



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI- URCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS
CULTIVADAS NO NORDESTE DO BRASIL: AVALIAÇÃO DO EFEITO
CITOPROTETOR E ANTIMICROBIANO DA *Annona muricata* Linnaeus.
(GRAVIOLA)**

ELIZÂNGELA BENEVAL BENTO

CRATO – CE

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELIZÂNGELA BENEVAL BENTO

**BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS
CULTIVADAS NO NORDESTE DO BRASIL: AVALIAÇÃO DO EFEITO
CITOPROTETOR E ANTIMICROBIANO DA *Annona muricata*
Linnaeus.(GRAVIOLA)**

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

Área de Concentração: Bioprospecção Molecular

Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais

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

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

CRATO – CE,

2010

Bento, Elizangela Beneval

Q8a BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE PLANTAS
MEDICINAIS CULTIVADAS NO NORDESTE DO BRASIL:
AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR E ANTIMICROBIANO DA
Annona muricata linnaeus. (GRAVIOLA) / *Elizangela Beneval Bento*. –
Crato, 2010.

146 p.; il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA
Orientador (a) : Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf

1. *Annona muricata* L 2. gastroprotetor 3. Avaliação
toxicológica

CDD: 83.166

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

Elizângela Beneval Bento

Dissertação examinada em: / / 2010

Examinadores:

Prof. Dr^a. Marta Regina Kerntopf Mendonça

Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Universidade Federal de Santa Maria-UFSM

Prof. Dr. Iri Sandro Pampolha Lima

Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte
– FMJ

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem; por quê? Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo; por que não.”

George Bernard Shaw

Agradecimentos

O agradecimento sempre traz o desconforto de se praticar uma injustiça por três motivos, primeiro porque é impossível contemplar a todos os que nos ajudam em uma caminhada, depois é bem possível esquecer alguém, e por último, pelas palavras não expressarem tudo que queremos em relação ao agraciado. Mesmo correndo este risco, quero manifestar algumas palavras de carinho e reconhecimento pela importância de algumas pessoas neste ponto de chegada.

A Deus, que sempre esteve presente em minha vida me proporcionando muitas alegrias e sempre me dando força para superar as minhas dificuldades.

Dizem “que as árvores mais altas têm as raízes mais profundas”. À minha família, cujas raízes do amor vão além de qualquer limite, o meu agradecimento sem explicação! É o agradecimento mais especial, profundo, recompensador e gostoso. A você, papai e mamãe, por me ensinarem a lutar e não desistir nunca. À minha mãe por me mostrar o caminho da serenidade e do amor. Ao meu pai, por me ensinar a sonhar. As minhas irmãs, espécies de anjo da guarda, por me amarem e zelarem sempre por mim. O nome de vocês não está em todas as páginas desta dissertação porque vocês estão em mim. Porque eu sou vocês! Eu vivo por vocês! Eu vivo em vocês! Porque eu sou uma árvore pequena, mas com raízes profundas. Porque herdei de vocês a sabedoria de ver a vida com esperança, de sonhar, de amar, de fazer tudo com ética, de ser criança, adolescente, adulta, de ser mulher, de batalhar. Sou árvore pequena, mas com grandes raízes, de amor, carinho, respeito, aposta, vitória, alegria. Ao longe, me pego sempre, a todo instante, admirando e agradecendo pela altura de vocês e saibam que para mim todos os suportes de textos disponíveis não seriam capazes de registrar minha admiração, gratidão e amor, e a certeza que se nada der certo, eu terei o meu “colinho” de volta e o beijinho doce de minha Franzinha.

Ouvem-se muitas definições a respeito do que vem a ser um educador e dentre todas as formulações, a que melhor se aplica à minha orientadora Prof^ª. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça, é “ponte”. “Ser educador é ser ponte para o futuro”, é ser apoio para a travessia e para isso é preciso ser forte, consistente, seguro. Neste sentido quero dizer que você não foi só fortaleza, consistência, foi paciência, dedicação, coerência, indicação de caminhos e certeza. A você Prof^ª. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça o meu respeito, carinho e admiração!

Ao Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha. Se possível fosse eu grafaria o seu nome em todas as páginas desta dissertação, porque ela fala de Pesquisa e para mim você é o modelo ideal e o homem mais apaixonado por esta atividade, que eu conheço. Escreveria seu nome porque nestas páginas têm muita dedicação e esforço e você é meu maior exemplo. Eu escreveria o seu nome em cada parágrafo porque este mestrado começou pelo meu amor à docência e um sonho (doutorado, pesquisa...), que por hora estava adormecido até você chegar, foi você, quem me ensinou a amar e a querer este sonho logo. Seu nome estaria lá porque você acreditou em mim. Seu nome estaria lá porque você é e sempre será o meu grande mestre da Pesquisa. O seu nome estaria lá pelo carinho, apoio, respeito, paciência. O seu nome estaria lá pela amizade e presença. No entanto, não posso, pelas regras da academia, colocar o seu nome em cada página, mas seguirei à risca o que diz o poeta, “amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo

do peito, dentro do coração”, e pode ter certeza que você está aqui dentro! Obrigada meu Professor. Amigo.

Ao prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes, da Universidade Regional do Cariri, meu co-orientador, pela ajuda indispensável, pela sugestão da planta, e valiosas contribuições que foram muito importantes no decorrer e concretização de todo trabalho.

Aos professores: Dr. Bruno Anderson Mathias da Rocha da Universidade Federal de Alagoas- UFAL, e Dr. Plínio Delatorre da Universidade Federal da Paraíba- UFPB, meus primeiros orientadores neste programa de pós-graduação, que por motivos superiores e pessoais nos distanciamos uns dos outros, meu muito obrigada! Por sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e acreditaram na conclusão deste trabalho.

A Prof^a. Dra. e amiga Marta Almeida, pela mão sempre erguida, pelo incentivo, pelo carinho, pela torcida sempre calorosa, pelo convívio e pela amizade. A você “a quem aprendi gostar tão facilmente” pela leveza, bom humor, companheirismo e alegria, meu agradecimento eterno!

A Prof^a. Dra. Sirleis Rodrigues Lacerda e a Prof^a. Dra. Imeuda Peixoto Furtado, por me mostrar os caminhos da Docência e da pesquisa. Pelos vários momentos em que me auxiliaram na realização deste trabalho, pelo sempre produtivo convívio, pelas sugestões sempre úteis, e pelos exemplos de vida profissional, e pelo constante e grande incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada e interessadas em participar de “minhas inquietações”.

Ao Prof.Dr. Antônio Álamo Saraiva, pelo o respeito, amizade, alegria me fazendo sorrir nos momentos difíceis e nos apoiando sempre, em todas as nossas “loucuras”.

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa e a todos que compõem o Laboratório de Produtos Naturais (LPN) especialmente ao bolsista de iniciação Científica Thiago Silva de Almeida (Tiaguinho)da Universidade Regional do Cariri, pelo o auxílio e desenvolvimento da parte química da planta e do extrato(EHAM), e por me receberem com um clima de companheirismo e ajuda sempre pronta e eficaz;

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e o Mestrando Edinardo Fagner da Universidade Regional do Cariri- URCA, pela avaliação microbiológica do extrato vegetal da *Annona muricata* L.;

Aos Professores do curso de pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, pelas informações e incentivos;

Aos colegas do Herbário Caririense Dárdano de Andrade- Lima, da Universidade Regional do Cariri-URCA, na pessoa da Professora curadora Dra. Maria Arlene Pessoa de Moraes, e do Mestrando Antonio Carlito Bezerra dos Santos, que muito gentilmente ajudou-me a preparar a exsicata. Todos foram muito importantes na identificação botânica da espécie de *Annona muricata* L. aqui estudada;

Aos amigos, pela força e cumplicidade. Em especial a Francisco de Assis Bezerra da Cunha, Samuel Vieira e Felipe Silva, companheiros de orientação, pelo carinho; e pela amizade, pelo apoio, amizade e incentivo que foram fundamentais nos meus momentos recaídas.

Aos colegas da pós-graduação, pela estima, pelo ambiente de agradável convivência, em especial a Sarahbelle de Cartaxo Almeida, Rogério de Aquino Saraiva, Rodrigo Lemos, Leila, Elaine, novos amigos que fizeram com que todo esse período fosse muito mais agradável.

A Francisco Elizauo de Brito Júnior e a Dayanne Rakelly de Oliveira, meus queridos amigos mestrandos, com quem dividi as alegrias e preocupações de muitas etapas da vida e do curso; pelo companheirismo, compreensão, amizade, por todas as angustias dos últimos meses que passamos juntos, que ficou mais fácil de serem superadas por terem a presença de vocês dois para dividir, e pela ajuda fundamental para conclusão deste trabalho.

A Maria do Socorro (Côca), pela a preocupação comigo, por todos os “lanchinhos” fora de hora, sempre preocupada com a minha alimentação e o meu bem estar físico e sentimental, ”Côquinha AMO TU”!!! E muito obrigada por tudo.

A FMJ, seus funcionários e diretoria, pelo apoio e liberação dos animais para a pesquisa, sempre dispostos a me a ajudar e forneciam os animais sempre que eu precisava mesmo aqueles de última hora.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores da banca em especial a de qualificação, pela disponibilidade em me ajudar participando prontamente frente ao nosso pedido, pelos seus apontamentos sensatos e pertinentes, que foi imprescindível para os objetivos desta dissertação, e por qual eu tenho uma profunda admiração e respeito.

Aos alunos do segundo semestre de biologia da Universidade Regional do Cariri-URCA, no meio de tantas turmas especiais esta teve um “Q” DE DESTAQUE ESPECIAL, a muito que eu não via tanta vontade de crescer, de querer se destacar em suas vidas profissionais, e acreditando que o estudo é a fonte para o crescimento intelectual e profissional do homem. Para sempre em minha mente os olhos ansiosos de todos por novos conhecimentos, fato hoje um pouco distante da realidade do nosso contexto. Espero realmente ter contribuído com vocês com a prática a docência assim como vocês contribuíram com o meu “renascimento” mostrando-me que a educação e o ensino ainda tem jeito sim. “A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original””. *Albert Einstein*.

Aos meus amigos, do laboratório de farmacologia da Universidade Regional do Cariri-URCA, nas pessoas de; Alaiane, Andressa, Kléber Dackson Peixoto de Menezes, Laura Helvila Inocência de Leite , Paula Denise Lima de Menezes, Romagna Castro Oliveira, Gerlânia de Oliveira Leite, Mariana Késsia Andrade Araruna, Heloisa Helena Ferreira de Souza, Renata de Souza Sampaio, pela contribuição, pela amizade e pelos momentos de diversão; em especial a minha Norminha (Barbie=Magali)- Norma Fernandes a Daniele Oliveira Souza (Danny), e a Renata de Souza Sampaio (Renatinha)

pela ajuda fundamental e indispensável para este trabalho, e pela ajuda nos experimentos, e pela convivência que ensina.

Aos funcionários da Universidade Regional do Cariri que deram sua parcela de contribuição essa jornada, nas pessoas de: Marcos Aurélio da Silva, Sylvanna Maria Vilar Costa, Fernando Francisco Luciano, Maria Leda de Sousa Alcântara, Silvio Romero, Marcos Grossi da Silva, Luis Leandro da Silva, Francelino, Maria Lucia Vanderlei, Tota, Maria do Carmo (Mocinha), Raimundo, pela força moral, pela torcida, pelos os “cafezinhos”, presentes, chocolates e etc... regados de sinceridade, elogios e carinho para com a minha pessoa, às vezes me pego pensando e analisando, e chego a conclusão que Deus realmente me ama muito, de fazer me merecedora de amigos como vocês, com vocês tenho a certeza da sinceridade das palavras, da lealdade e das expressões de um ser humano, a todos OBRIGADA!!! Por se fazerem presentes na minha vida de uma forma tão AFETIVA E EFETIVA, muito maior que vocês imaginam, este trabalho é mais de vocês do que meu e da minha Orientadora, pois sem vocês teria jogado tudo para o alto. “(...) *Acima de tudo, na vida, temos necessidade de alguém que nos obrigue a realizar aquilo de que somos capazes. É este o papel da amizade*” *Ralph Waldo Emerson*”.

A Renata Carolina Kerntopf Mendonça (Naná), obrigada pelo carinho, amor sincero; beijinhos doces, que adoçaram meus dias, abraços verdadeiros cheios de energias.

A Andecile Rolim, grande amiga e companheira. Sempre ao meu lado para amparar, ainda que sem saber, nos momentos de dificuldade. A minha casa longe de casa, a minha família número dois (2); “Ela é mais que uma simples “loira” na minha vida; a minha irmã, o melhor presente que Deus poderia ter me dado, no Crato e que eu amo demais !! Te agradeço também, pelos “puxões de orelha”, que foram imprescindíveis para meu desenvolvimento, e pelos “colos” concedidos após muitas frustrações.

As minhas grandes amigas Adilfa Garcia e Marlene Meneses Souza, pela amizade, torcida e presença incondicional, apesar da “eventual” distância. Amigas sempre!

A alguém muito especial, que entrou em minha vida “no meio da dissertação”: Grande amor e muito querido – sua presença constante, seu apoio, seus ensinamentos sobre nossa profissão, sua paciência nas horas de crise e o seu amor trouxeram o equilíbrio para que tudo isto fosse possível.

A todos, Muito obrigada pela acolhida, ao longo do percurso.

RESUMO

A úlcera péptica é causada por um desequilíbrio entre os mecanismos protetores e agressores da mucosa, e é resultado da associação de diversos fatores agressores endógenos (ácido, pepsina e bile) e fatores exógenos relacionados as condições de vida (estresse, fumo, álcool, uso contínuo de drogas antiinflamatórias não esteroidais e a infecção por *Helicobacter pylori*. *Annona muricata* L. (graviola) pertence à família Anonaceae, cultivada no Nordeste brasileiro, região onde se adapta muito bem, principalmente nos Estados da Paraíba, Ceará, Pernambuco e Bahia. Pesquisas descrevem o chá de folhas, frutos e raízes da *Annona muricata* L, tem sido usado na medicina popular como agente antiinflamatórias, diuréticas, adstringente, anti-reumáticas, e anticancerígena. O uso da *Annona muricata* L(graviola) para o tratamento de úlceras pépticas não foi indicado, na pesquisa etnofarmacológica feita na área da Chapada do Araripe, na zona rural dos Municípios de Crato-CE, Exu-PE e Santana do Cariri-CE, sendo a espécie indicada para outros tipos de doenças. Relatos apontaram que a forma de tratamento da planta era realizado de maneira indiscriminada, sem base em estudos científicos que tenham validado a sua ação. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a eficácia como gastroprotetor do extrato bruto hidroalcoólico das folhas *Annona muricata* L, e evidenciar as vias envolvidas nesse efeito. Camundongos Swiss de ambos os sexos, foram tratados com EHAM, omeprazol e solução salina. As lesões gástricas foram induzidas através com o etanol. O efeito do EHAM sobre o trânsito gastrointestinal foi avaliado através do teste de motilidade intestinal. Os resultados do estudo mostraram que o extrato, em modelos de úlceras gástricas induzidas por etanol em roedores, apresentou-se efetivo e protegeu a mucosa gástrica. A pesquisa demonstrou que o mecanismo de ação antiúlcero gênico, ocorreu através da via da produção de prostaglandinas. Estes dados mostram as folhas da graviola como gastroprotetor, e fornecem embasamento para continuidade das pesquisas com a *Annona muricata* L, visando a ampliação do entendimento dos mecanismos de ação e busca dos compostos responsáveis por esses efeitos gastroprotetor do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* L. (EHAM).

