos no endotélio vascular, desordem da microcirculação e isquemia, com consequente produção de radicais livres, acarretando no aparecimento de lesões gástricas hemorrágicas. Além disso, o etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos e inibição da síntese de prostaglandinas, resultando na produção de muco (PAN *et al.*, 2008).

O consumo de álcool pode gerar erosão gástrica hemorrágica aguda em humanos, sendo que o consumo crônico pode resultar em gastrite, caracterizada por edema da mucosa, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (MATSUHASHI *et al.*, 2007).

Os animais que foram tratados com EEAS antes da indução das lesões com indometacina apresentaram menor área lesada na mucosa gástrica, em comparação ao grupo não tratado. A inibição da ciclooxigenase pela indometacina, um antiinflamatório não – esteroideal, promove a diminuição da produção de prostaglandinas, que são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica através da inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição da

apoptose, aumento ou manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa e assim prevenindo a isquemia (ATAY *et al.*, 2000).

Os AINES estão entre os fármacos mais utilizados e que mais desencadeiam efeitos indesejáveis. A maioria desses efeitos relaciona-se ao sistema digestório, destacando-se a capacidade de causar principalmente gastrite aguda, dispepsia e úlcera péptica (MORAIS *et al.*, 2009).

As prostaglandinas I₂ e E₂ inibem a enzima adenililciclase, que inibida deixa de ativar a proteína-quinase, que conseqüentemente deixa de estimular a bomba de prótons responsável pela liberação de ácido gástrico. Com a administração de AINES, a síntese de prostaglandinas fica alterada e, portanto a secreção de ácido aumentada, além da alteração na estimulação de muco, da secreção de bicarbonato e na circulação sanguínea da mucosa gástrica (CHAMPE *et al.*, 1998).

Lesões da mucosa gástrica causadas por ingestão de álcool, AINEs e ácido acético, têm sido mediadas pela geração de EROs (MOTAWI, *et al.*, 2008). As espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) é uma expressão que inclui radicais de oxigênio, são produzidas como produto do metabolismo celular normal e podem induzir dano e, eventualmente, a morte celular (POTRICH, 2009). Por sua larga influência nos sistemas biológicos, as EROs tem despertado o interesse dos pesquisadores, que buscam evitar sua formação. Em geral enzimas antioxidantes impedem os danos causados pelos radicais livres no interior das células (BAYIR, 2005).

Segundo HODEK *et al.*, (2002), as propriedades antioxidantes de flavonóides e taninos são relacionados com suas atividades antiulcerogênicas. Os flavonóides atuam como antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais. Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonóides encontradas universalmente na natureza (HARBONE & WILLIAMS, 2000).

Estudos demonstraram que flavonóides são capazes de proteger a mucosa gástrica de substâncias necrotizantes e podem ser úteis no tratamento de úlceras gástricas agudas e crônicas (ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2005).

SHIRWAIKAR e colaboradores (2004) confirmaram o potencial antioxidante das folhas de *Annona squamosa* em diferentes modelos *in vitro*. Essa atividade

antioxidante foi atribuída à presença de flavonóides como rutina e hiperosídeo nas folhas.

Vários estudos têm demonstrado a eficácia de agentes antioxidantes como protetores da mucosa gástrica em vários modelos de indução de úlceras gástricas. A ação protetora do EEAS pode estar relacionada com a presença de flavonoides e taninos no extrato, que por sua vez possuem propriedades antioxidantes. Entretanto outros possíveis mecanismos de defesa estão relacionados à ação gastroprotetora do EEAS.

O EEAS não demonstrou ação dose- dependente, visto que as doses (100 e 300 mg/Kg) administradas não apresentaram diferença estatística significativa. Segundo KHENNOUF e colaboradores (2003) a falta de efeito dose-dependente pode ser devido a uma composição complexa do extrato, no qual a presença de alguns compostos no extrato podem antagonizar o efeito de outros compostos. Com base nos resultados obtidos, em que o efeito gastroprotetor do EEAS foi evidenciado nos modelos experimentais realizados, foi selecionado uma única dose do extrato para a investigação dos prováveis mecanismos de ação envolvidos na ação gastroprotetora do EEAS. A dose selecionada foi à menor dose efetiva (100 mg/Kg), baseada em análise estatística.

Entre os vários mecanismos envolvidos na integridade da mucosa gástrica e proteção contra erosões provocadas pelo etanol, o estudo foi direcionado para o envolvimento do óxido nítrico endógeno, canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), prostaglandinas (PGs), canais α -adrenérgicos, receptores histamínicos (H_2) e motilidade gastrointestinal.

O efeito gastroprotetor do EEAS contra a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos foi revertido pelo tratamento com L-NAME (um inibidor não específico das enzimas NO sintetases). De forma semelhante a L-arginina (um substrato da NO sintetase) apresentou seu efeito gastroprotetor bloqueado pela ação do L-NAME, quando comparado ao grupo de animais que recebeu somente L- arginina. Esses resultados sugerem que o efeito do EEAS depende de NO, pois o bloqueio do NO foi capaz de reverter sua ação gastroprotetora. Ao inibir a síntese de NO, ocorre a diminuição da perfusão sanguínea gástrica, diminuição na secreção de muco, aumento na secreção gástrica e aumento da peroxidação lipídica causada por atuação de EROs.

Existe na literatura uma controvérsia sobre o papel do NO como oxidante ou antioxidante (ITURRY-YAMATTO, et al., 1997). A presença do NO em baixas concentrações está associada aos efeitos benéficos no TGI, enquanto o NO em altas concentrações pode induzir a formação de radicais derivados do nitrogênio que são altamente tóxicos (WALLACE *et al.*, 2001).

O efeito antioxidante do NO produzido pela e-NOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O_2^- disponível e conseqüentemente a produção de $ONOO^-$. O NO também induz a síntese de ferretina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de O_2^- (DUSSE *et al.*, 2003).

A função do NO na regulação do fluxo sanguíneo gástrico, que participa na manutenção da integridade da mucosa, tem sido objeto de vários estudos (KWIECIEN *et al.*, 2002 b). O óxido nítrico reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, além de facilitar a cicatrização do tecido lesado. A inibição da sua síntese aumenta a susceptibilidade do estômago à injúria provocada por agentes como o etanol (MASUDA *et al.*, 1995; KAWANO & TSUJI, 2000). Este efeito pode estar ocorrendo devido ao aumento do fluxo sanguíneo da mucosa promovido pelo NO (WALLACE *et al.*, 1996) ou ainda por promover um aumento na liberação de muco gástrico (BROWN *et al.*, 1992).

Estudos clínicos têm demonstrado que a co-administração de agentes doadores de NO com AINEs podem proteger contra a indução da úlcera pelos AINEs, e a combinação aos AINEs de uma molécula que libere NO pode resultar em menos dano a mucosa, quando comparada com os tradicionais inibidores de COX, e podem até aumentar a reparação do tecido mucoso (SHAH *et al.*, 2002). Sabe-se que o NO é capaz de atuar adicionalmente (sinergismo) ao efeito gastroprotetor das prostaglandinas, estimulando a vasodilatação e permeabilidade vascular (KHATTAB *et al.*, 2001).

O tratamento com a glibencamida, bloqueador dos canais de K^+ dependentes de ATP, não inibiu o efeito gastroprotetor do EEAS, diferentemente do diazóxido que teve seu efeito gastroprotetor revertido. Isso evidencia que a atividade gastroprotetora do EEAS parece ser independente da ativação dos canais K^+ dependentes de ATP.

Os canais de potássio estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas do estômago e que pode ser inibida por diversos agentes dentre eles a

glibenclamida (PESKAR *et al.*, 2002). A participação dos canais de K^+ dependentes de ATP exerce sua função através do relaxamento da musculatura lisa, causando vasodilatação, sobre a secreção do ácido e o fluxo sanguíneo do estômago.

O EEAS manteve seu efeito gastroprotetor na presença da ioimbina, demonstrando que essa não é a via pelo qual o EEAS possui ação protetora da mucosa gástrica. A clonidina, agonista parcial sobre os receptores α_2 -adrenérgicos, teve seu efeito inibido pela ioimbina. A ioimbina é um alcalóide indólico que promove a liberação de neurotransmissores, bloqueando os receptores α_2 pré-sinápticos (HOFFMAN, 2007). Esse resultado demonstra que o EEAS age por vias diferentes dos receptores α_2 -adrenérgicos.

Nesse estudo, o tratamento com histamina não bloqueou o efeito gastroprotetor do EEAS. A histamina, originária de neurônios histaminérgicos, mastócitos ou células ECL, quando liberada estimula diretamente a secreção ácida através da interação com receptores H_2 das células parietais. A ranitidina é um antagonista dos receptores H_2 , bloqueia de forma competitiva a liberação ácida induzida pela histamina a partir das células parietais (SCHUBERT, 2004). O efeito gastroprotetor da ranitidina foi revertido em associação à histamina. Foi evidenciado que os princípios ativos do EEAS não agem inibindo a acidez da secreção gástrica através dos receptores histamínicos da célula parietal, pois o extrato mesmo combinado a histamina manteve seu efeito protetor gástrico.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que o tratamento com indometacina foi capaz de reverter o efeito protetor do EEAS, sugerindo que esse efeito gastroprotetor esteja envolvido com o papel das prostaglandinas.

Para caracterizar uma possível participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EEAS, foi utilizado o misoprostol, um análogo das prostaglandinas do tipo E1 (PGE1), bem como a indometacina, um inibidor não seletivo da COX. O misoprostol foi capaz de inibir significativamente o aparecimento de lesões gástricas quando comparado ao grupo veiculo lesionado. O misoprostol inibe a secreção ácido gástrica, aumenta o fluxo sanguíneo da mucosa e a secreção de muco e bicarbonato (RANG *et al.*, 2004), mas apresenta efeitos colaterais como diarreia e cólicas abdominais, além disso, é um abortivo em potencial (HOOGERWERF & PASRICHA, 2003).

As prostaglandinas (PGs), como descrito anteriormente, inibem a secreção ácida gástrica estimulada pela alimentação, histamina ou gastrina e reduzem o volume de secreção, a acidez e o conteúdo de pepsina. As prostaglandinas são vasodilatadoras na mucosa gástrica e parece que estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo local. A secreção de muco no estômago e intestino delgado é aumentada pelas PGEs. Estes efeitos ajudam a manter a integridade da mucosa gástrica, conferem proteção às células epiteliais e são referidos como propriedades citoprotetoras das prostaglandinas sintetizadas pela COX-1. De fato, os efeitos adversos gastrintestinais dos AINEs estão associados à supressão da expressão constitutiva da COX-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia e ulceração (MORROW & ROBERTS, 2001; PIPER & VANE 1971; COHN *et al.*, 1997).

Os resultados do presente trabalho sugerem a relação entre o efeito protetor gástrico do EEAS e o envolvimento das prostaglandinas e do óxido nítrico. Segundo ZAYACHKIVSKA *et al.*, (2004) e BRZOZOWSKI *et al.*, (2005), algumas substâncias derivadas de plantas como os flavonoides, podem atenuar lesões gástricas induzidas por álcool, através da ativação da via das prostaglandinas, óxido nítrico e supressão da peroxidação lipídica. Possivelmente a atividade gastroprotetora da espécie *Annona squamosa* esteja agindo através das vias citadas.

O EEAS não promoveu proteção da mucosa gástrica através do aumento da motilidade gastrointestinal, não houve alteração de forma significativa no trânsito intestinal dos camundongos quando comparado ao grupo veículo e o grupo que recebeu atropina. A atropina é um bloqueador da ação muscarínica da acetilcolina. A via colinérgica que inerva a camada de músculo circular do TGI, atuando nos receptores M1 e M3, é a principal responsável pela motilidade gastrontestinal (HANSEN, 2003)

Neste sentido verificou-se a ausência de efeito do EEAS sobre o sistema colinérgico, no mecanismo de ação gastroprotetor, pois o extrato da *A. squamosa* não foi capaz de aumentar o esvaziamento gástrico, fazendo com que o efeito agressor do ácido reduzisse.

O modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético foi introduzida pela primeira vez por TAKAGI *et al.*, (1969), é um modelo que permite avaliar o processo de cicatrização.

No modelo de úlcera crônica os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento dos animais por 14 dias com EEAS reduziu significativamente a úlcera

gástrica induzida por ácido acético 30%, demonstrando um efeito cicatrizante. De maneira semelhante, o tratamento com o omeprazol também protegeu a mucosa gástrica das lesões causadas pelo ácido acético. Os taninos presentes no extrato das folhas da *A. squamosa* podem estar relacionados com o potencial cicatrizante.