Palavras-chaves: Efeito gastroprotetor, *Annona muricata* L, Extrato hidroalcoólico, Úlceras gástricas.

ABSTRACT

A peptic ulcer is caused by an imbalance between aggressive and protective mechanisms of the mucosa, and resulted from the association of various endogenous aggressive factors (acid, pepsin and bile) and exogenous factors related to living conditions (stress, smoking, alcohol use continuous non-steroidal anti-inflammatory drugs and *Helicobacter pylori* infection). *Annona muricata* L. (Graviola) belongs to the family Annonaceae, grown in the Northeast of Brazil, where it adapts very well, especially in the states of Paraíba, Ceará, Pernambuco and Bahia. The tea of leaves, fruits and roots of, *Annona muricata* L. have been used in folk medicine as antiinflammatory, diuretic, astringent, antirheumatic, antispasmodic, antitussive and anticancer agent. The use of *Annona muricata* L. (soursop) for the treatment of peptic ulcers is not indicated in some of these medicinal properties have been by ethnobotanical research have been confirmed in animal models, however. Reports have been indicated that treatment with plants are carried out in an indiscriminate manner, by phytoterapia phamaceutica scientific studies that had validated their action. This study aims to evaluate the without support of gastroprotective, this study aimed to evaluate the potential gastroprotective efficacy of crude extract of *Annona muricata* L leaves and to investigate the molecular pathways involved in this effect. The results showed that the crude extract of *Annona muricata* L in rodents protected the gastric mucosa in ethanol induced gastric ulcer models the gastroprotective mechanisms of *Annona muricata* L was associated with the synthesis of prostaglandins. Noting that the mechanism of action of antiulcerogenic occurred via the production of prostaglandins. In conclusion, the gastroprotective efficacy of ethanolic extract from leaves of *Annona muricata* L indicates that additional studies are needed to increase our understanding of its mechanism of action and to identify the phytochemical product(s) involved in gastroprotection.

Descriptors: Effect gastroprotective, *Annona muricata* L, hydroalcoholic extract, gastric ulcers.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1.INTRODUÇÃO.....	22
.....	
1.1 Apresentação.....	22
.....	
1. JUSTIFICATIVA.....	25
.....	
2. REFERENCIAL	27
TEÓRICO.....	
3.1 Família Annonaceae	27
.....	
3.2. <i>Annona muricata</i>	
L.....	30
3.3. Anatomia e Fisiologia do Trato	
Gastrintestinal.....	32
3.3.1. Fisiologia da secreção	
gástrica.....	33
3.3.2. Fatores agressores da mucosa	
gástrica.....	34
3.3.3. Fatores protetores da mucosa	
gástrica.....	35
3.4. Doença	
Péptica.....	37
3.5.	
Inflamação.....	38
.....	
3.6. A úlcera péptica e os modelos	
animais.....	39
3.7. Terapêutica	
Antiúlcera.....	40

3.8. A Farmacognosia e a Importância dos Metabólitos Secundários.....	41
.....	
3.9. Fitoquímica da Annonaceae.....	42
1. OBJETIVOS.....	47
.....	
4.1. Objetivo geral.....	47
4.2. Objetivos específicos.....	47
5.MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1. Materiais.....	48
....	
5.1.1. Material Botânico (origem e obtenção do extrato vegetal).....	48
.....	
5.1.2. Drogas e reagentes.....	51
5.1.3. Material permanente e equipamentos utilizados.....	52
5.1.4. Prospecção fitoquímica.....	52
5.1.5. Animais.....	54
.....	
5.2. Métodos.....	54
.....	
5.2.1. Tipologia do estudo.....	54
5.2.1.1. Pesquisa Etnofarmacológica.....	55
5.2.2. Ensaio pré-clínicos farmacológicos in vivo.....	56
.....	
5.2.2.1. Investigação da Toxicidade Aguda do Extrato e screening hipocrático.....	56
.....	
a) Preparo dos animais	56

.....	
b) Procedimento experimental.....	56
5.2.2.2. Investigação da atividade gastroprotetora.....	57
a) Lesão gástrica induzida pela administração oral e intraperitoneal de etanol absoluto.....	57
.....	
b) Lesão gástrica aguda induzida por etanol acidificado.....	58
c) Lesão gástrica aguda induzida por indometacina.....	58
d) Estudo dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do EHAM.....	59
....	
• Avaliação do envolvimento do óxido nítrico.....	59
• Envolvimento dos Canais de K ⁺ dependentes de ATP.....	60
....	
• Estudo do envolvimento das Prostaglandinas.....	60
• Envolvimento dos Receptores noradrenérgicos alfa2.....	60
.....	
• Envolvimento dos Neurônios Aferentes Sensíveis à Capsaicina.....	61
.....	
5.2.2.3. Determinação da motilidade intestinal.....	61
5.2.2.4. Investigação da atividade antibacteriana.....	62
a) Linhagens bacterianas.....	62
b) Teste de suscetibilidade às drogas.....	63
5.2.3. Expressão dos dados e análise estatística.....	63
5.3. Aspectos éticos do estudo.....	64
5.4. Instituições parceiras e financiamento.....	64
6.	65

Resultados.....	
6.1. Avaliação do dado da Pesquisa Etnofarmacológica.....	65
a)	
Informantes.....	65
b) Considerações sobre o uso medicinal da espécie <i>Annona muricata</i> L.....	67
6.2. Teste hipocrático e Toxicidade Aguda do EHAM.....	70
6.3. Atividade Microbiológica do EHAM.....	70
6.4. Avaliação atividade antiulcerogênica.....	72
6.4.1. Efeito da administração oral do EHAM em lesões gástricas induzidas pela administração de etanol absoluto em camundongos.....	72
6.4.2. Efeito da administração intraperitoneal do EHAM em lesões gástricas induzidas pela administração de etanol absoluto em camundongos.....	75
6.4.3. Efeito do EHAM em lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.....	78
6.4.4. Efeito do EHAM em lesões gástricas induzidas por DAINES (indometacina) em camundongos.....	81
6.4.5. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EHAM em lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.....	84
6.4.6. Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.....	87
6.4.7. Papel dos receptores noradrenérgicos alfa2 no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.....	90

.....	
6.4.8. Papel dos canais K ⁺ dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.....	93
.....	
6.4.9. Envolvimento do efeito gastroprotetor do EHAM associado à capsaicina em modelo de lesão gástrica induzida por etanol absoluto em camundongos.....	96
.....	
6.5. Dados relativos à atividade do EHAM sobre a motilidade gastrointestinal camundongos.....	99
.....	
7.DISSCUSSÃO.....	100
.....	
8.CONCLUSÃO.....	111
.....	
REFERÊNCIAS.....	112
.....	
APÊNDICE.....	132
.....	
ANEXOS.....	136
.....	

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
Figura 1	Localização da Chapada do Araripe	24
Figura 2	Distribuição mundial da família Annonaceae	28
Figura 3	Espécie adulto de <i>Annona muricata</i> Linnaeus.	29
Figura 4	Exemplar da <i>Annona muricata</i> L.	49
Figura 5	Fluxograma de obtenção do Extrato hidroalcoólico de <i>Annona Muricata</i> L (EHAM)	50
Figura 6	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto	73
Figura 7	Efeito da administração oral do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	74
Figura 8	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto intraperitoneal	76
Figura 9	Efeito da administração intraperitoneal do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	77
Figura 10	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol acidificado	79
Figura 11	Efeito do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos	80
Figura 12	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por DAINES (indometacina)	82
Figura 13	Efeito do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por DAINES (indometacina) em camundongos	83

Figura 14	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto (óxido nítrico)	85
Figura 15	Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	86
Figura 16	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto (prostaglandinas)	88
Figura 17	Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	89
Figura 18	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto (receptores noradrenérgicos alfa ₂)	91
Figura 19	Papel dos receptores noradrenérgicos alfa ₂ no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	92
Figura 20	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto (canais de K ⁺ dependentes de ATP)	94
Figura 21	Papel dos Canais de K ⁺ dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos	95
Figura 22	Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores induzidas por etanol absoluto (capsaicina)	97
Figura 23	Envolvimento do efeito gastroprotetor do EHAM em associação à capsaicina em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em	98

camundongos

Figura 24 Efeito do EHAM sobre a motilidade intestinal em 99 camundongos

LISTA DE TABELAS

TABELAS		PÁGINA
Tabela 1	Atividade farmacológica da espécie <i>Annona muricata</i> L.	43
Tabela 2	Prospecção Fitoquímica do extrato hidroalcoólico bruto liofilizado das folhas de <i>Annona muricata</i> L	53
Tabela 3	Origem Bacteriana e Perfil de Resistência a antibióticos	62
Tabela 4	Perfil dos informantes da espécie <i>Annona muricata</i> (Graviola) em áreas da Biorregião do Araripe, Crato e Santana do Cariri – CE e Exu-PE	65
Tabela 5	Comparação do Nível de Fidelidade (FL) sobre as indicações medicinais do <i>Annona muricata</i> (Graviola) em áreas da Biorregião do Araripe, Crato e Santana do Cariri – CE e Exu –PE	67
Tabela 6	Indicação medicinal versus duração do tratamento da espécie <i>Annona muricata</i> . (Graviola)	69
Tabela 7	Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de aminoglicosídeos na presença e ausência de $16\mu\text{g/mL}$ de EHAM, <i>Escherichia coli</i> 27 e <i>Staphylococcus aureus</i> 358	358

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
°C	Grau Centígrado
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
<i>et al.</i>	e outros
μm	Micrômetro
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato Adenosina
CE	Ceará
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
cm	Centímetro
col	Colaboradores
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase do Tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase do Tipo 2
DAINE	Droga Antiinflamatória Não-Esteroidal

DL ₅₀	Dose Letal Média
EHAM	Extrato Hidroalcoólico das folhas do <i>Annona muricata</i> A.St.-Hil.
E.P.M.	Erro Padrão da Média
Etanol _{abs}	Etanol absoluto
FMJ	Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte
FL	<i>Fidelity Level</i> – Nível de Fidelidade
GSH	Glutathiona reduzida
g	Gramma
h	Hora
H ⁺	Íon Hidrogênio
H ₂	Receptor de Histamina tipo 2
HCl	Ácido Clorídrico
H ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de Prótons
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Íon Potássio
KATP	Canais de Potássio Dependentes de ATP
Kg	Quilograma
LFQM	Laboratório de Farmacologia e Química Molecular
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metilester
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
M	Receptor Muscarínico tipo 3
mL	Mililitro

N	Número
NO	Óxido Nítrico
NOe	Óxido Nítrico Endotelial
NOi	Óxido Nítrico Induzível
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ph	Potencial de hidrogênio
PGE2	Prostaglandina Tipo 2
PGI2	Prostaciclina Tipo 2
RFC	<i>Relative Frequency of Citation</i> - Frequência Relativa de Citação
URCA	Universidade Regional do Cariri
v.o.	Via oral
vs	Versus

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação

As plantas medicinais foram descobertas pelo homem através da procura por alimentos, e desde então, foram aplicadas empiricamente para o tratamento de patologias (WAGNER; WISENAUER, 2006).

O uso de plantas medicinais na profilaxia e tratamento de diversos tipos de doenças é tradicional em todos os momentos históricos da cultura humana, sendo que mais de 13 mil espécies são reconhecidas mundialmente e consumidas como fármacos ou fonte de fármacos (COSTA *et al*, 2007). Estima-se que 60% das drogas anti-tumorais e anti-infecciosas inseridas no mercado mundial ou que se encontram na fase de triagem clínica sejam de origem natural. A fitoterapia é uma alternativa de tratamento que ganha força e aliados em todo o mundo, devido a fatores como a insatisfação com a medicina convencional, o uso abusivo ou incorreto de drogas sintéticas (que resulta em efeitos indesejáveis) e pela acessibilidade da grande maioria da população (PAULA JÚNIOR, 2004).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 65-80% da população de países em desenvolvimento, devido à pobreza ou ao difícil acesso a medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os primeiros cuidados da saúde. Entretanto, poucas plantas (menos de 10%) têm estudos científicos para a validação de sua qualidade, segurança e eficácia (CALIXTO, 2005).

É importante salientar uma retomada, ainda que tímida, pela valorização do saber popular a partir inclusive, da perspectiva da Organização Mundial da Saúde – OMS de que o fortalecimento dessas práticas populares, pela validação científica das propriedades farmacológicas das plantas possa contribuir para a melhoria da situação de saúde em todo o mundo. Enfatize-se ainda que, há estimativas de que 80 a

85% da população mundial emprega o conhecimento sobre as plantas na produção de seus medicamentos (FERRO, 2006).

Acrescente-se a isso, que embora no Brasil, já mais de 350 mil espécies de plantas foram identificadas, um número não superior a dez mil apenas têm alguma propriedade medicinal conhecida (REZENDE, COCCO, 2002), o que certamente, reafirma a necessidade de investimento em pesquisas nessa área. É sabido ainda, que o Brasil detém cerca de 10% de toda a flora mundial e apesar de suas valorosas colaborações, tendo-se como exemplos os curares, a emetina, a pilocarpina, entre outros, constitui-se em um verdadeiro potencial para o desenvolvimento nesse ramo da ciência, em que pese por apenas 1% de suas variedades vegetais ter recebido o olhar científico, sob o ponto da investigação farmacológica e fitoquímica (REZENDE, COCCO, 2002).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

A Chapada do Araripe, localizada entre os limites dos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, chama a atenção da comunidade científica por sua estrutura geológica, suas jazidas fossilíferas e suas diferentes formações florestais concentradas num mesmo local, cada uma com fatores bióticos e abióticos específicos: (1) floresta úmida semi-perenifólia, (2) transição floresta úmida / cerrado, (3) carrasco, (4) floresta úmida com incidência de incêndios e (5) cerradão. Essas formações florestais constituem a Floresta Nacional do Araripe (FLONA) (LIMA; LIMA; TEIXEIRA, 1984). Figura 1.