SANTOS & MELLO, (2000), relataram que no processo de cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos formam uma camada protetora sobre a mucosa ou tecido lesado, através do complexo tanino-proteína. Provavelmente ocorra de maneira similar na úlcera gástrica, em que a camada protege a mucosa gástrica.

As úlceras produzidas por ácido acético são similares às úlceras crônicas humanas em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização (TAKAGI *et al.*, 1969). A lesão por ácido acético ocorre por alterações de múltiplos fatores incluindo alterações nos níveis de prostaglandinas, de fatores de crescimento, óxido nítrico e citocinas, além das mudanças no padrão de aderência do muco e alterações na microcirculação (KOBAYASHI *et al.*, 2001). A cicatrização da úlcera também é um processo complexo, que envolve 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 (TARNAWSKI, 2005).

No estudo realizado para avaliar o ganho de peso dos animais, consumo de ração e consumo de água, os resultados apresentaram que não houve diferença significativa entre os animais tratados de cada grupo, como também não houve diferença significativa entre os grupos tratados durante o período de 14 dias. Isso demonstra que a indução da úlcera crônica nos animais não interferiu no peso, consumo de ração e água.

Os flavonoides e taninos presentes na espécie *Annona squamosa* possivelmente são os responsáveis por agir de forma sinérgica tanto nos testes antibacterianos como gastroprotetores, tornando a *A. squamosa* uma fonte em potencial para novos estudos que comprovem sua utilização como uma forma alternativa para o tratamento de desordens ácidas-pépticas.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* (EEAS):

- Apresentou as classes de metabólitos secundários: taninos condensados; flavonas, flavonóis, xantonas; chalconas, auronas, catequinas, flavononas e alcalóides;
- Não demonstrou atividade antimicrobiana clinicamente significativa pela técnica de microdiluição, com valores de CIM >1024, entretanto o EEAS apresentou ação moduladora frente aos aminoglicosídeos testados;
- Apresentou atividade gastroprotetora em modelos de lesão gástrica aguda induzida por etanol, etanol acidificado e indometacina em camundongos;
- O estudo dos possíveis mecanismos de ação gastroprotetora do EEAS demonstrou que a atividade parece ser dependente de óxido nítrico e prostaglandinas;
- Não alterou a motilidade intestinal;
- Demonstrou atividade gastroprotetora em modelo de lesão gástrica crônica induzida por ácido acético.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M. E.; CZIMMER, J.; DEBRECENI, A.; SZOLCSÁNYI, J.; MÓZSIK, G. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 95, p. 105-127, 2001.
- 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.
- AMADOR, M. C. V.; RODRÍGUEZ, F. M.; RODRÍGUEZ, Z. M.; GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L. Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 11, n° 1, p. 1-12, 2006.
- AMIEVA, M. R.; EL-OMAR, E. Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. **Gastroenterology**, v. 134, p. 306–323, 2008.
- ARAÚJO, J. F.; ARAÚJO, J. F.; ALVES, A. A. C. **Instruções técnicas para o cultivo da pinha (*Annona squamosa* L.)**. Salvador : EBDA,. il. (EBDA – Circular técnica, n.7). p. 44, 1999.
- ARAÚJO, K.P.C.; BLAZQUEZ, F.J.H. Anatomia microvascular do estômago canino e lesão gástrica provocada por antiinflamatórios não esteroides. **Brazilian. Journal of veterinary Research and animal Science**, São Paulo, v.44, p. 14-18, 2007.
- ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and stomach. **Prostaglandins & Others Lipids Mediators**, v. 61, n° 3-4, p.105-124, 2000.
- BAYR , H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, n° 12, p. 498-501, 2005.
- BEENA, J.; REMANI, P. Antitumor constituents from *A. squamosa* fruit pericarp. **Medicinal Chemistry Research**, v. 17, p. 345-355, 2008.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia: 5ª Edição**. Rio de Janeiro: Elsevier, 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**), 2010. Dissertação de mestrado – Universidade Regional Cariri- URCA, Crato.

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, n°3, p. 180-84, 2008.

BROWN, J.F.; HANSON, P.J.; WHITTLE, B.J. Nitric oxide donos increase mucs gel thickness in rat stomach. *Eur. J. Pharmacology.*, v.223, p. 103-4, 1992.

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

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, S.J.; ZAYACHIVSKA, O.; PAJDO, R.; KWIECIEN, S.; PAWLIK, W.W.; HAHN, E.G. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol-and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and nerve pathways. **Word Journal of Gastroenterology**, v. 11, n°41, p. 6450-6058, 2005.

BULUT, R.; UNLUCERCI, Y.; BEKPINAR, S.; KUNTSAL, L. Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺/ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanol induced injury in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 7, p. 1417-1422, 1999.

Bulletin of the World Health Organization. **Regulatory situation of herbal medicines**. A world wide review, Geneva, 1998.

CALATAYUD, S.; SANZ, M.J.; CANET, A.; BELLO, R.; DE ROJAS, F.D; ESPLUGUES, J.V. Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. *British Jornal of Pharmacology*, v.127, p. 1111-18, 1999.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamento. **Ciência e Cultura**, v. 55, n° 3, p. 37-39, 2003.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; MYCEK, M. J. **Farmacologia ilustrada**. 2ed. Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 1998.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of 18-acetoxy-ent-kaur-16-ene from *Annona squamosa* L. bark. **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 111-115, 2011.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n°1, p.99-105, 1998.

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

COHN S. M.; SCHLOEMANN S.; TESSNER, T.; SEIBERT, K.; STENSON, W. F. Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n° 6, p. 1367-1379, 1997.

COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F.; SILVA, V. S. F.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUEZ, M. O. M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; SILVA, M. S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n° 2, p. 245-248, Abr./jun. 2008.

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.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. 18.ed. New York: Columbia University Press,. P. 1262, 1981.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DAVIES, A.; BLAKELEY, A. G. H.; KIDD, C. **Fisiologia humana**, Porto Alegre: Ed. Artmed, p. 821- 827, 2002.

DENNINGER, J.; MARLETTA, M. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 334-350.7. Stamler J, Lamas S, Fang F. Nitrosylation: the prototypic redoxbased signaling mechanism. **Cell**, v.106, p.675-683, 2001.