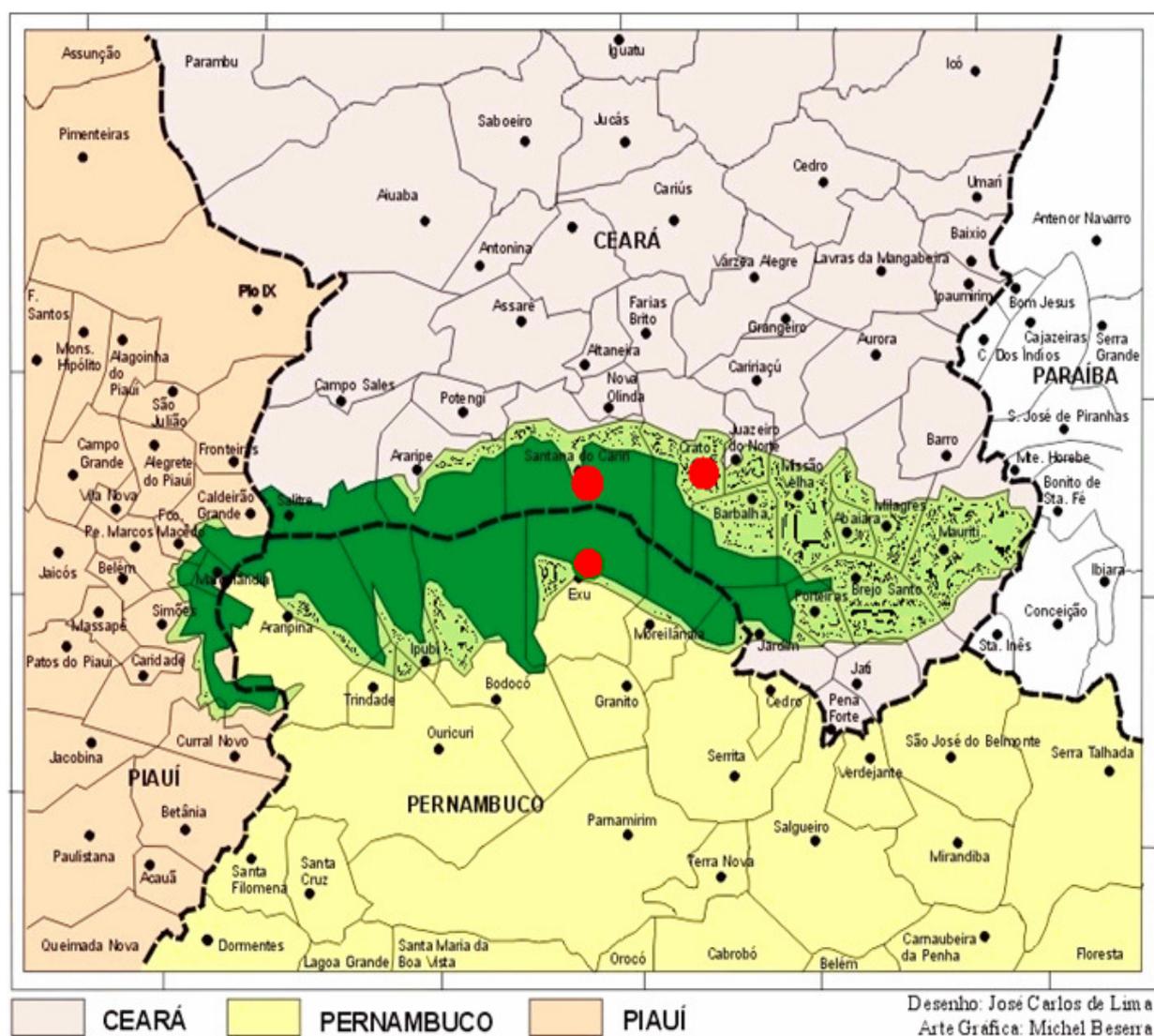


Figura 1. Localização da Chapada do Araripe

2. JUSTIFICATIVA

Raízeiros e mateiros das comunidades tradicionais da Chapada do Araripe, relatam que fazem uso da aplicação medicinal da graviola (*Annona muricata*) o que corroboram com estudos etnobotânicos que descrevem o uso de suas folhas, frutos e raízes, sob a forma de chá, sendo utilizadas na medicina popular em doenças inflamatórias, diuréticas, adstringente, vitaminizante, anti-reumáticas, bem como sua propriedade antiespasmódica, antitussígena e anticancerígena. Os dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Segundo Blumental (2000), as plantas medicinais brasileiras são consideradas como altamente promissoras, mas são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista. No nosso mercado, a maioria dos produtos é constituída por cápsulas contendo o pó de plantas rasuradas, para os quais não existem comprovações de eficácia e segurança, e algumas vezes nem mesmo tradição de uso (BLUMENTAL, 2000).

Produtos naturais apresentam-se como fonte de compostos com potencial atividade biológica. Assim, a descoberta de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos ou de novos agentes terapêuticos representa uma possibilidade para o tratamento de várias patologias e processos inflamatórios associados à dor, podendo determinar uma melhor qualidade de vida para os pacientes (LAPA, 2006).

Os ensaios pré-clínicos são importantes para o desenvolvimento de novas terapias, pois fornecem dados das atividades biológicas de uma determinada substância em estudo, como a eficácia e a segurança.

Baseando-se nos estudos das atividades farmacológicas e fitoquímicas de outras espécies da família Anoneaceae, e de outras plantas medicinais já

estudadas, acredita-se ser possível a obtenção de resultados positivos e de conhecimentos inéditos em relação ao estudo farmacológico da *Annona muricata*, comprovando, dessa forma, a veracidade (ou não) de relatos empíricos. .

O Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular-PPBM do Departamento de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri-URCA, vem contribuindo para o uso seguro de plantas medicinais, através da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas, buscando a validação das plantas medicinais com atividades antimicrobiana e gastroprotetora.

Dessa maneira, a importância deste estudo, se justifica na confirmação das propriedades acima citadas da *Annona muricata* L, tendo como base o seu emprego na medicina tradicional. Estudos complementares foram realizados com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismos de ações envolvidas e validar sua eficácia popular, como também realizar testes toxicológicos, para verificar a segurança desta planta.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Família Annonacea.

A família Annonacea é composta por aproximadamente 120 gêneros com distribuição tropical e subtropical em todo o mundo, em que *Annona* é o gênero mais importante dentro dessa família, com cerca de 50 espécies. No Brasil, as anonáceas são cultivadas praticamente em todo o território, no Nordeste, a graviola (*Annona muricata*) é a preferida pela população, e no Sudeste a pinha (*Annona squamosa*) é a mais plantada (SANTOS *et al.*, 2005). A espécie foi introduzida no Brasil por Diogo Luís de Oliveira, Conde de Miranda (ARAÚJO *et al.*, 1999), figura 2.

As Anonáceas são fruteiras tipicamente de clima tropical, apresentam boas perspectivas econômicas para a região Nordeste do Brasil, por serem culturas altamente adaptadas às condições locais e produzirem frutos a partir do mês de janeiro, suprimindo parte da capacidade ociosa da indústria de suco de caju. Apesar de não se dispor de dados estatísticos, é notória a demanda crescente, tanto no mercado interno, como no externo pelos frutos de *Annona squamosa* L. Esse incremento na procura motivou os fruticultores e empresários, e tem forçado a pesquisa a desenvolver métodos para que o produtor possa acompanhá-la, tanto na qualidade como na quantidade de frutos ofertados. O interesse por parte do consumidor e da indústria de polpa, já justifica a inclusão da pinha no rol das frutas tropicais brasileiras de excelente valor comercial (ALVES *et al.*, 1998).

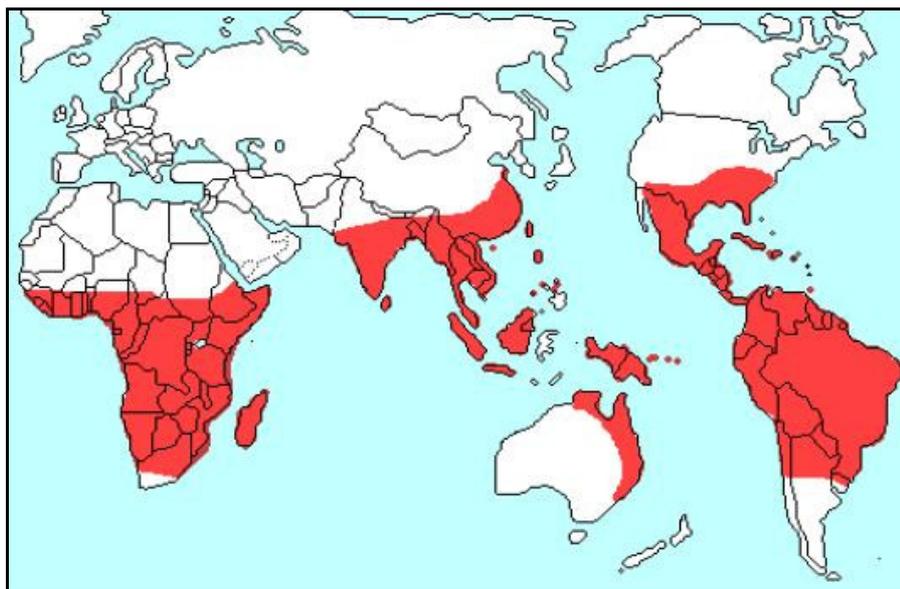


Figura 2. Distribuição mundial da família Annonaceae

Fonte: Omnicyber.org, 2005

A graviola é uma fruta originária das Antilhas, prefere climas úmidos, baixa altitude, e não exige muito em relação a terrenos. A graviola é uma árvore de pequeno porte (atinge de 4 a 6 metros de altura) e encontrada em quase todos os países tropicais, com folhas verdes brilhantes e flores amareladas, grandes e isoladas, que nascem no tronco e nos ramos. Os frutos têm forma oval, casca verde-pálida, são grandes, chegando a pesar entre 750 gramas a 8 quilos, encontra-se este fruto o ano todo. Contém muitas sementes, pretas, envolvidas por uma polpa branca, de sabor agridoce, muito delicado e semelhante à fruta-do-conde. (JUNQUEIRA *et al.*, 1999), figura 2.



Figura 3. Espécie adulta de *Annona muricata* Linnaeus. Crato-CE 2009

A graviola apresenta muitos compostos bioativos e fitoquímicos e vários estudos têm mostrado ação hipotensiva, antiespasmódica, vasodilatadora, relaxante do músculo estomacal e atividade citotóxica contra células cancerígenas a partir dos extratos das folhas e troncos (ALALI; et al., 1999).

A fenologia desta graviola, de acordo com Araújo Filho *et al.* (1998), os frutos levam de três a seis semanas para iniciar o seu desenvolvimento após a polinização, atingindo a maturação com cinco a seis meses, os quais devem ser colhidos quando a coloração verde-escura mudar para verde-claro-brilhante e as espículas (falsos espinhos) quebrarem-se facilmente, ou quando sob leve pressão do fruto, constatar-se que a polpa está um pouco mole. Por se tratar de uma fruta com riquíssima composição nutricional, a graviola apresenta inúmeras propriedades terapêuticas, podendo ser utilizada em sua totalidade. Aproveitam-se as folhas, as flores, os brotos, os frutos verdes ou maduros. A graviola pode ser utilizada sob a forma *in natura*, sob a forma de chás, preparada como cataplasmas que são sobrepostos diretamente nas afecções cutâneas e também em cápsulas que contêm os seus princípios nutricionais. Porém, uma das maiores descobertas sobre a graviola foi sua capacidade de agir contra as células do câncer, mostrando em testes de laboratório um potencial bastante significativo (JUNQUEIRA *et al.*, 1999).

3.2. *Annona muricata* L.

Annona muricata L. compreende cerca de 130 gêneros, que subordinam cerca de 2300 espécies. Desses gêneros, 51 são americanos, ocorrendo dois deles na África (*Annona* e *Xylopia*) e um na Ásia (*Anoxagorea*). No Brasil, estão presentes em toda sua extensão sendo registrada a ocorrência de 29 gêneros e cerca de 260 espécies (ALALI *et al.*., 1999).

De acordo Barroso, (1978) a família, uma das mais uniformes, do ponto de vista anatômico e estrutural, é muito distinta por apresentar uma combinação de caracteres marcantes. Na América tropical são arbustivas ou arbóreas e crescem nos campos ou em lugares abertos. Em geral, apresentam

folhas e lenho aromáticos. A Annonaceae esta dividida em duas subfamílias: Annonoideae e Monodoroideae. No Brasil é muito bem representada pela família Annonoideae, a qual está dividida em três tribos Uvarieae, Miliuseae e Unoneae. Cada tribo compreende certo número de gêneros, que podem ser identificados pelos caracteres comuns entre espécies. O gênero *Annona* pertence à tribo Unoneae.

Com relação à origem e distribuição da família, 51 gêneros e 950 espécies são originários da Ásia e Austrália. Da África e Madagascar se originam 40 gêneros com 450 espécies e no Continente Americano 38 gêneros e 740 espécies. Com base em dados fitogeográficos e palinológicos, a família Annonaceae provavelmente teve origem na África ou na América do Sul (LEBOEUF *et al.*, 1982).

Segundo CORRÊA (1984) algumas das características são: flores via de regra, andrógenas (raramente unissexuadas), terminais, axilares, opositifólias ou extra-axilares por concaulescência ou recaulescência, ou dispostas em fascículos ou em panículas caulinares, raramente, em ramos afilos ou subterrâneos. Perianto amarelado, esverdeado, ou purpúreo, diferenciado em cálice e corola. Cálice geralmente formado de três sépalas livres entre si (raramente só com 3-4 pétalas) Receptáculo alongado, com numerosos estames (raramente poucos), com anteras extrorsas ou introrsas, biculares, com lóculos alongadas, rimosos (ou com locelos transcersais), frequentemente terminadas por conectivo expandido e truncado. Só raramente os estames são laminares, como em *Anaxagorea*. Poucos a muitos carpelos, livres entre si, densamente dispostos, formando, em certos gêneros, um pseudosincarpo (pelo menos em estado frutífero): óvulos de 1-2 séries marginais: estilete presente ou ausente.

Trata-se de uma dicotiledônea da família Annonaceae, de hábito de crescimento ereto, flores perfeitas e hermafroditas, sendo o fruto uma baga composta, com casca apresentando espículas moles quando maduro. Popularmente, a gravioleira é conhecida como jaca-de-pobre, jaca-do-Pará, coração-de-rainha, araticum manso (EPSTEIN, 1999).

A gravioleira é uma das importantes frutíferas cultivadas no Nordeste brasileiro, região onde se adapta muito bem, principalmente nos Estados da Paraíba, Ceará, Pernambuco e Bahia, sendo seus frutos utilizados na fabricação de suco, sorvetes, compotas, geléias e doces (SACRAMENTO *et al.*, 2003).

Embora as condições ecológicas sejam favoráveis ao seu cultivo, os problemas fitossanitários, especialmente as pragas, vêm desestimulando o estabelecimento de plantios comerciais. A broca-do-fruto, *Cerconota anonella* (Sepp.) (Lepidoptera: Oecophoridae), é considerada uma das mais sérias pragas da gravioleira pelos danos expressivos que causa à cultura (BROGLIO-MICHELETTI; BERTI-FILHO, 2000).

Pesquisadores Faculdade de Biologia da Universidade de Vera Cruz, no Golfo do México, descobriram que as sementes da graviola são um poderoso inseticida, que acaba com o mosquito transmissor da dengue, além de destruir as larvas deste inseto, afirmam que o bioinseticida, mais efetivo que os inseticidas tradicionais, como também é mais resistente à luz e menos agressivo ao meio ambiente. Constataram, ainda, que a substância inibe as mudanças morfológicas, detém a metamorfose do inseto e impede que este passe para a fase adulta. (Jornal Folha de 07 de outubro de 2005)

Torna-se portanto, imprescindível que novas pesquisas se somem às já existentes, a fim de comporem um acervo realmente prático e viável para os produtores de Anonáceas.

3.3 Anatomia e Fisiologia do Trato Gastrointestinal

O sistema gastrointestinal é responsável pela digestão e absorção dos alimentos sendo um dos mais importantes sistemas endócrinos do nosso organismo. As principais funções do trato gastrointestinal relevantes para a farmacologia são a secreção gástrica, a motilidade intestinal e a eliminação fecal e a formação e eliminação da bile (RANG, 2004).

O trato gastrointestinal é constituído pelo esôfago, estômago, intestino delgado e cólon. É revestido pela musculatura lisa, responsável pela movimentação ativa e pela segmentação do conteúdo intestinal (GANGAROSA; SEIBERT, 2005).