DING, M.; KINOSHITA, Y.; KISHI, K.; NAKATA, H.; HASSAN, S.; KAWANAMI, C.; SUGIMOTO, Y.; KATSUYAMA, M.; NEGISHI, M.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A.; CHIBA, T. Distribution of prostaglandin receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, v. 53, n° 3, p. 199-216, 1997.

DJAHANGUIRI, B.; SCAND, J. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p. 265-257, 1969.

DONADIO, L.C. **Situação atual e perspectivas das anonáceas**. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I. V. B.; MORAES, O. M.; REBOUÇAS, T. N. H. (eds). Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia, cherimóia). Vitória da Conquista, UESB, Brasil, p. 1-4, 1997.

DONG, M. H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, n° 6, p. 599-606, 2006.

DUSSE, L. M.S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina laboratorial*, v.39, n° 4, p. 343-350, Rio de Janeiro, 2003.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M.; OCRY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n° 3, p. 236-256, 2003.

FERNANDES, M. Z. L. C. M.; FERNANDES, R. M.; BRITO, D. R. B.; BORBA, H. R. Efeito anti-helmíntico dos extratos aquosos e etanólicos da *Annona squamosa* L. (Fruta-do-conde) sobre o nematóide *Ascaridia galli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 11, n° 2, p. 124-129, 2009.

FLEMSTRÖM, G.; ISENBERG, J. I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. **News Physiological Sciences**, v. 16, p. 23-28, 2001.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, C.A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 169-177, 2002.

GREGER, H.; HADACEK, F. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n° 3, p. 137-147, 2000.

GUEDES, M. M.; CARVALHO, A. C. S.; LIMA, A. F.; LIRA, S. R. S.; QUEIROZ, S. S.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective Mechanisms of Centipedic Acid, a Natural Diterpene from *Egletes viscosa* Less., **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n° 7, p. 1351-1355, 2008.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ed. Medicina Nacionalis, Ed. Elsevier, 2011.

HANSEN, M. B. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. **Physiological research**, v. 52, p. 1-30, 2003.

HALTER, F.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M. Review: Cyclooxygenase 2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut*. v.49, p. 443-453, 2001.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n° 6, p. 481-504, 2000.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p. 894-901, 2008.

HIGUCHI, K.; YODA, Y.; AMAGASE, K.; KATO, S.; TOKIOKA, S.; MURANO, M.; TAKEUCHI, K.; UMEGAKI, E. Prevention of NSAID-Induced Small Intestinal Mucosal Injury: Prophylactic Potential of Lansoprazole. **Journal of Nutrition Biochemistry**, september, v. 45, n° 2, p. 125-130, 2009.

HIRUMA- LIMA, C. A.; DI STASI, L. C. Magnoliales medicinais. In: GUIMARÃES, M. E.; SANTOS, M. N.; DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônica e na Mata Atlântica**. 2ed. São Paulo: UNESP, p. 89-109, 2003.

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. Fármacos antagonistas dos adrenorreceptores. In: Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10ed. São Paulo: McGraw-Hill. P. 127-141, 2007.

HOGBEN, C. A. M.; KENT, T. H.; WOODWARD, P. A.; SILL, A. J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guine pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, p. 1143-1154, 1974.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, Joel Hardman e Lee E. Limbird, 10 ed., Rio de Janeiro, 2003.

ITURRY-YAMAMOTO, G.; ALVES, A. A.; PICON, P. D. Propriedades anti-aterogênicas do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 69, n° 5, p. 349-357, 1997.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. ***Bioorganic and Medicinal Chemistry***, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by α -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. ***Life Sciences***, v. 80, p. 1040 - 1045, 2007.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, 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. 107–3113, 1996.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p 777, 2002.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 94, p. 93–100, 2004.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review ingastrointestinal injury and protection. ***Journal of Gastroenterology and Hepatology***, v. 15 (Suppl): D1-D6, 2000.

KEMPRAJ, V.; BHAT, S. K. Acute and reproductive toxicity of *Annona squamosa* to *Aedes albopictus*. ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, v. 100, p. 82-86, 2011.

KHATTAB, M.; GAD, M. Z.; ABDALLAH, D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. ***Pharmacology Research***, v.43, p. 463-467, 2001.

KHENNOUF, S.; BENABDALLAH H.; GHARZOULI, K. Effect of Tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* Leaves on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1469-1473, 2003.

KIM, D.H.; BAE, E.A.; HAN, M.J. Anti-helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 422-444, 1999.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting 76 neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacology Research**, v. 43, p. 23-30, 2001.

KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; SADAN, S. V. G. S.; JHA, S. R.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Antimicrobial and Pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, p. 33-7, 2001.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; 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, p. 761-73, 2002 b.

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. S2-S4, 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.

LARSSON, S.; BACKLUND, A.; BOHLIN, L. Reappraising a decade old explanatory model for pharmacognosy. **Phytochemistry Letters**, v. 1, p. 131-134, 2008.

LEITE, J. P. V.; FERNANDES, J. M.; FAVARO, L. V.; GONTIJO, D. C.; MAROTTA, C.P. B.; SIQUEIRA, L. C.; MAIA, R. T.; GARCIA, F. C. P., Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. **MG.BIOTA**, v. 1, n° 4, p. 16-34, 2008.

LINZ, B.; SCHUSTER, S.C. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms.

Research in Microbiology, v. 158, p. 737-44, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA, JR. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n° 3, p. 429-38, 2002.

MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; MARZOCCA, C.; MANNAIONI, P. F.; SALVEMINI, D. Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischaemia and reperfusion injury *in vivo*. **British Journal Pharmacology**, v. 136, p. 905–17, 2002.

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.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenaceae* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n° 3, p. 294-298, jul./set. 2010.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A. **International Journal of Experimental and Clinical Chemotherapy**, v. 57, n° 4, p. 305-309, 2011.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 4. ed. rev. Fortaleza, UFC/SEBRAE, 2002.

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.

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; WATANABE, S. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 434 – 441, 2007.

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 3060-371, 2001.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. **Japanese Journal Pharmacology**, v. 44, n°1, p. 43-50, 1987.

MOJŽIŠ, J.; HEGEDÜŠOVÁ, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. **Physiological Research**, v. 49, p. 441-446, 2000.