O estômago tem origem a partir da região distal do intestino anterior. É um órgão sacular com volume entre 1200 a 1500ml, sua localização de estende desde o hipocôndrio esquerdo através do epigástrico. Sua parede é constituída por mucosa, submucosa, muscular e serosa. A superfície interna possui pregueamentos irregulares. Está dividido em cinco regiões: a cárdia, o fundo, o corpo, o antro e o esfíncter pilórico. É um órgão irrigado pelos ramos das artérias celíaca, hepática e esplênica (RUBIN, PALAZZO, 2006).

A histologia da mucosa gástrica se diferencia de acordo com a região anatômica, sendo que a superfície possui um epitélio colunar responsável por secreção de muco. As glândulas gástricas, principais elementos secretores do estômago são de três tipos: Glândulas cárdicas: contêm somente células que secretam muco; Glândulas parietais (oxínticas): são encontradas no corpo e no fundo do estômago e contêm células parietais, células principais e algumas células endócrinas; Glândulas pilóricas: contêm células secretoras de muco e células endócrinas. Os principais tipos celulares das glândulas gástricas são: Células mucosas: secretam muco e pepsinogênio I e II; Células parietais: exibem numerosas invaginações, canalículos secretórios, que ampliam a área para secreção gástrica; Células endócrinas: contêm aminas biogênicas – a serotonina e os hormônios polipeptídicos, gastrina e somatostatina (LIU, CRAWFORD, 2005; RUBIN, PALAZZO, 2006).

A motilidade intrínseca é determinada por influências neuro-hormonais. A inervação se dá por neurônios aferentes, motores extrínsecos e neurônios intramurais. O sistema nervoso simpático e parassimpático fornece inervação gastrointestinal extrínseca. A estimulação de receptores α e β - adrenérgicos resulta em inibição de contrações (GANGAROSA; SEIBERT, 2005).

3.3.1 Fisiologia da Secreção Gástrica

No sistema nervoso central – SNC, as estruturas mais envolvidas na secreção ácida gástrica são o núcleo motor dorsal do nervo vago, o hipotálamo e o núcleo do trato solitário. A liberação de acetilcolina pelas fibras vagais estimula diretamente a secreção de ácido através dos receptores M3 muscarínicos. A acetilcolina provoca efeito indireto sobre as

células parietais aumentando a liberação de histamina e de gastrina (GOODMAN; GILMAN, 2006)

Os mediadores mais essenciais da secreção gástrica são a gastrina (hormônio), a acetilcolina (um neurotransmissor) e a histamina (hormônio local). A secreção de ácido é estimulada pela histamina por meio dos receptores H₂, pela acetilcolina pelos receptores muscarínicos M₃, e pela gastrina, provavelmente pelos receptores de gastrina presentes nas membranas das células parietais (GANONG, 2000).

A gastrina e a histamina participam da estimulação das células parietais para a secreção de ácido clorídrico, exercendo forte efeito sobre este. A acetilcolina estimula as células produtoras de muco, células pépticas e parietais para a secreção de ácido. Esta favorece também a secreção de gastrina pelas células G das glândulas pilóricas que estimula por sua vez, a secreção gástrica ácida. A secreção ácida é inibida pelas prostaglandinas E₂ e I₂, as quais também estimulam a secreção de muco e bicarbonato. A gastrina é produzida pelas células G do antro, sendo um potente indutor da secreção ácida. Sua liberação é estimulada por diversas vias, incluindo a ativação do Sistema Nervoso Central – SNC. A somatostatina (SST) é produzida pelas células D do antro e inibe a secreção de ácido (PENILDON, 2006).

Dentre as secreções mais relevantes do estômago se destacam o ácido clorídrico, o pepsinogênio, o fator intrínseco e o muco. O ácido clorídrico participa da ativação do pepsinogênio e da prevenção de infecções por diversos microrganismos. O muco protege a mucosa contra o efeito ácido, enquanto que o pepsinogênio se converte em pepsina e participa da digestão de proteínas. Já o fator intrínseco permite a absorção da vitamina B₁₂ pelo íleo (PENILDON, 2006).

3.3.2 Fatores Agressores da Mucosa Gástrica

Aproximadamente 20% dos usuários regulares de antiinflamatórios na esteriodais- AINES desenvolvem uma úlcera de estômago ou duodeno. A importância das prostaglandinas (PG) na defesa da mucosa é evidenciada

pela capacidade dos AINE induzirem danos na mucosa gástrica, dano esse correlacionado com sua habilidade em suprimir a síntese de PG gástricas. Agentes que são fracos inibidores da síntese de PG, incluindo inibidores seletivos de COX-2, são menos ulcerogênicos (WALLACE, 2001).

Os danos à mucosa gástrica resultam de desequilíbrios entre diversos fatores, conhecidos como agentes desestabilizadores da barreira protetora da mucosa gástrica. As drogas antiinflamatórias não-esteroidais, consumidas por uma parte da população mundial exercem efeito agressor ao estômago, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de úlceras.

Não obstante, o acúmulo de hidrogênio (hipóxia gástrica), contribui para o aumento do meio ácido e formação da úlcera. Outro fator que favorece o aparecimento de lesões gástricas é mediado pelas espécies reativas de oxigênio formadas durante o metabolismo do ácido araquidônico e células da musculatura lisa (REPETTO; LLESUY, 2006).

Uma variedade de fatores produz danos a mucosa gástrica, incluindo eventos sistêmicos como estresse térmico ou contato direto na mucosa com vários irritantes que são comumente chamados de desestabilizadores da barreira da mucosa gástrica. O desequilíbrio entre agentes gastrotóxicos e mecanismos protetores resultam em inflamação aguda (KWIECIEN *et al.*, 2002a).

É possível inferir que os estímulos lesivos sobre a mucosa, determinantes da formação de úlceras pépticas, são acompanhados por danos na microvasculatura local, processo isquêmico com redução na disponibilidade de nutrientes, formação de radicais livres e lesão tecidual (TARNAWSHI, 2005).

3.3.3 Fatores Protetores da Mucosa Gástrica

O óxido nítrico - NO é um importante mensageiro intracelular e intercelular com significativas funções fisiológicas e que também participa de processos patológicos, incluindo os que afetam a mucosa gastrintestinal, mediando à resposta inflamatória (SHAH *et al.*, 2004). É sintetizado pela NO

sintetase (NOS) a partir de oxigênio molecular e L-Arginina. São reconhecidas três isoformas da NOS: uma forma induzida – iNOS e duas constitutivas – cNOS. A esse respeito, pesquisas têm evidenciado que, na dependência da isoforma, o NO exerce efeito protetor da mucosa gástrica, NO produzido pela cNOS, ou pró-ulcerogênico, NO produzido a partir da iNOS. São reconhecidas suas funções protetoras da mucosa gástrica pelo efeito sobre a circulação gastrintestinal, na secreção de muco gástrico e na regulação da secreção ácida (NISHIO *et al.*, 2006).

A produção constitutiva de NO é importante para manter a barreira protetora da mucosa gastrointestinal. Esse mecanismo protetor do NO pode ser devido a sua capacidade em aumentar do fluxo sangüíneo da mucosa e estabilizar a influência dos mastócitos (ALICAN *et al.*, 1996). Entretanto, o excesso na produção de NO associado com estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função

As prostaglandinas (PG) são produzidas a partir do ácido araquidônico por duas isoformas de cicloxigenase (COX) e estão presentes no trato gastrintestinal exercendo uma variedade de funções, incluindo a regulação da secreção ácida gástrica, a secreção de bicarbonato, a produção de muco e manutenção da integridade de mucosa. Quando administradas terapêuticamente protegem a mucosa gastrintestinal contra estimulação ulcerogênica e estresse causado por drogas antiinflamatórias não-esteroidais. Destaca-se um estudo pioneiro de Robert *et al.*, 1979, o qual pode demonstrar a proteção do estômago exercida pelas prostaglandinas. Posteriormente, foi demonstrada proteção gástrica exercida pela capsaicina através da estimulação de neurônios aferentes sensíveis à capsaicina, efeito em parte dependente das prostaglandinas endógenas (TAKEUCHI *et al.*, 2002).

A integridade da mucosa gástrica é determinada em grande parte pela ação da prostaglandina E2 (PGE2) e da prostaciclina (PGI2). Logo, a supressão da síntese de prostaglandina resulta em maiores possibilidades de injúria à mucosa gástrica, especialmente se decrescida a síntese de NO (ATAY; TARNAWSKI; DUBOIS, 2000).

Os compostos sulfidrílicos também participam da manutenção da integridade gástrica, sobretudo em lesões resultantes de estresse oxidativo. Nesse aspecto, é importante enfatizar que a glutatona reduzida (GSH) auxilia na eliminação de hidroperóxidos, atuando na remoção de radicais livres e, portanto, favorece a ação fisiológica das proteínas sulfidrílicas (SHIRIN *et al*, 2001).

O bicarbonato, secretado a partir das células epiteliais gástricas, exerce importante efeito gastroprotetor contra os efeitos deletérios do ácido. Este é regulado pela ação de diversas substâncias, como as prostaglandinas, o óxido nítrico, os neurônios aferentes sensíveis à capsaicina, peptídeos e outros fatores neurais (AIHARA *et al*, 2007).

A concentração bastante elevada de H⁺ no lúmen gástrico necessita de mecanismos rigorosos de proteção, dentre os quais o fluxo sanguíneo contínuo e adequado é extremamente importante. A camada de muco também representa relevante fator de defesa (GOODMAN; GILMAN, 2006).

3.4. Doença Péptica

A doença ulcerosa péptica se caracteriza então, pelo desenvolvimento de erosões ulcerosas em áreas do estômago e duodeno expostas à secreção ácida gástrica, estando fortemente associada ao uso freqüente de ácido acetilsalicílico ou outros agentes antiinflamatórios não-esteroidais e infecções provocadas pelo *Helicobacter pylori* (PENILDON, 2006).

Gastrite aguda é em muitos casos sinônimo de gastrite erosiva. Essa pode ser devida a um dano tóxico a mucosa gástrica, comumente ocasionada por antiinflamatórios não esteroidais (AINE) ou ingestão de álcool (LIPOF *et al.*, 2006).

A úlcera péptica representa uma desordem da mucosa gástrica e duodenal causada pela acidez da secreção gástrica de ocorrência mundial, a qual acomete milhões de pessoas, cujos gastos com tratamento e suas complicações estão situados em torno de bilhões de dólares. Constitui-se em uma doença crônica, de caráter recorrente bastante prevalente dentre as

doenças gastrintestinais. Geralmente, está associada a desequilíbrios entre os fatores protetores (secreção de muco e bicarbonato e produção de prostaglandinas) e agressores da mucosa (BIRDANE *et al.*, 2007; FALCÃO *et al.*, 2008).

Segundo Abitol (2005), as úlceras localizadas no estômago e no duodeno recebem a denominação de úlceras pépticas. Ocorrem mais frequentemente no duodeno, cerca de cinco vezes mais, sendo que em torno de 90% estão localizadas na junção pilórica. Quanto às úlceras de localização estomacal, 60% ocorrem no antro. É doença recidivante, mais incidente na população masculina, podendo se dá em qualquer faixa etária, porém, é mais prevalente de 30-55 anos (úlcera duodenal) e de 50-70 anos (úlcera gástrica).

Úlceras pépticas são lesões crônicas, em geral, únicas, que podem se desenvolver em qualquer área do trato gastrintestinal que esteja exposta à ação agressiva ácida. Apresentam, na maioria das vezes, menos que 4cm de diâmetro e se localizam nos seguintes sítios, em ordem decrescente: duodeno, estômago, junção gastroesofágica, nas margens de uma gastrojejunostomia (LIU; CRAWFORD, 2005).

Diferentes aspectos parecem estar envolvidos em sua ocorrência, muito embora, nenhum agente isolado pareça ser o responsável. Dentre eles, têm-se a própria secreção ácida gástrica, a pepsina, alimentação, drogas esteroidais e não-esteroidais, álcool, tabagismo, *stress*, traumas, infecção pelo *Helicobacter pylori* (DURSUN *et al.*, 2009).

Diferenças raciais na incidência de úlceras pépticas também foram observadas. Na África, úlceras duodenais são raras entre negros, enquanto que nos Estados Unidos, a incidência é a mesma em negros e brancos (RUBIN; PALAZZO, 2006).

Úlcera péptica é uma doença comum do trato gastrointestinal e a sua patogênese é multifatorial, incluindo infecções pelo *Helicobacter pylori*, aumento da concentração de ácido gástrico, de pepsina, alterações na motilidade gastroduodenal, hábitos de vida como o tabagismo e ingestão de

bebida alcoólica. Todas essas ações contribuem para o desequilíbrio entre os fatores agressores e protetores do estômago (EASTWOOD, 1997).

O estresse pode facilitar a evolução da infecção pelo *H. pylori* pela produção aumentada de ácido gástrico, levando a úlcera péptica (LEE et al., 1995). Muitos pacientes podem desenvolver inflamação crônica porque a evolução da gastrite crônica induzida pela *H. pylori* é assintomática. Outro tipo de gastrite crônica é o refluxo duodenal, esses casos são caracterizados por dor abdominal e vômito com bÍlis (LIPOF; SHAPIRO; KOZOL, 2006)

Estudos têm evidenciado que reações oxidativas e a peroxidação lipídica estão implicados na patogênese de lesões induzidas pelo etanol por ataque de moléculas biológicas e prostaglandinas (BIRDANE et al., 2007).

3.5. Inflamação

A inflamação é um processo complexo reacional a vários agentes nocivos, como os microrganismos e células danificadas, geralmente necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. A principal característica da inflamação é a reação dos vasos sanguíneos, que conduz ao acúmulo de fluido e leucócitos nos tecidos extravasculares. A mesma pode ser aguda ou crônica. A primeira tem início rapidamente e sua duração é relativamente curta, enquanto que a crônica, tem uma duração maior e está histologicamente associada à presença de linfócitos e macrófagos. As reações inflamatórias são desencadeadas por infecções e toxinas microbianas, traumas, agentes físicos e químicos, necrose tissular, corpo estranho e reações imunológicas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O processo inflamatório é regulado pela presença de mediadores inflamatórios específicos, dentre os quais, destacam-se as moléculas vasoativas que atuam aumentando a permeabilidade vascular; fatores quimiotáticos, que recrutam leucócitos. Esses leucócitos recrutados, por sua vez, secretam outros mediadores inflamatórios que incrementam ou inibem a resposta inflamatória (MURPHY; WARD, 2006).

Desta forma o processo inflamatório na mucosa intestinal representa um elemento chave para a defesa dessa. A resposta inflamatória adequada conduz ao reparo da mucosa, enquanto que o comprometimento ou prolongamento desse processo pode levar ao agravamento de lesões. Nesse sentido, a inflamação e a resposta imune secundárias à exposição a agentes nocivos, alteram a função motora do trato gastrintestinal, o que é importante para a compreensão de diversas terapêuticas (MARTIN; WALLACE, 2006).

3.6. Úlcera Péptica e os Modelos Animais.

Pesquisas em modelos animais, para avaliação de atividade antiúlcera e outras propriedades biológicas, vêm despertando o interesse de diversos pesquisadores, como fonte promissora para a descoberta de novas drogas, sobretudo, a partir de informações sobre o uso tradicional de espécies para esta finalidade pelas comunidades que utilizam os recursos naturais para o tratamento de suas enfermidades (GILANI; ATTA-UR-RAHMAN, 2005; CARVALHO, 2006).