MORAIS, T. M. H.; KUSHIMA, F. C.; MOLEIRO, R. C.; SANTOS, L. R. M.; ROCHA, M. O.; MARQUES, W.; VILEGAS, C.A. HIRUMA-LIMA. **Chemico Biological Interactions**, v. 180, p. 499-505, 2009.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of trepenone and cimetidine. **Japanese Journal Pharmacology**, n. 57, p. 497-505, 1991.

MORITA, H.; IIZUKA, T.; CHOO, C. Y.; CHAN, K. L.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4609-4611, 2006.

MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J. Lipid-Derived Autacoids. Eicosanoids and Platelet-Activating Factor, em: HARDMAN JG, LIMBIRD LE, GILMAN AG - Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York, McGraw-Hill, p. 669-685, 2001.

MOTAWI, T. K.; ELGAWAD, H. M. A. SHAHIN, N. N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 15, p. 405 – 412, 2008.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NG, T. B.; LING, J. M.; WANG, Z.T.; CAI, J. N.; XU, G. J. Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. **General pharmacology**, v. 27, p. 1237- 1240, 1996.

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.

PASSOS, M. C. F. Infecção pelo *Helicobacter pylori*: prevalência e associação com lesões gástricas. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n° 2, abr/jun, 2007.

PARAMESWARI, R. P.; VASANTHKUMAR, M.; GAYATHRI, V.; MINIKANDAMATHAVAN V. M.; RAMAKRISHNAN, G.; SANGEETHA, M. K.; VIJAYAKUMAR, V.; RAGHAVENDRAN, H. B.; CHAMUNDEESWARI, D.; VASANTHI, H. R. Prophylactic Role of Herbomineral Drug “Thamira parpam” Against Cysteamine-Induced Oxidative Stress in liver and Duodenum of Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 18, 2010.

PATEL, J. D.; KUMAR, V. *Annona squamosa* L.: Phytochemical analysis and Antimicrobial Screening. **Journal of Pharmacy Research**, v. 1, p. 34-38, 2008.

PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. **Journal Pharmacology. Experimental Therapeutics**, v. 301, p. 969-974, 2002.

PIPER P, VANE J. The release of prostaglandins from lung and other tissues. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 180, p. 383-385, 1971.

POTRICH, F. B. **Atividade Gastroprotetora do Extrato Bruto Hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.: Envolvimento do Sistema Antioxidante**. 2009. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Paraná, Setor Ciências Biológicas, Curitiba.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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.

RAJ, D. S.; VENNILA, J. J.; AIYAVU, C.; PANNEERSEKVAM, K. The hepatoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on

experimentally induced liver injury in *swiss* albino mice. **International Journal of Integrative biology**, v. 5, p. 182-186, 2009.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

LINZ, B.; SCHUSTER, S. C. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. **Research in Microbiology**, v. 158, p.737-44, 2007.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present Day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43-49, 2008.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. **Gastroenterology**; v. 77, p. 761-767, 1979.

ROBERTS, S.; MCDONALD, I. M. In: ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, 6 ed. New Jersey: John Wiley, v. 4, p. 86–121, 2003.

SATO, Y.; SHIBATA, H.; YAMAMOTO, A.; OKIMURA, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* to β – lactam antibiotics. **International journal of antimicrobial agents**, v. 24, . 28-35, 2004.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC, cap. 24, p. 517-544, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n° 7, p. 995-1014, 2005.

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, n° 7, p. 1842-1860, 2008.

SHAH, V.; KAMATH, P.; DE GROEN, P. Physiology of the splanchnic circulation. In: **Theory and practice of vascular diseases** (Topol E, Lanzer F, eds). p. 1688- 1694, Germany: Springer Verlag, 2002.

SHIRWAIKAR, A.; RAJENDRAN, K.; DINESH, K. C. In vitro antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n° 8, p. 803-807, 2004.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKER, P. E.; GOSMAN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. ver.ampl. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SIRAKI, A.G.; POURAHMAD J.; CHAN, T.S.; KHAN, S.; O'BRIEN, P. J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes, **Free Radical Biological Medicine**, v. 32, pg. 2–10, 2002.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2ª Ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 640, 2008.

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.

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.; SUZUKI, K.; ARAKI, H.; MIZOGUCHI, H.; SUGAMOTO, S.; UMDEDA, M. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 93, p. 423-431, 1999.

TARNAWSHI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, n° 1, p.24-33, 2005.

WALLACE, J. L.; GRANGER, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **Faseb Journal**, v. 10, p. 731-740, 1996.

WALLACE, J. L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **American Journal Medicine**, v. 110, p. 19S-23S, 2001.

_____. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest it self?. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547 – 1565, 2008.

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.

WHITTLE, B. J. R. Mechanisms underlying intestinal injury induced by antiinflammatory COX inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 427-439, 2004.

YADAV, D. K.; SINGH, N.; DEV, K.; SHARMA, R.; SAHAI, M.; PALIT, G.; MAURYA, R. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**, v. 82, p. 666-675, 2011.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflammation research**, v. 55, p. 359-363, 2006.

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

YUJI NAITO. Anti-inflammatory and Anti-oxidative Properties of Proton Pump Inhibitors. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 41, n°2, p. 82-83, 2007.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; BRZOZOWSK, T.; GZHEGOTSKY, M. R. Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. **Fiziologicheskii Zhurnal**, v. 50, p. 118-127, 2004.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSK, T.; GZHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in

plants extracts. **Journal of Phisiology and Pharmacology**, v. 56, n° 1, p. 219-231, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Tabelas de resultados sobre os testes de gastroproteção

TABELA 6 - Efeito do EEAS no modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE mg/Kg (v.o.)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)	% INIBIÇÃO
Veículo	_____	20,62 ± 1,62	_____
Omeprazol	30	3,42 ± 0,63	81,78
EEAS	100	3,66 ± 1,55	76,58
EEAS	300	3,23 ± 0,84	81,69

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da porcentagem de área gástrica ulcerada, para 6 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1mL/10g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100 e 300mg/Kg, v.o.). Uma hora após os animais receberam 0,2mL de etanol absoluto. *** p< 0,001 vs grupo veículo (ANOVA e Test Student Newman Keuls).

TABELA 7 - Efeito do EEAS no modelo de lesão gástrica induzida por etanol acidificado em camundongos.