A semelhança no mecanismo fisiológico da secreção ácida gástrica, a exemplo do mecanismo de regulação intracelular na concentração de íons hidrogênios pela bomba de prótons, torna a investigação da atividade antiúlcera viável. Aliado a isso, a literatura refere vários avanços nos modelos experimentais pela descoberta de novos recursos para indução de úlcera em animais com vistas à avaliação de propriedade gastroprotetora de diversas substâncias. Não obstante, os protocolos para essa avaliação, apresentam mecanismos próprios de investigação (BERNE *et al.*, 2004; SAMONINA *et al.*, 2004).

Entre os modelos para essa experimentação, tem-se: Lesão gástrica induzida por etanol e etanol acidificado (ROBERT *et al.*, 1979; MIZUI; SHIMONO; DOTEUCHI, 1987); Lesão gástrica induzida por estresse (SENAY; LENINE, 1967 *apud* LAPA *et al.*, 2008); Lesão gástrica induzida por indometacina (DJAHANGUIRI; SCAND, 1979 *apud* LAPA *et al.*, 2008); Determinação do muco da mucosa gástrica (CORNE, 1974 *apud* LAPA *et al.*, 2008); Determinação de

grupos sulfidrílicos não-proteicos da mucosa gástrica (SEDLAK; LINDSAY, 1968 *apud* LAPA *et al.*, 2008); Método da ligadura pilórica (VISSHER e col., 1974 *apud* LAPA *et al.*, 2008); Lesão gástrica crônica induzida por ácido acético (TAKAGI e col., 1969 *apud* LAPA *et al.*, 2008), dentre outros.

Para avaliação da atividade gastroprotetora, a lesão gástrica induzida por etanol é largamente empregada, sendo que neste modelo, as lesões são decorrentes da depleção de muco e de grupos sulfidrílicos e da formação de espécies reativas de oxigênio e produtos secretados pela ação dos mastócitos. Já as lesões decorrentes da administração de indometacina, são secundárias à redução substancial de prostaglandinas, bicarbonato e da irrigação sanguínea (RAO *et al.*, 2004).

A atividade antiúlcera de uma substância desconhecida pode ser determinada a partir de experimentação em modelos animais (LAPA *et al.*, 2008), configurando-se, em uma promissora fonte de princípio ativo para medicamentos. Acredita-se na relevância desses estudos como perspectiva para melhorar o acesso, sobretudo, de comunidades carentes, aos recursos terapêuticos.

3.7. Terapêutica Antiúlcera

Durante muito tempo, destinou-se tratamento cirúrgico para as úlceras pépticas com elevadas taxas de morbimortalidade. Avanços significativos ocorreram a partir da introdução do tratamento com antagonistas do receptor H2 de histamina, fato que se deu na década de 70. O tratamento com as drogas cimetidina ou ranitidina favoreceu a diminuição das cirurgias, na década de 80 (YUAN *et al.*, 2006).

A terapêutica da úlcera gástrica que tradicionalmente estava baseada na redução da secreção ácida gástrica, ressalta estratégias para erradicação do *H. pylori* com vistas à cicatrização das úlceras e prevenção de sua recorrência (PENILDON, 2006).

Basicamente, os agentes empregados na terapêutica antiulcerogênica, exercem efeito citoprotetor ou são inibidores da secreção ácida gástrica (BOOTHE, 1999). Os agentes antiácidos durante muito tempo foram as principais drogas empregadas no tratamento de úlceras, sendo

gradativamente substituídos por outros fármacos mais efetivos. Atuam neutralizando o ácido e elevando o pH gástrico. Administrados por longo tempo, exercem cicatrização de úlceras duodenais, sendo menos eficientes para as úlceras gástricas. Como exemplos, têm-se: o bicarbonato de sódio, o gel hidróxido de alumínio, o trissilicato de magnésio e os alginatos (RANG, 2004).

As drogas inibidoras da bomba de prótons exercem supressão da secreção de ácido gástrico, diminuindo diariamente a produção de ácido em cerca de 80 a 95%. São elas; o omeprazol, o esomeprazol, o lansoprazol, o rabeprazol e o pantoprazol. São empregadas na cicatrização de úlceras gástricas e duodenais. Já os antagonistas dos receptores H₂ inibem a produção de ácido ao competir de modo irreversível, com a histamina na ligação aos receptores H₂. Podemos encontrar as drogas: cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina, nesta classe. Essas drogas agem também na cicatrização de úlceras gástricas e duodenais. Os análogos das prostaglandinas (o misoprostol) diminuem a secreção de ácido gástrico, sendo que o grau de inibição mantém relação direta com a dose (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Pesquisas têm demonstrado o surgimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da úlcera péptica, dentre as quais merece atenção à medicina tradicional e o uso de plantas contendo triterpenos, diterpenos e flavonóides (SÁNCHEZ-MENDOZA *et al.*, 2009).

3.8. A Farmacognosia e a Importância dos Metabólitos Secundários

A Farmacognosia é o ramo da ciência que se dedica ao estudo dos produtos naturais, sendo estes definidos como compostos orgânicos de origem vegetal encontrados em um quantitativo reduzido e peculiar de espécies vegetais. Os metabólitos secundários representam os compostos predominantes nesse aspecto. São elementos que embora não estejam relacionados à sobrevivência das espécies que os produzem, guardam relação direta com a perpetuação da espécie e trazem vantagens, sob a forma de

proteção contra predadores, contra raios violetas, entre outras, às plantas. Apresentam, portanto, amplo valor entre a planta e seu ecossistema, possuindo a exemplo, ação fago inibidora contra o ataque de herbívoros e agentes antimicrobianos (SANTOS, 2007; MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005).

Tem-se ainda que o interesse nesse grupo peculiar de metabólitos se justifica pela característica de os mesmos possuírem atividades biológicas, sendo, portanto, vislumbrados, sobretudo, pela área da farmacologia (SANTOS, 2007). Ressalte-se que há uma diversidade desses compostos na natureza, embora, sua produção seja, conforme já exposto, peculiar a espécies restritas de vegetais.

Em relação às pesquisas com produtos naturais, avanços têm ocorrido, principalmente, na área da etnofarmacologia e da toxicologia. Os produtos naturais podem ser valiosos para a produção de medicamentos sintéticos dada às suas propriedades químicas e estruturais. É possível ainda, estimar que em média 40% dos medicamentos disponíveis atualmente tenham origem direta ou indireta a partir dos produtos naturais (MULLER-KUHRT, 2003; TULP; BOHLIN, 2004).

3.9. Fitoquímica de Annonaceae.

A fitoquímica é um ramo da química que estuda os produtos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais e compreende as etapas de isolamento, purificação e determinação estrutural desses metabólitos (BRAZ-FILHO, 1994). Quando associada a ensaios específicos de atividade biológica, a análise fitoquímica permite identificar, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas presentes em uma determinada espécie. Levando em consideração que nos extratos brutos os constituintes ativos estão normalmente presentes em pequenas concentrações (SCHENKEL *et al.*, 2000) e os processos de isolamento e purificação precisam ser mais eficientes.

Segundo YU, *et al.*, 1988, uma família onde estão presentes muitas árvores aromáticas. Economicamente possui apreciável importância como fonte de frutas comestíveis. Óleos das sementes são usados na produção de óleos alimentícios e sabões. O lenho de algumas plantas é empregado na produção de álcool. A fragrância das flores, de algumas espécies, é matéria-prima para perfumarias. Muitos membros desta família são usados na medicina, principalmente de uso popular .

O estudo químico e farmacológico de plantas Anonáceas tem se intensificado na última década e a investigação fitoquímica na busca de compostos de interesse químico e medicinal tem relevado uma constituição rica em compostos com grande variedade estrutural como alcalóides, flavonóides e terpenos, principalmente, diterpenos do tipo caurano que tem sido relatados em várias espécies desta família (LEBOEUF, *et al.*, 1982).

A família Annonaceae é rica na classe de compostos do tipo terpenóides. Andrade *et al.*, (2003) revisaram os terpenóides isolados nesta família entre 1954 e 2001 e verificaram um total de 518 terpenóides isolados divididos em 11 tipos diferentes de esqueletos.

Estudos ressaltam que sobre a atividade farmacológica da *Annona muricata* L. que apresenta atividade antiviral, através do extrato aquoso do caule e efeito antiproliferativo sobre células infectadas, *in vitro*, com HIV, o extrato etanólico da casca tem efeito sobre o vírus da herpes simplex 1, enquanto que o extrato da raiz apresenta atividade contra o tipo simplex 2 *in vitro*, (PADMA, *et al.*, 1998; BETANCUR-GALVIS, *et al.*, 1999). Tabela 1.

Tabela 1. Atividade farmacológica da espécie *Annona muricata* L.

PARTE DA PLANTA UTILIZADA	TIPO DE ATIVIDADE	REFERÊNCIA
Fruto verde	Antidiarréico, aftas, para combater piolhos e outros parasitas da pele	BORIES <i>et al.</i> , 1991
Folhas	Antiespasmódicas, antidisentéricas, hipoglicemiante, para tratar reumatismos e abscessos como sedativas e tranqüilizante.	CORRÊA, 1978; MARTINS, 1989; HASRAT, 1997; BORIES <i>et al.</i> , 1991.
Sementes	Inseticida, parasiticida adstringentes e eméticas	BORIES <i>et al.</i> , 1991; CORRÊA, 1978.
Raízes	Antídoto nos envenenamentos por entorpecentes como antiparasíticas e pesticida	CORRÊA, 1978; GLEYE, 1997b
Casca e Raiz	Sedativa, antiespasmódica e para tratar diabetes	VASQUEZ, 1990.

Jolad *et al.* (1982), investigaram por plantas com atividade antineoplásica, e testaram o extrato etanólico das raízes de *Uvaria acuminate* isolando uma substância de natureza graxa, a uvacarina. Esta nova substância apresentou atividade antitumoral *in vivo*, dando origem a uma nova classe de compostos naturais (SANTOS; BOAVENTURA; BRAGA, 1994). As acetogeninas são compostos naturais que apresentam importantes bioatividades: imunossupressora, antiprotozoário, anti-helmíntica, antifedante, antimicrobiana, pesticida e potente atividade antitumoral. Estão presentes na casca do caule, raízes, folhas e sementes de muitas Anonáceas. Compõem um grupo promissor de produtos naturais. Quanto a origem, são ácidos graxos modificados, caracterizam-se por apresentarem um esqueleto contendo de 35 a 37 átomos de carbono, um ou dois anéis tetrahidrofurânicos que podem ser adjacentes ou na, anel γ -lactônico, geralmente α,β -insaturado, separados por uma longa cadeia carbônica. Sua estrutura química induz a investigação

sintética. Por ser uma classe de compostos relativamente nova, mas com rápido crescimento, e devido as suas propriedades, esses compostos têm atraído considerável interesse para seu estudo químico, biológico e bioquímico. São especialmente encontradas em algumas Anonáceas do gênero *Annona*, as quais são árvores frutíferas como *Annona bullata* (araticum) *Annona reticulata* (verdadeira fruta do conde), *Annona muricata* (graviola), *Annona squamosa* (pinha).

O Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, na procura de novos agentes anticâncer, principalmente contra câncer de mama, próstata, ovário e cervical, realizou testes com cinquenta espécies de Annonaceas, onde o extrato da espécie cubana, *Annona bullata Rich* (araticum), demonstrou maior atividade antitumoral de todas as espécies testadas (AHAMMADSAHIB *et al.*, 1993, ARNASON, MATA e ROMEO, 1995).

Pesquisas de Gleye *et al* (1999) e Kim *et al* (2001), mostram que a Graviola possui um grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas anonáceas, uma classe relativamente nova de produtos naturais encontrados somente na família das plantas do gênero *Annona*.

Estudos realizados por Yuan *et al.*, 2003 sugerem que a Annonacina, uma acetogenina, isolada da *A. muricata* (LIAW *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1998; BORIES *et al.*, 1991), é um composto anticancerígeno promissor. OBERLIES *et al* (1995) demonstraram que acetogeninas de anonáceas constituem uma classe de compostos extremamente potente e que possuem atividade de inibição do crescimento celular seletiva para células cancerígenas e exibe toxicidade mínima em células não cancerígenas. As acetogeninas mostraram-se mais eficazes que o agente antineoplásico padrão, a adriamicina, e também foram ativas em células cancerígenas resistentes a adriamicina. A habilidade desses compostos em bloquear a formação de ATP foi também destacada como sendo o único modo de ação destes agentes antineoplásicos e uma esperança para o tratamento de tumores resistentes que requerem ATP para energizar o mecanismo transportador.

As acetogeninas são potencialmente bioativas e apresentam intenso potencial como agente antitumoral, citotóxico, imunossupressivo, pesticida,

antibacteriana e antimicrobiana (HISHAM *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1998a e 1998b; ROBLOT *et al.*, 1993; GLEYS *et al.*, 2001) e devido a essas atividades, esses produtos naturais têm atraído atenção dos pesquisadores nos últimos tempos.

Segundo Mann (1994) a bulatacina, acetogenina isolada desta espécie, apresentou atividade antitumoral tão potente quanto a do taxol (isolado da *Taxus brevifolia*), alcançando até 78% de inibição tumoral.

Levando em consideração outros constituintes químicos da família Annonaceae, investigações de diferentes partes de espécies desta família levaram ao isolamento de uma grande variedade de compostos (WATERMAN, 1986), a maioria dos trabalhos realizados nas décadas de 60 e 70, foram voltados para o isolamento de alcalóides. Leboeuf *et al.* em 1982, listou cerca de 170 alcalóides já isolados de diversos gêneros de Annonaceae, principalmente os do tipo isoquinolínicos.

Outra classe de componentes que recebeu considerável atenção foram os flavonóides, que são compostos polifenólicos e são classificados em flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides (FALK *et al.*, 1975; GUÉDON *et al.*, 1993; GUARDIA *et al.*, 2001).

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais, que possuem atividades biológicas diversificadas e estudando sua ação como antioxidante, foram desenvolvidas muitas pesquisas, envolvendo não só os compostos flavonoídicos, como também os seus precursores biossintéticos (RICHADISON *et al.*, 1974; PRATT; BIRAC, 1979; RIOS *et al.*, 1992). Os compostos polifenólicos estão presentes em frutas e vegetais (ANGELIS, 2001) como nozes, sementes, ervas, especiarias, flores, em diversos chás e vinho tinto. Eles são importantes compostos de frutas cítricas (KEFFORD; CHANDLER, 1970), aparecem em diversas fontes de alimentos e são consumidos regularmente na dieta humana (HERRMAN, 1976). O consumo destes compostos tem sido associado a efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e cânceres (ANGELIS, 2001).

Pesquisas revelaram mais de 4000 estruturas exclusivas dos flavonóides que foram identificadas em planta (HARBORNE *et al.*, 1975; HARBORNE, 1986; 1988 a,b). Primeiramente, eram reconhecidos como pigmento responsável

pelas cores amarela, laranja e vermelho, em flores e alimentos (TIMBERLAKE; HENRY, 1986; BROUIL; CHEMINANT, 1988).

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas e estas os usam para atrair polinizadores e repelir predadores, para colorir flores e para a proteção contra raios ultravioletas, quando expostas ao sol (ANGELIS, 2001), após pesquisas na área da farmacologia de alimentos fitoquímicos, um grande número de relatos tem estabelecido que os compostos fenólicos de plantas, incluindo os flavonóides, são potentes antioxidantes e também há relatos de possíveis efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos dos mesmos (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994; RICE-EVANS *et al.*, 1997).

Muitos extratos de plantas, particularmente os que contêm flavonóides, parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres (RL), e conseqüentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes RL.

Catequinas e flavonóides são metabolitos secundários presentes nas plantas e tem merecida atenção pelo largo espectro de suas atividades biológicas. Vários estudos relatam as propriedades antiulcerogênicas dos flavonóides (GRACIOSO *et al.*, 2002). Galati *et al.*, (2003) também relatam correlação entre atividade antiulcerogênica e antioxidante dos flavonóides.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Traçar um perfil toxicológico agudo e realizar uma triagem farmacológica no sentido de validar o uso da *Annona muricata* L no tratamento de úlcera péptica.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver pesquisa etnofarmacológica sobre a espécie *Annona muricata* L., para identificação das representações sociais sobre o imaginário popular e o cotidiano de uso da planta para fins medicinais nas comunidades da Região da Chapada do Araripe.
- Realizar teste hipocrático e de toxicidade aguda por via oral e intraperitoneal com determinação da DL50% do Extrato hidroalcoólico da *Annona muricata* L.(EHAM)
- Iden
- tificar o possível efeito antiulcerogênico (ou gastroprotetor) do EHAM em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina, e investigar possíveis mecanismos de ação do extrato.
- Determinar o efeito antimicrobiano e modulador de fármacos antibacterianos do EHAM contra linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Material Botânico (Origem e Obtenção dos Extratos Vegetais)

Para o estudo químico e farmacológico foram realizadas coletas de folhas da *Annona muricata* L.(graviola), assim como para o processo de herborização, no horto de plantas naturais da Universidade Regional do Cariri-URCA.

A herborização *Annona muricata* L. resultou na excicata número 4417 que foi depositado no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima- HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA. Figura 4.

O material botânico (folhas da *Annona muricata* L.) foi utilizado a fresco, lavado em água corrente, e depois de triturado, foi macerado e submetido à extração em solvente constituído de água destilada e etanol a 99%, na proporção 1:1, por um período de duas semanas. O extrato hidroetanólico foi concentrado, por destilação do solvente em evaporador rotativo a uma temperatura entorno dos 90° C, em seguida, o extrato bruto foi congelado e liofilizado, conforme evidenciado na Figura 5.



Figura 4. Exemplar de *Annona muricata* L. HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA sob o número: 4417.

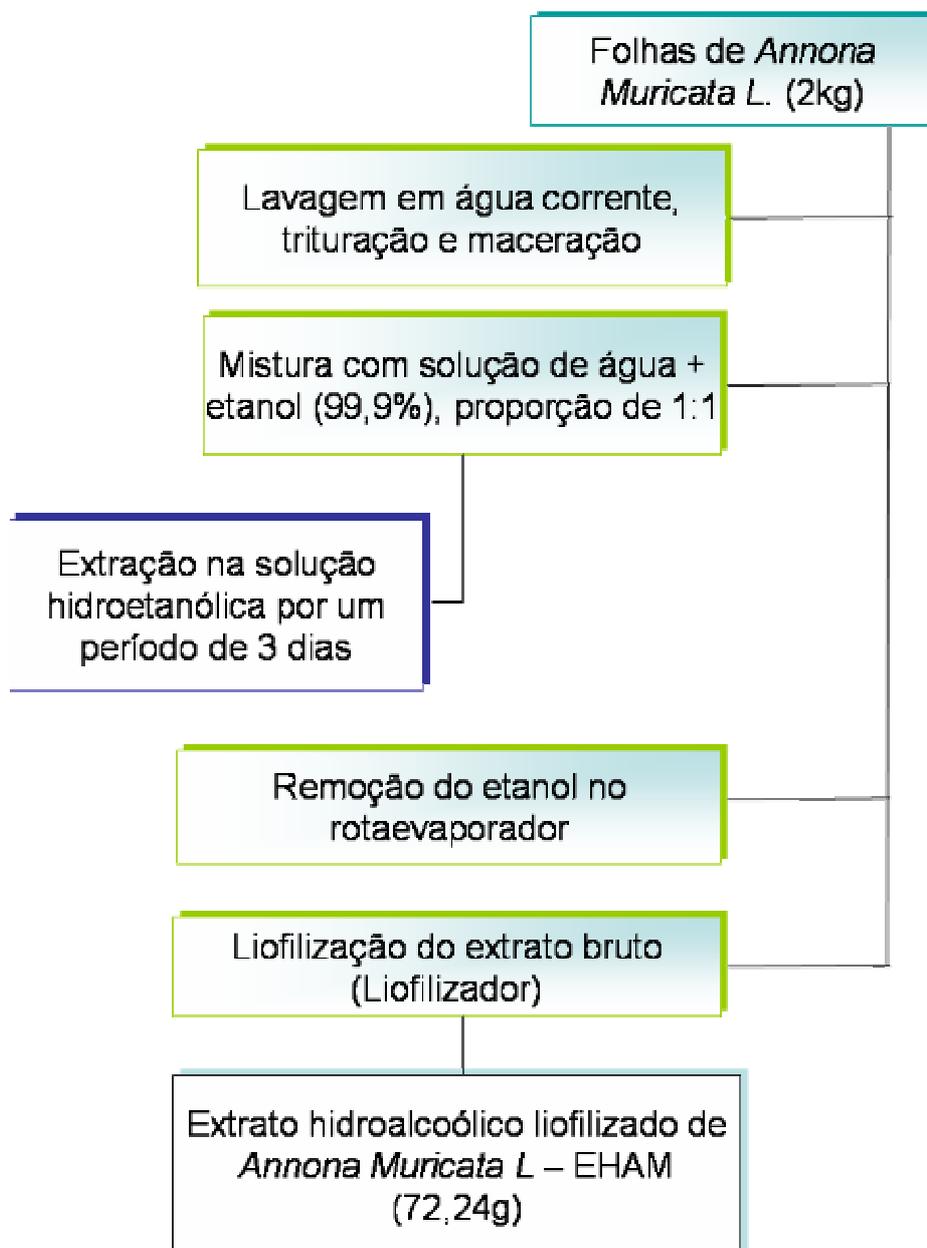


Figura 5. Fluxograma de obtenção do Extrato hidroalcoólico de *Annona muricata* L (EHAM).

5.1.2. Drogas e reagentes

Quanto às drogas e os reagentes utilizados, estes estão relacionados a seguir com suas respectivas procedências:

SUBSTÂNCIA	ORIGEM
Ácido clorídrico (HCL)	Sigma, U.S.A.
Amicacina	Sigma Chemica Co , U.S.A.
Atropina	Sigma, U.S.A.
Capsaicina	Sigma, U.S.A.
Etanol absoluto 99%	(Química Especializada Erich,
Éter etílico	Brasil)
Formalina	Sigma-Aldrich, U.S. A.
Gentamicina	Fluka, Alemanha
Glibenclamida	Sigma Chemica Co , U.S.A.
Indometacina (Indocid®)	Sigma,U.S.A.
loimbina	Merck Sharp & Dohme, Brasil
Kanamicina	Sigma, U.S.A.
L-Arginina	Sigma Chemica Co , U.S.A.
Misoprostol	Sigma,U.S.A.
Neomicina	Continental Pharma, Itália
N-nitro-L-arginina-metilestar (L- NAME)	Sigma Chemica Co , U.S.A. Sigma, U.S.A.
Solução fisiológica NaCl 0,9%	FARMACE, Brasil

5.1.3 Material permanente e equipamentos utilizados

Balança analítica de precisão (Metler Toledo AB204)

Banho-maria (Modelo 100, Fanem Ltda.)

Cronômetros digitais (LivStar)

Cânulas de gavagem para camundongos

Extrator de Soxhlet

Materiais de biossegurança

Material cirúrgico

Pipetas automáticas (Maxipette)

Rotaevaporador (Fisatom)

Seringas estéreis (1 mL, 3 mL e 5 mL)

Tubos Eppendorffs

Vidrarias gerais

5.1.4 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com Matos, 1997. As classes de metabólitos secundários identificados no extrato estão descritas na **tabela 2**.

Executou-se a avaliação fitoquímica conforme descrito: por Matos, 1997, a fração dos extratos hidroalcoólicos liofilizados obtidos das folhas (0,3g) foi diluída em água destilada (9/ml) e etanol a 70% (21/ml) e após a diluição, distribuídos em seis frascos, procedendo-se a partir de então aos testes – Teste 1, para Fenóis e Taninos, empregando-se cloreto férrico; Teste 2, para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides, através do uso do ácido clorídico;

Teste 3, para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavononas, de alcalinização a pH: 8,5 com hidróxido de sódio a 1%; Teste 4, para Chauconas e Auronas, de alcalinização a pH: 11 com hidróxido de sódio a 1%; Teste 5, para verificação de Flavononas; de acidualização a pH: 3,0 com ácido clorídico e aquecimento por 02 minutos, Teste 6, também para verificação de flavononas, de alcalinização a pH: 11 e aquecimento por 02 minutos.

O teste para alcalóides foi realizado diluindo-se fração dos extratos hidroalcólicos liofilizados obtidos das folhas (0,3/g) em 30 ml de ácido acético a 5% e 15ml de amônia, esta para alcalinização. Procedeu-se o aquecimento até fervura deste preparado, alcalinização com hidróxido de amônia a 10% (10ml), adição de clorofórmio (15ml), homogeneização e repouso em funil de separação, coleta da fase clorofórmica em Béquer, evaporação do solvente, adição de ácido clorídico a 1%, homogeneização, aplicação sobre uma lâmina, aplicação de uma gota de reagente Dragendorff, observando-se a formação de precipitado que seria indicativo da presença de alcalóides .

Tabela 2. Prospecção Fitoquímica do extrato hidroetanólico bruto liofilizado da *Annona muricata* L.

METABÓLITOS	(+) presença
	(-) ausência
Fenóis	-
Taninos Pirogálicos	+
Taninos Flobatênicos	-
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	+
Flavonóis	-
Xantonas	-
Chalconas	-
Auronas	-
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	-
Catequinas	-
Flavononas	+
Alcalóides	+
Terpenos	-
Esteróides	-

5.1.5 Animais

Os ensaios para observação de atividade gastroprotetora do extrato foram realizados com camundongos "Swiss" (*Mus musculus*) machos e fêmeas, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte- FMJ. Os animais foram conduzidos para a sala de experimentação dois dias antes dos ensaios e mantidos em ciclo entre claro e escuro de 12/h, sendo as luzes ligadas as 07:00/h, mantidos com água comum e ração *ad libitum*. No dia anterior aos testes os animais foram marcados e acondicionados em caixas em cama de maravalha, a ração foi retirada 18:00/h antes dos ensaios, sendo a água sempre mantida. O peso de jejum foi determinado.

5.2 Métodos

5.2.1 Tipologia do Estudo

Em conformidade com o objeto de pesquisa, desenvolveu-se um estudo experimental randomizado, este com capacidade de demonstrar causalidade (HULLEY, *et al*, 2006) em modelos animais, a partir da adoção de intervenções ativas, em um grupo caso, e bem controlada com o uso de um princípio ativo que se pretendeu por em prova (intervenção, neste caso, observando-se os possíveis efeitos bioativos do extrato liofilizado da graviola - Gastroproteção) e outro (grupo controle) que receberá sempre uma abordagem/tratamento convencional.

5.2.1.1 Pesquisa Etnofarmacológica

Empregou-se um estudo randomizado, desenvolvido na área rural dos municípios de Crato e Santana do Cariri, no estado do Ceará, e Exu, no Estado de Pernambuco. Foi utilizado como critério de exclusão da amostra os informantes que desconheciam o uso da *Annona muricata* L. (Graviola) para fins medicinais. Desse modo, a amostra esteve representada por 41 informantes que atribuíram valor de uso medicinal para a espécie.

O período de estudo compreendeu os meses de junho e julho de 2009, no qual foram realizadas entrevistas semi-estruturadas com os informantes. Para fins de composição de amostra foi empregada a técnica de amostragem por saturação de dados (POLIT; BECK; HUNGLER, 2004). A análise dos dados ocorreu através da estatística descritiva (frequência simples e percentual), abordando-se o uso medicinal das espécies (modo de preparo e administração, partes utilizadas da espécie, a duração do tratamento e a frequência das doses e restrições ao uso); o índice de *Fidelity Level* (FL) – Nível de fidelidade, proposto por Friedman *et al*, 1986 (ALBUQUERQUE; LUCENA; CUNHA, 2008.), conforme a fórmula:

$FL = (I_p/I_u) \times 100\%$, onde:

I_p = número de informantes que sugerem o uso de uma determinada espécie para uma proposta principal;

I_u = número total de informantes que citaram a espécie para qualquer finalidade.

Com relação a *Relative Frequency of Citation* (RFC) - Frequência relativa de citação, obtida a partir da razão:

FC/N , onde :

FC representa o número de informantes que mencionaram o uso da espécie.

N , o número total de informantes do estudo (TARDIO; PARDO-DE-SANTAYANA, 2008).

5.2.2 Ensaios Pré-Clínicos Farmacológicos *in vivo*

5.2.2.1 Investigação da Toxicidade Oral Aguda do EHAM e *screening* Hipocrático

Foram realizados seguindo os procedimentos e recomendações descritas pelo OECD, 2008.

a) Preparo dos animais

Para esta finalidade foram utilizados cinco animais (camundongos "Swiss") fêmeas, selecionados randomicamente, acondicionados individualmente em caixas e aclimatizados em uma temperatura média de 22°C (\pm 3°C), mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas cada, com ração padrão e água *ad libidum*, observados por um período de catorze dias.

b) Procedimento Experimental

O EHAM foi dissolvido em solução salina a 0,9% nas concentrações de 17,5; 55; 175; 550; 2000 e 5000mg/Kg v.o. e i.p., mg/Kg v.o. e i.p. inicialmente, sendo que cada animal recebeu uma concentração diferente e o volume administrado foi de 0,1ml/10g de peso corporal por animal./Kg v.o. e i.p.

Todas as observações foram registradas sistematicamente e individualmente. Para as observações foram consideradas as alterações na pele e pêlos, nos olhos e nas mucosas, e também nos sistemas respiratório, circulatório, nervoso autônomo e central, atividade motora e ainda comportamental. Outros parâmetros avaliados foram a ocorrência de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma (OECD, 2008).

Em seguida ao experimento, a dose de 5000/mg/Kg do EHAM foi administrada v.o. a três animais, tendo em vista a não ocorrência de óbito com as doses de até 2000/mg/Kg. Entretanto, o procedimento de administração i.p. não recebeu essa dosagem dada a ocorrência de óbito em doses menores.

A dose letal média – DL 50% foi calculada através do Programa LC50 Moden System (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

5.2.2.2 Investigação Atividade Gastroprotetora

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

Foram utilizados camundongos "Swiss", divididos em grupos (n=6), seguindo-se o protocolo experimental: Jejum por um período de 15 a 18 horas, obtenção do peso e identificação. Partindo-se do objetivo de otimizar a melhor dose eficaz para gastroproteção, realizou-se um screening de doses do Extrato Hidroalcoólico da *Annona muricata* L. - EHAM (50,100, 200, e 400 mg/Kg, v.o., cada teste efetuado com n=6), o omeprazol (30mg/Kg, para o grupo

controle positivo), ou o veículo (solução salina a 0,9%, 0,1ml/10g para o grupo controle negativo) 1h antes da administração do etanol_{obs} (0,2 mL/animal, v.o.). Após decorridos 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitalizados, com posterior análise através do "software" (ImageJ). A área lesionada foi expressa em termos de porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

b) Lesão gástrica induzida por etanol acidificado (MIZUI; SHIMONO; DOTEUCHI 1987)

Para fins de investigação dessa atividade foram utilizados camundongos "Swiss," divididos em grupos (n=6), seguindo-se o protocolo experimental: Jejum por um período de 15 horas, obtenção do peso e identificação. Receberam tratamento com o EHAM (50, 100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.), o omeprazol (30mg/Kg, para o grupo controle positivo), ou o veículo (solução salina a 0,9%, 0,1ml/10g para o grupo controle negativo). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 0,2 mL de uma solução 0,3 M de ácido clorídico - HCl em etanol a 60 % e após 1 hora foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com salina 0,9% e comprimidos entre duas lâminas, escaneados e digitalizados, com posterior análise através do software (ImageJ).

c) Lesão gástrica induzida por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969).