GRUPOS	DOSE mg/Kg (v.o.)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)	% INIBIÇÃO
Veículo	_____	24,83 ± 1,88	_____
Omeprazol	30	5,48 ± 0,81	75,09
EEAS	100	11,47 ± 0,76	54,19
EEAS	300	8,69 ± 1,18	63,03

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 6 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1mL/10g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100 e 300mg/Kg, v.o.). Uma hora após os animais receberam etanol acidificado (0,1mL/10g v.o.). *** p< 0,001 vs grupo veículo (ANOVA e Test Student Newman Keuls).

TABELA 8 - Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por indometacina (DAINE)

GRUPOS	DOSE mg/Kg (v.o.)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)	% INIBIÇÃO
Veículo	_____	10,67 ± 1,40	_____
Omeprazol	30	1,83 ± 0,47	80,92
EEAS	100	3,85 ± 0,82	61,27
EEAS	300	4,57 ± 0,84	55,14

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 6 animais/grupo. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1mL/10g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100 e 300mg/Kg, v.o.). Uma hora após a administração de indometacina (10mg/Kg, v.o.) e após três horas, foram repetidos os tratamentos com veículo, omeprazol e EEAS. *** p< 0,001 vs grupo veículo (ANOVA e Test Student Newman Keuls).

TABELA 9 - Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos

GRUPOS	DOSE mg/Kg (via)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)
Veículo	_____	21,54 ± 3,25
EEAS	100 (v.o.)	3,66 ± 1,55
L- arginina	600 (v.o.)	0,45 ± 0,14
L- NAME + EEAS	10 (i.p.) + 100 (v.o.)	15,07 ± 1,25
L- NAME + L- arginina	10 (i.p.) + 600 (v.o.)	20,75 ± 2,82

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 8 animais/grupo. Administrou-se tratamento com EEAS (100mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e L-arginina (600mg/Kg, v.o.) 1 hora antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100mg/Kg, v.o.) e L-arginina (600mg/Kg, v.o.) após 1h receberam L-name (10mg/Kg, i.p.) e decorridos 30min receberam etanol absoluto. ^ap< 0,001 vs veículo, ^bp< 0,001 vs L-arginina e ^cp<0,001 vs EEAS (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

TABELA 10 - Papel dos Canais de K⁺ dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE mg/Kg (via)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)
Veículo	_____	14,72 ± 2,39
EEAS	100 (v.o)	3,66 ± 1,55
Diazóxido	3 (i.p.)	2,61 ± 1,51
Glibenclamida + EEAS	5 (i.p.) + 100 (v.o)	2,64 ± 0,32
Glibenclamida + Diazóxido	5 (i.p.) + 3 (i.p.)	10,53 ± 1,54

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 8 animais/grupo. Administrou-se tratamento com EEAS (100mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e diazóxido (3mg/Kg, i.p.) nos determinados horários 1h; 1h; 30min respectivamente, antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100mg/Kg, v.o.) e diazóxido (3mg/Kg, i.p.) após 1h; 30min, respectivamente, receberam glibenclamida (5mg/Kg, i.p.) e decorridos 30min receberam etanol absoluto. ^ap< 0,001 vs veículo, ^bp< 0,01 vs diazóxido (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

TABELA 11 - Papel das Prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE mg/Kg (via)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)
Veículo	_____	14,92 ± 1,39
EEAS	100 (v.o.)	3,66 ± 1,55
Misoprostol	0,016 (v.o.)	4,34 ± 1,45
Indometacina + EEAS	10 (v.o.) + 100 (v.o.)	10,74 ± 2,19
Indometacina + Misoprostol	10 (v.o.) + 0,016 (v.o.)	19,08 ± 1,64

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 8 animais/grupo. Administrou-se tratamento com EEAS (100mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e misoprostol (0,016mg/Kg, v.o.) 1 hora antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100mg/Kg, v.o.) e misoprostol (0,016mg/Kg, v.o.) após 1 hora receberam indometacina (10mg/Kg, v.o) e decorridos 2 horas receberam etanol absoluto. ^ap< 0,001 vs veículo, ^bp< 0,001 vs misoprostol e ^cp<0,05 vs EEAS (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

TABELA 12 - Papel dos receptores noradrenérgicos alfa₂ no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE mg/Kg (via)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)
Veículo	_____	14,32 ± 0,57
EEAS	100 (v.o.)	3,66 ± 1,55
Clonidina	0, 1 (i.p.)	3,36 ± 1,22
Ioimbina + EEAS	2 (i.p.) + 100 (v.o.)	2,63 ± 0,87
Ioimbina + Clonidina	2 (i.p.) + 0, 1 (i.p.)	11,81 ± 1,57

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 8 animais/grupo. Administrou-se tratamento com EEAS (100mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e clonidina (0,1mg/Kg, i.p.) nos determinados horários 1h; 1h; 30min respectivamente, antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100mg/Kg, v.o.) e clonidina (0,1mg/Kg, i.p.) após 1h; 30min, respectivamente receberam ioimbina (2mg/Kg, i.p.) e decorrido 30min receberam etanol absoluto. ^ap< 0,001 vs veículo, ^bp< 0,001 vs clonidina (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

TABELA 13 - Papel dos receptores histamínicos no efeito gastroprotetor do EEAS em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE mg/Kg (via)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)
Veículo	_____	15,11 ± 1,48
EEAS	100 (v.o.)	2,94 ± 1,24
Ranitidina	40 (s.c.)	3,36 ± 1,22
Histamina + EEAS	3 (s.c.) + 100 (v.o.)	2,63 ± 0,87
Histamina + Ranitidina	3 (s.c.) + 40 (s.c.)	11,81 ± 1,57

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da percentagem de área gástrica ulcerada, para 8 animais/grupo. Administrou-se tratamento com EEAS (100mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e rantidina (3mg/Kg, s.c.) nos determinados horários 1h; 1h; 30min respectivamente, antes do etanol absoluto (0,2mL/animal). Um grupo de EEAS (100mg/Kg, v.o.) e rantidina (40mg/Kg s.c.) após 1h; 30min, respectivamente receberam histamina (2mg/Kg, i.p.) e decorrido 30 min receberam etanol absoluto. ^ap< 0,001 vs veículo, ^bp< 0,001 vs rantidina (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