O estudo da avaliação se deu através do uso de camundongos "Swiss", divididos em grupos (n=6), seguindo-se o protocolo experimental: Os animais foram colocados em jejum por um período de 15 a 18 horas, em seguida, pesados e identificados. Administrou-se tratamento com o EHAM (200 e 400 mg/Kg, v.o.), o omeprazol (30mg/Kg, para o grupo controle positivo), ou o veículo (solução salina a 0,9%, 0,1ml/10g para o grupo controle negativo). Após uma hora foi administrado subcutaneamente a indometacina (10mg/Kg) e após três horas da administração do agente lesivo, foram repetidos os tratamentos com o veículo, o extrato e o omeprazol. Seis horas após a

administração da indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura.

d) Estudo dos Possíveis Mecanismos Envolvidos na Atividade Gastroprotetora do EHAM.

Para fins de estudo dos mecanismos possivelmente envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato, empregou-se a dose efetiva (efeito com menor dose), sendo eleita a dose de 200mg/Kg do EHAM. Testaram-se cinco mecanismos de provável ação do extrato, descritos a seguir.

Avaliação do envolvimento do Óxido Nítrico (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

O envolvimento do óxido nítrico foi avaliado pela administração do EHAM (100mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes do L-NAME, sendo que após 30 minutos deste foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos analisados como descrito anteriormente. Para o outro grupo tratado foi administrado EHAM (200mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes da L-arginina (600mg/Kg v.o.) e esta, 30 minutos antes do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.), após este procedimento, os animais foram sacrificados e os estômagos analisados

Para o grupo controle positivo, empregou-se L-arginina (600mg/Kg v.o.) 01 hora antes do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) e decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados e, prosseguiu-se a análise dos estômagos. O grupo controle foi testado a partir da administração de L-NAME, 30 minutos antes do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

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

O envolvimento dos canais de potássio dependentes de ATP foi avaliado pela administração do EHAM (200mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes da Glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) e após 30 minutos, administrou-se o etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do

etanol os animais foram sacrificados, os estômagos analisados conforme já referido nesse capítulo. O grupo controle foi tratado pela administração de Glibenclamida (5 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.)

Estudo do envolvimento das Prostaglandinas (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

O envolvimento das prostaglandinas foi avaliado em dois grupos tratados. Primeiro, pela administração do EHAM (200mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes da Indometacina (10 mg/kg, v.o.), sendo que após 2 horas desta foi administrado etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 min da administração do etanol, os animais foram sacrificados, os estômagos analisados. Para o outro grupo tratado foi administrado EHAM (200mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes Misoprostol (0,016mg/Kg v.o.) e este, 1 hora antes do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.),

Envolvimento dos Receptores noradrenérgicos alfa₂

O envolvimento dos receptores noradrenérgicos alfa₂ foi avaliado pela administração do EHAM (200mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes da loimbina (2 mg/kg, i.p.) e após 30 minutos, administrou-se o etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). O grupo controle foi tratado pela administração de loimbina (2 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

Envolvimento dos Neurônios Aferentes Sensíveis à Capsaicina (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

O envolvimento dos receptores da Capsaicina foi avaliado pela administração do EHAM (200mg/Kg, v.o. – Grupo tratado) 01 hora antes da Capsaicina (4mg/kg, v.o.) e após 1 hora, administrou-se o etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Decorridos 30 minutos da administração do etanol os animais foram sacrificados, os estômagos analisados conforme já referido nesse capítulo. O grupo controle positivo foi tratado pela administração de Capsaicina (4mg/kg, v.o.) 1 hora antes da administração do etanol_{abs} (0,2

mL/animal, v.o.) e com 30 minutos, os animais receberam o sacrifício. O grupo controle recebeu solução salina a 0,9%, 0,1ml/10g v.o. 30 minutos antes da administração do etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.).

5.2.2.3 Determinação da Motilidade Intestinal (LAPA et al, 2008)

Esse método consiste na administração de um marcador colorido (carvão ativado) foram utilizados camundongos "Swiss," ambos sexos, em jejum de sólidos por 6 horas, com fornecimento de água, divididos em grupos (n=10), os quais foram tratados com EHAM (200mg/Kg, v.o.), veículo (solução salina a 0,9%, 0,1ml/10g v.o.), atropina (0,01g/Kg v.o.) e carvão ativado a 10% (0,1ml/10g v.o.). Procedeu-se a administração do EHAM (Grupo tratado), da atropina (Grupo controle positivo) e veículo (Grupo controle), após 1 hora, administrou-se o carvão e decorridos 30 minutos desse, efetuou-se o sacrifício dos animais por deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta, onde o estômago e intestino delgado foram removidos. Com auxílio de uma régua, foi determinado o comprimento total 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 contenha pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado.

5.2.2.4 Investigação da Atividade Antibacteriana

a) Linhagens bacterianas (COUTINHO et al., 2005)

Foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Escherichia coli* (EC27) e *Staphylococcus aureus* (SA358) com perfil de resistência identificado na tabela 3. Todas as cepas foram mantidas em *slants* com *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes do ensaio, as células foram cultivadas durante a noite a 37°C em infusão cérebro coração, BHI, Difco Laboratories Ltda. (COUTINHO et al., 2005).

Tabela 3. Origem Bacteriana e Perfil de Resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>E. coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Aztreonan; Amoxicilina; Ampicilina; Amicacina; Amoxicilina; Cefadroxil; Cefaclor; Cefalotina; Ceftazidima; Ciprofloxacina; Cloranfenicol; Imipenem; Kanamicina; Sulfametrim; Tetraciclina; Tobramicina.
<i>S. aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxacilina; Oxacilina; Tobramicina, Amicacina, Kanamicina, Neomicina; Paramomicina; Butirosina; Sisomicina; Netilmicina.

A Concentração inibitória mínima (CIM) de cada extrato foi determinada em um ensaio de microdiluição (Javadpour et al, 1996), utilizando-se um inóculo de 100µL de cada linhagem bacteriana, suspensas em caldo *Brain Heart Infusion* – BHI até uma concentração final de 10⁵ colony-forming units/mL em placas de microdiluição com 96 poços, com diluições em série ½. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução de cada extrato. As concentrações finais dos extratos foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8µg/mL. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para inibição do crescimento.

O efeito potencializador dos extratos foi testado contra linhagens de *Escherichia coli* (EC27) e *Staphylococcus aureus* (SA358) combinados com os seguintes agentes antimicrobianos: Gentamicina, Kanamicina, Neomicina e Amicacina nas concentrações finais de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1µg/mL. As placas foram incubadas aerobicamente por 24 horas a uma temperatura de 37°C.

5.2.3 Expressão dos Dados e Análise Estatística.

Os resultados foram expressos como médias ± erro padrão das médias de cinco a sete animais por grupo.

Todos os dados que obedeceram a uma distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5.3 Aspectos Éticos da Pesquisa.

A adoção de procedimentos éticos rigorosos e o seguimento de protocolos validados para ensaios farmacológicos com animais e pesquisa envolvendo seres humanos, que nortearam o desenrolar da pesquisa, justificam-se pelo entendimento por parte dos pesquisadores, de que não se concebem a realização de estudos que desrespeitam as recomendações e consensos éticos.

Dessa forma, o estudo esteve em conformidade com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: humanos (Resolução Nº 196/1996 e 301/2000 do Conselho Nacional de Saúde – CNS), animais não-humanos (Guide for the care and use of laboratory animals, do NIH - National Institute of Health-EUA, 1996; Princípio dos 3R's – Replace, Reduce and Refine, de Russel e Burch, 1959; Lei Federal Nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998) (BAZZANO, 2006; MACHADO *et al*, 2006; BRASIL, 2006, 2008).

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ e recebeu parecer favorável sob número de processo: **2009_ 0438**.

5.4 Instituições Parceiras e Financiamento

A realização desse estudo contou com o apoio dos profissionais do Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas Dr. Leão Sampaio; Biotério da

Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ); Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) e Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, da Universidade Regional do Cariri – URCA.

Os recursos financeiros foram advindos do Programa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

6. RESULTADOS

6.1 Pesquisa etnofarmacológica

a. Informantes

O perfil dos informantes (n=41), que utilizam a espécie *Annona muricata* L. (Graviola), conforme demonstrado na tabela 4, retrata prevalência geográfica, 23 (56,00%) entrevistados para o Município de Crato – CE, sendo 19 (46,34%) na faixa etária de 40 a 58 anos, 11 (26,82%) com residência na área de 50 a 59 anos, 25 (61,00%) do sexo feminino, 30 (73,17%) agricultores e 27 (65,85%) informaram não exercer atividade laboral com plantas medicinais. (Tabela 4)

Tabela 4. Perfil dos informantes da espécie *Annona muricata* L. (Graviola) em localidades da Biorregião do Araripe, Crato – CE, Santana do Cariri – CE e Exu – PE.

Município	Localidade	N	%
Crato – CE	Sítio Matinha	01	2,44
	Sítio Barreiro Grande	06	14,62
	Sítio Minguiriba	09	21,94
	Sítio Cajueiro	07	17,00
Exu – PE	Sítio Boa Vista	05	12,29
Santana do Cariri – CE	Sítio Lírio	01	2,44
	Sítio Guritiba	12	29,27
Faixa etária			
	23-38	10	24,39
	40-58	19	46,34
	60-80	12	29,27
Sexo			
	Masculino	16	39,00
	Feminino	25	61,00

Tempo de residência na área		
< 5 anos	01	2,44
≥ 5 < 10 anos	02	4,88
≥ 10 < 20 anos	01	2,44
≥ 20 < 30 anos	03	7,31
≥ 30 < 40 anos	05	12,20
≥ 40 < 50 anos	10	24,39
≥ 50 < 60 anos	11	26,83
≥ 60 < 80 anos	08	19,51
Ocupação		
Agricultor(a)	30	73,17
Comerciante	01	2,44
Auxiliar administrativo	01	2,44
Agente comunitário de saúde	02	4,88
Do lar	02	4,88
Acompanhante de idoso	01	2,44
Aposentado	04	9,75
Atividade laboral com plantas medicinais		
Sim	13	31,71
Não	27	65,85
Não informado	01	2,44

b. Considerações sobre o uso medicinal da espécie *Annona muricata* L.

Apresenta-se na tabela 5 o nível de fidelidade identificado para a espécie *Annona muricata* L. (Graviola) quanto ao uso medicinal nos seguintes

municípios estudados (Crato – CE, Santana do Cariri – CE e Exu – PE). Observa-se que entre as indicações medicinais mais relatadas estão o câncer e as afecções respiratórias (gripe) presentes nos relatos das três localidades apresentando para o município de Crato-CE, nível de fidelidade de 10,0% e 30,0%, respectivamente. Para o município de Santana do Cariri-CE este foi 6,25% e 31,25%, respectivamente. Para a localidade de Exu-PE, o mesmo foi de 60,0% e 80,0%, respectivamente. É importante mencionar o uso para processos inflamatórios em 15,0% e 6,25% para Crato-CE e Santana do Cariri-CE, respectivamente. O uso para dor e reumatismo foi citado em Crato-CE, apresentando nível de fidelidade de 20,0% e 15,0%, respectivamente.

Tabela 5. Comparação do Nível de Fidelidade (FL) sobre as indicações medicinais do *Annona muricata* L. (Graviola) em áreas da Biorregião do Araripe, Crato – CE, Santana do Cariri – CE e Exu – PE.

CRATO (Pernambuco)		SANTANA DO CARIRI (Ceará)		EXU (Pernambuco)	
DOENÇAS	FL	DOENÇAS	FL	DOENÇAS	FL
Ferimentos	10.0	Diabetes	12.5	Câncer	60.0
Inflamação	15.0	Efeito emagrecedor	6.25	Gripe	80.0
Efeito emagrecedor	10.0	Inflamações do aparelho reprodutor feminino	6.25		
Inflamação vaginal	15.0	Calculo renal	6.25		
Dor	20.0	Febre	6.25		
Infecção	15.0	Hipertensão	6.25		
Câncer	10.0	Câncer	6.25		
Doenças da		Gripe			

próstata		31.25
	10.0	
Reumatismo	5.0	
Hipertensão	50.0	
Menopausa	50.0	
Cálculo renal	10.0	
Doenças pulmonares	30.0	

A descrição sobre as partes da espécie *Annona muricata* L., mais utilizadas pelos informantes para fins medicinais, sendo assim as partes da planta mais utilizadas são as folhas (37 indicações) e frutos (4 indicações), com grande prevalência do uso das folhas. Tabela 6.

O modo de preparo medicinal para a espécie *Annona muricata* L. também foi objeto de investigação, para a planta estudada, observou-se que o decocto com água representa o modo mais prevalente, a qual foi indicada 40 informantes (97,56%), e apenas um faz uso do decto com mel (2,44%).

O modo de aplicação mais amplamente empregados pela comunidade foi à ingestão oral e o banho, sendo relatado um percentual de 97,56% (40 informantes) e 2,44% (01 informante).

A relação entre a indicação medicinal, a duração do tratamento e a frequência da dose empregada no uso da espécie, são aspectos importantes. Pois para cada afecção referida, há uma variação na duração da terapia e frequência da dose. No entanto, com relação ao tempo de tratamento empregado, pode-se verificar que este variou desde indeterminado até

remissão dos sintomas. E no que diz respeito à frequência da dose, esta esteve situada entre 2-3 vezes/dia.

Tabela 6. Indicação medicinal versus duração do tratamento e frequência da dose da espécie *Annona muricata* L. (Graviola).

Indicação	Frequência da dose (Duração do tratamento)
Infecções	2-3 vezes/dia (ARS)
Doenças da próstata	2-3 vezes/dia (ARS)
Neoplasias	2-3 vezes/dia (ARS)
Reumatismo	2-3 vezes/dia (ARS)
Hipertensão	2-3 vezes/dia (ARS)
Cálculo renal	2-3 vezes/dia (ARS)
Afecções respiratórias	2-3 vezes/dia (ARS)
Dor	2-3 vezes/dia (ARS)
Menopausa	2-3 vezes/dia (ARS)
Inflamação vaginal	2-3 vezes/dia (ARS)
Febre	2-3 vezes/dia (ARS)
Diabetes	2-3 vezes/dia (ARS)
Inflamação	2-3 vezes/dia (I)
Emagrecedor	Contínuo (I)

(ARS): Até remissão dos sintomas

(I): Indeterminado

Os dados etnofarmacológicos sobre a espécie estudada, foram complementados com a investigação de possíveis restrições ao seu uso significando que a totalidade, ou seja, 100% não possui restrição para sua utilização

6.2 Teste Hipocrático e de Toxicidade Aguda do EHAM

Realizou-se teste hipocrático para toxicidade oral e intraperitoneal aguda em dose única em camundongos, com acompanhamento por 14 dias, nas doses de 17,5, 55, 175, 550, 2000 e 5000mg/Kg v.o. e esta mesma seqüência de doses por via intraperitoneal. Nesse sentido, não houve sinais de morbidade relevante, nem tampouco mortalidade no grupo tratado por via oral em todas as doses. No entanto, para os animais que receberam o extrato via intraperitoneal, não foram observados dados relevantes, sendo assim considerado seguro. Assim, a DL_{50%} para a administração intraperitoneal do EHAM é de 3162,28mg/Kg, com intervalo de confiança de 95%.