TABELA 14 - Efeito do EEAS sobre a motilidade intestinal em camundongos

GRUPOS	DOSE mg/Kg (via)	Distância percorrida pelo marcador (%)
Veículo	_____	60,69 ±4,73
Atropina	0,1	36,16 ± 4,88
EEAS	100	57,78 ± 5,38

Os valores estão expressos como média ± erro padrão (E.P.M) da distância percorrida pelo marcador. Administrou-se tratamento com EEAS (100mg/Kg, v.o.), veículo (0,1mL/10g, v.o.) e atropina (0,1mg/Kg, v.o.) 1 h antes da administração de um marcador (vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5%, 0,1mL/10g, v.o.) . Os animais foram sacrificados após 30 min. Foram utilizados 8 animais por grupo. ** p< 0,001 vs grupo veículo (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

TABELA 15 - Efeito do EEAS em lesões gástricas induzida por ácido acético 30%

GRUPOS	DOSE mg/Kg (v.o.)	ÁREA DE LESÃO GÁSTRICA (%)	% INIBIÇÃO
Veículo	_____	8,69 ± 1,27	_____
Omeprazol	30	2,04 ± 0,69	75,59
EEAS	100	3,80 ± 0,43	57,53

Após a indução da úlcera gástrica crônica por ácido acético 30%, os animais foram tratados por um período de 14 dias com veículo (solução salina a 0,9%, 1mL/100 g, v.o.), omeprazol (30mg/Kg, v.o.) e EEAS (100mg/Kg, v.o.). Adiferença entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Bonferroni, onde ** p< 0,01 e *** p< 0,001 comparados ao grupo veículo.

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

Figura 19 - Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto.

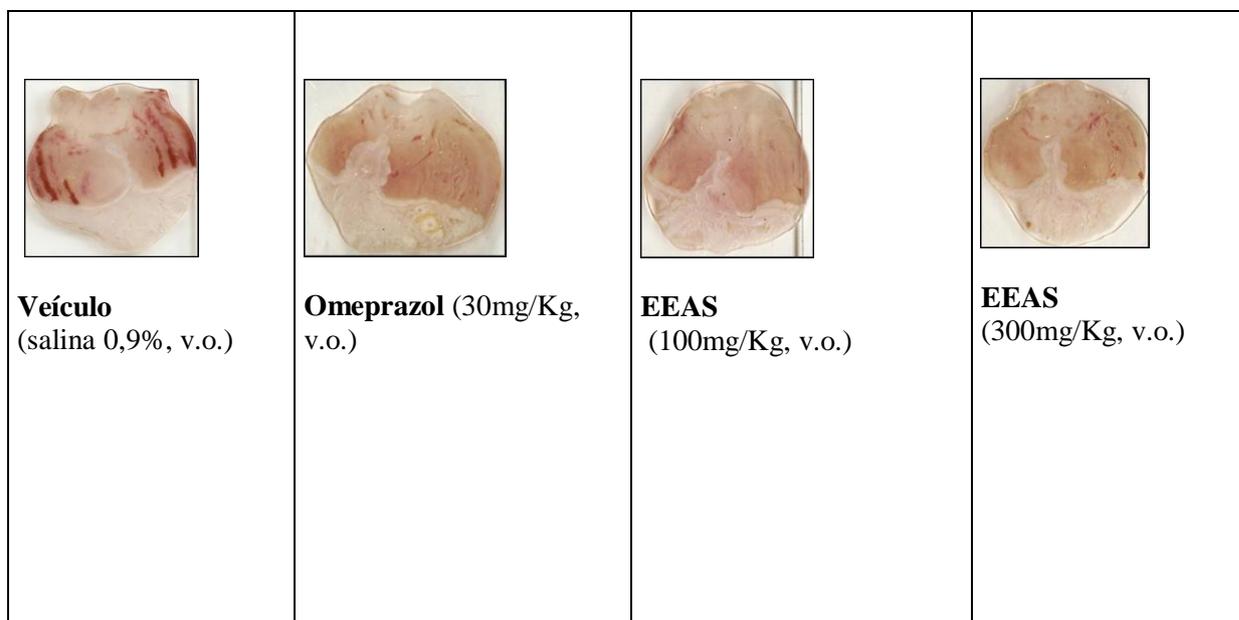


Figura 20 - Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado.

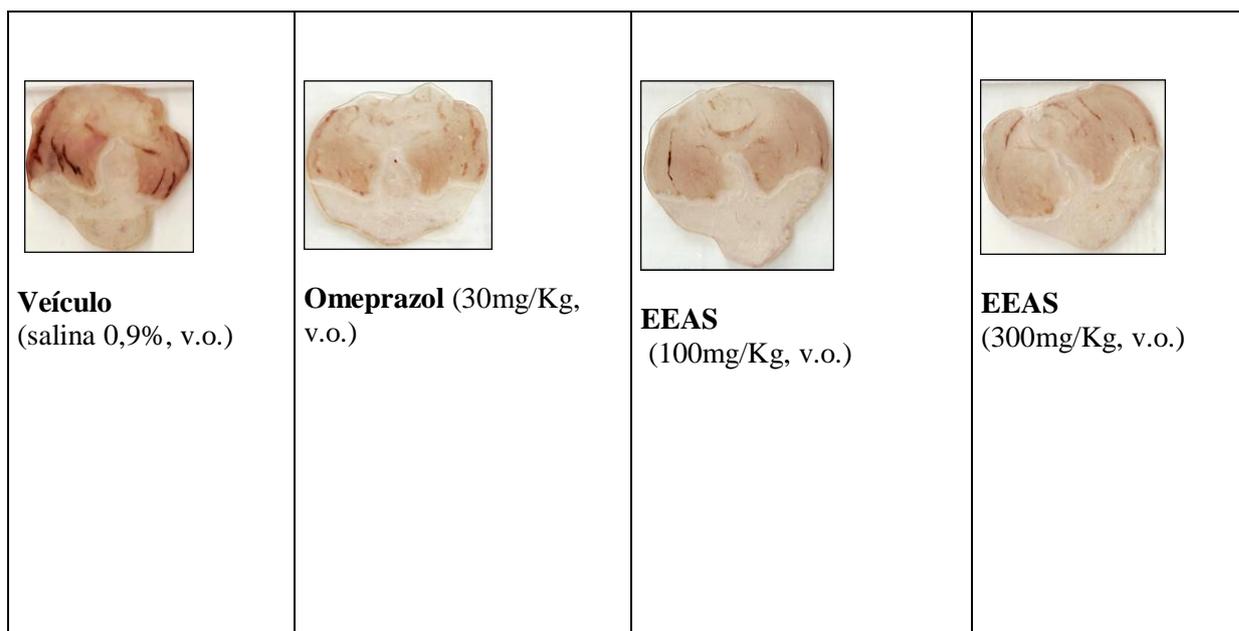


Figura 21 - Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina.

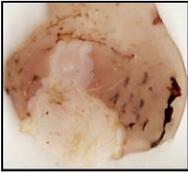
			
Veículo (salina 0,9%, v.o.)	Omeprazol (30mg/Kg, v.o.)	EEAS (100mg/Kg, v.o.)	EEAS (300mg/Kg, v.o.)

Figura 22 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento do óxido nítrico.

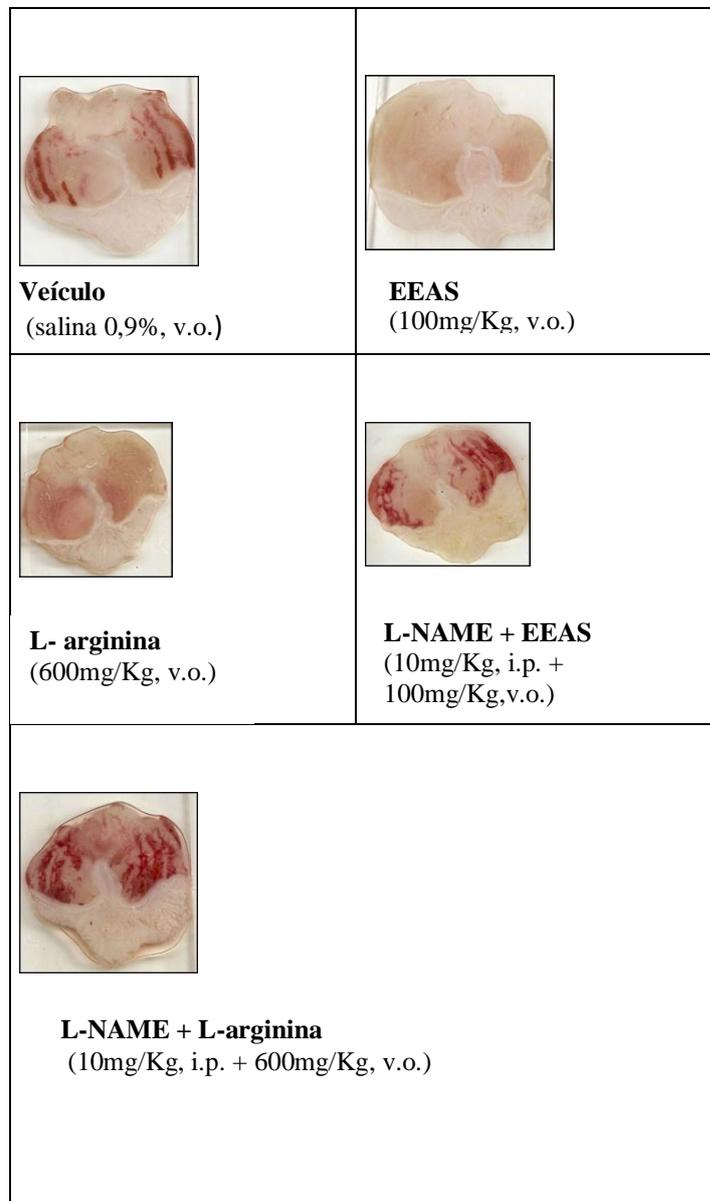


Figura 23 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento dos canais de K^+ dependentes de ATP.

	
Veículo (salina 0,9%, v.o.)	EEAS (100mg/Kg, v.o.)
	
Diazóxido (3mg/Kg, v.o.)	Glibenclamida + EEAS (5mg/Kg, i.p. + 100mg/Kg,v.o.)
	
Glibenclamida + diazóxido (5mg/Kg, i.p. + 3mg/Kg, v.o.)	

Figura 24 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento das prostaglandinas.

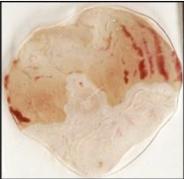
 <p>Veículo (salina 0,9%, v.o.)</p>	 <p>EEAS (100mg/Kg, v.o.)</p>
 <p>Misoprostol (0,016mg/Kg, v.o.)</p>	 <p>Indometacina + EEAS (10mg/Kg, v.o. + 100mg/Kg,v.o.)</p>
 <p>Indometacina + misoprostol (10mg/Kg, v.o. + 0,016mg/Kg, v.o.)</p>	

Figura 25 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores noradrenérgicos alfa₂.

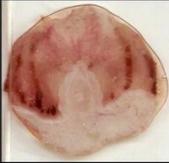
 <p>Veículo (salina 0,9%, v.o.)</p>	 <p>EEAS (100mg/Kg, v.o.)</p>
 <p>Clonidina (0,1mg/Kg, i.p.)</p>	 <p>Ioimbina + EEAS (2mg/Kg, i.p. + 100mg/Kg,v.o.)</p>
 <p>Ioimbina + clonidina (2mg/Kg, i.p. + 0,1mg/Kg, i.p.)</p>	

Figura 26 – Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de roedores no mecanismo de envolvimento dos receptores histamínicos (H_2).

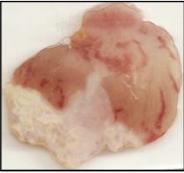
 <p>Veículo (salina 0,9%, v.o.)</p>	 <p>EEAS (100mg/Kg, v.o.)</p>
 <p>Ranitidina (40mg/Kg, s.c.)</p>	 <p>Histamina + EEAS (3mg/Kg, s.c. + 100mg/Kg, v.o.)</p>
 <p>Histamina + ranitidina (3mg/Kg, s.c. + 40mg/Kg, s.c.)</p>	

Figura 27 – Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelo lesões gástrica crônica induzida por ácido acético 30%.



Véculo
(salina 0,9%, v.o.)



Omeprazol
(30mg/Kg, v.o.)



EEAS
(100mg/Kg, v.o.)