Os animais que receberam as doses por via oral e intraperitoneal demonstraram diminuição da atividade e dispnéia leve, demonstrando recuperação em quatro horas. Exceção feita ao animal (5000mg/Kg, i.p.) com o quadro de evolução ao óbito, que se encontra armazenado em local e temperatura adequada para estudos posteriores.

6.3 Atividade Microbiológica do EHAM

O EHAM demonstrou atividade antimicrobiana pouco significativa contra as linhagens bacterianas testadas, com valor de CIM \geq 1024.

O EHAM na concentração de 128 μ l/ml foi combinado com os antibióticos testados, ver tabela 7, demonstrando efeito potencializador importante quanto à ação antibacteriana das drogas utilizadas para controle.

TABELA 7. Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de aminoglicosídeos na presença e ausência de $16\mu\text{g/ml}$ de EHAM, *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358.

	EC 27		AS358	
	MIC	MIC combinado	MIC	MIC combinado
Antibióticos	EHAM		EHAM	
Garamicina	2500	2,4	39	4,8
Canamicina	2500	62,5	2500	62,5
Amicacina	156,2	9,7	78,1	9,7
Neomicina	312,5	19,5	312,5	78,1
EHAM	≥ 1024	-	≥ 1024	-

6.4. Avaliação da Atividade Antiulcerogênica

6.4.1. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol_{abs} em camundongos

A administração de etanol_{abs} induziu a produção de lesões na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia, com índice total de úlceras de $18,57 \pm 2,12$;

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol_{abs} foram menores (em tamanho e quantidade) nos grupos pré-tratados com o EHAM em doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, podendo ser observado pela redução do índice de lesões em 92,89%; e, 94,13%, 97,79%, e 96,49% respectivamente, reduzindo o índice de úlceras no grupo pré-tratado com o EHAM. (figura 6 ; anexo I).

Mostrando assim que o EHAM na dose de 200mg/kg v.o, para tratamento de lesões gástricas induzidas pelo o etanol_{abs} em camundongos,

mostrou-se mais efetiva que a droga padrão utilizada no grupo controle (omeprazol), seguida da dose de 400 mg/kg, reduzindo o índice de úlceras em 97,79% e 96,49%, respectivamente (figura 7) Os animais que receberam omeprazol (30mg/Kg v.o.) também demonstraram redução significativa nas áreas gástricas lesionadas e significativo percentual de redução de úlceras, sendo estes de 95,79%, com valores de $p < 0,001$ comparado ao controle.

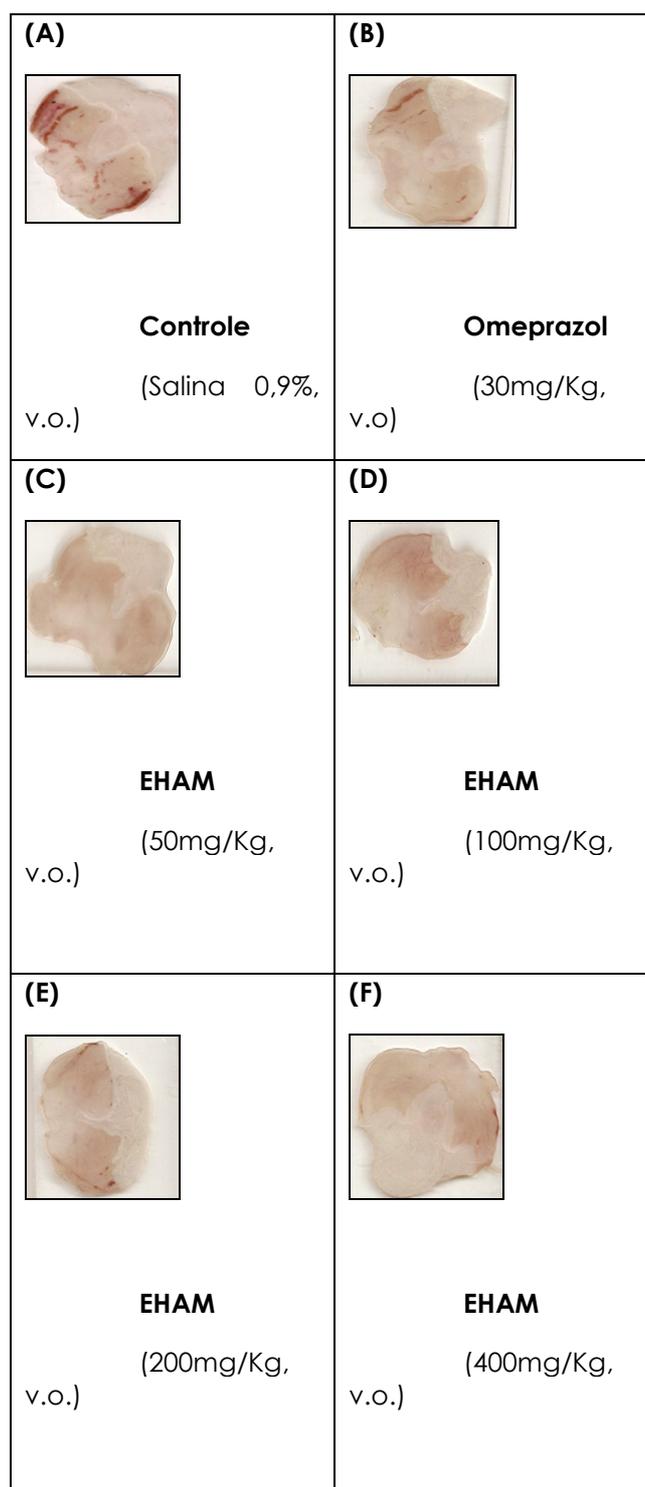


Figura 6. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

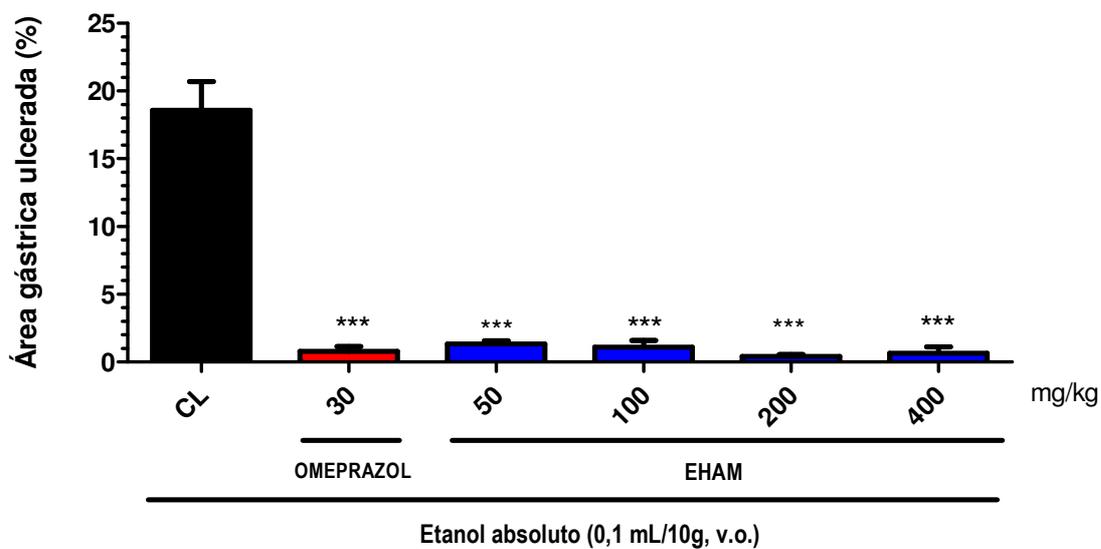


Figura 7. - Efeito da administração oral do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1 mL/10g, v.o.), o EHAM (50, 100, 200 e 400 mg/Kg, v.o.), ou o omeprazol (30mg/kg, v.o.). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 0,2 mL de etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 6 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $***p < 0,001$, significativo quando comparado ao grupo controle lesionado (CL) (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls)

6.4.2. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) via intraperitoneal sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto em camundongos

A administração de etanol_{abs} induziu a produção de lesões na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia, com índices de lesões, de úlceras e índice total de $26,60 \pm 3,43$ % (Figura 9; Tabela anexo II). Os animais foram pré-tratados com EHAM(100mg/Kg, v.o.), e EHAM(100mg/kg, i.p.) ambos os grupos de vias de administração apresentaram significativa ($p < 0,001$) redução no índice da área ulcerada.(Figura 8)

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol_{abs} foram menores (em tamanho e quantidade) no grupo pré-tratado com o EHAM na dose de 100mg/kg,v.o, demonstrou significativa ($p < 0,001$) redução de área ulcerada, podendo ser observado nos índices, de lesões em 95,90%, reduzindo o índice de úlceras em relação ao grupo controle. Já o grupo previamente tratado com o EHAM (100mg/kg,i.p), também comprovou a sua ação citoprotetora, com reduções da área lesionada, com um índice 76,84%, com valores de $p < 0,001$.

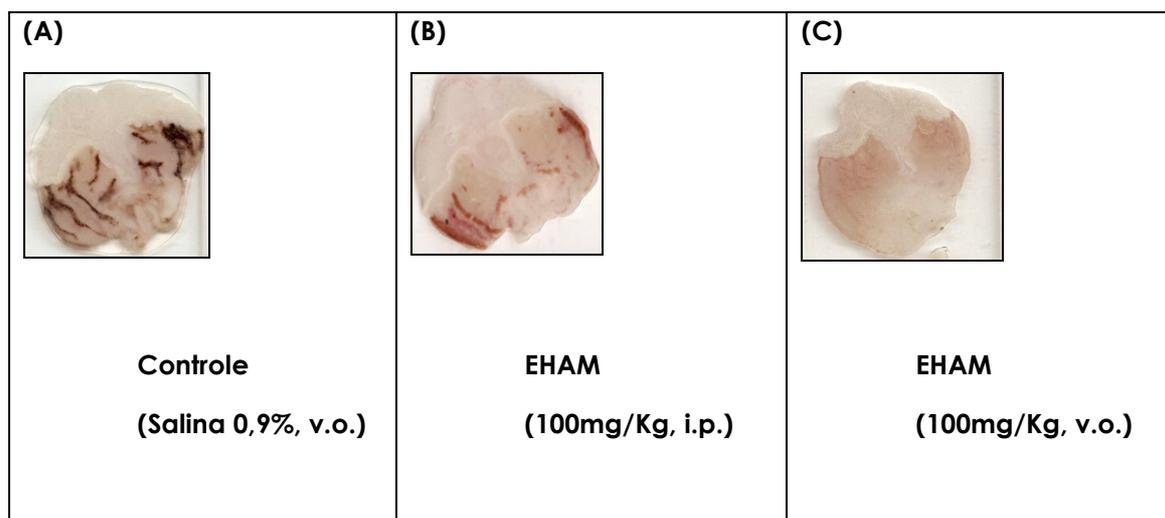


Figura 8. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B) e (C), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

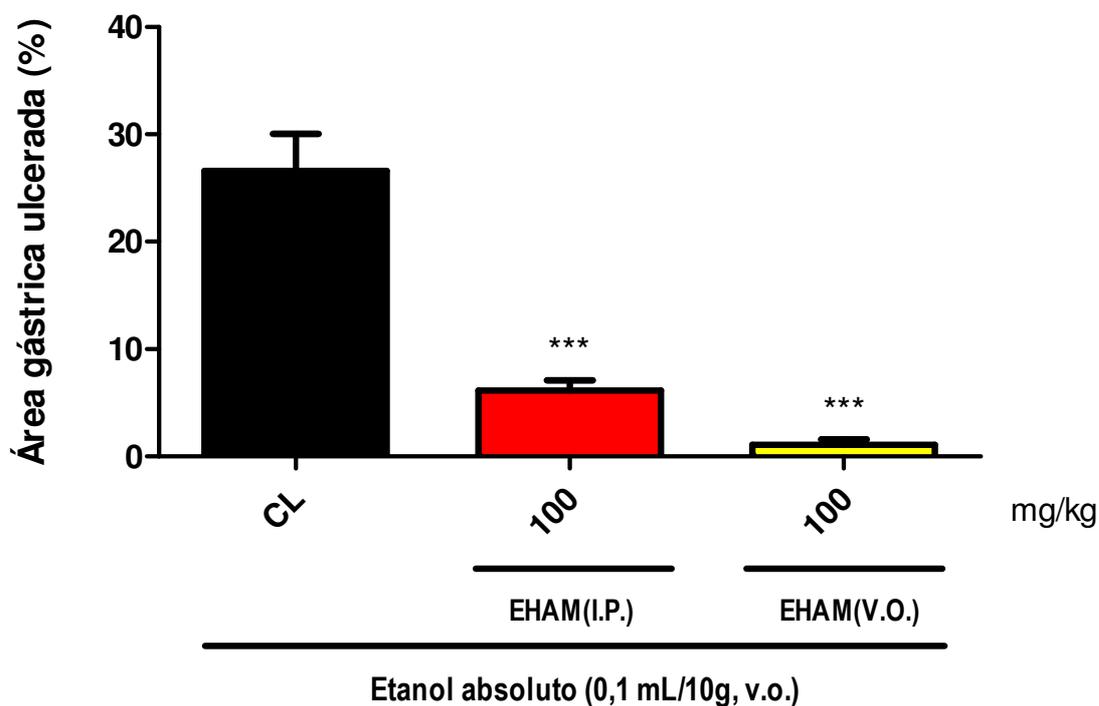


Figura 9. - Efeito da administração intraperitoneal do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1 mL/10g, i.p.), o EHAM (100 mg/Kg, i.p.) e EHAM (100 mg/Kg, v.o.). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 0,2 mL de etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 10 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $P > 0,05$ e $***P < 0,001$ vs CL (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

6.4.3. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol acidificado em camundongos.

A administração de solução de etanol a 70% e 0,3M de HCL induziu a produção de lesões na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia, com índices de lesões, de úlceras e índice total de $23,19 \pm 3,09$; (Tabela Anexo III).

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol a 70% foram menores (em tamanho e quantidade) nos grupos pré-tratados com o com o EHAM em doses de 50, 10, 200 e 400mg/kg, podendo ser observado pela redução do índice de lesões em 38,33 %, 72,05%, 81,06%, e 96,76% respectivamente (Figura 10) reduzindo o índice de úlceras no grupo pré-tratado com o EHAM.

Demonstramos assim, que o EHAM na dose de 400 mg/kg v.o, para tratamento de lesões gástricas induzidas pelo o etanol acidificado em camundongos, mostrou-se mais efetiva que a dose da droga padrão utilizada (omeprazol) , reduzindo o índice de úlceras em 97,79%, quando comparados com o grupo controle, Os animais que receberam omeprazol (30mg/Kg v.o.) também demonstraram redução significativa nas áreas gástricas lesionadas e significativo percentual de redução de úlceras, sendo este de 84,56%, respectivamente, com valores de $p < 0,001$ comparado ao controle. (Figura 11)

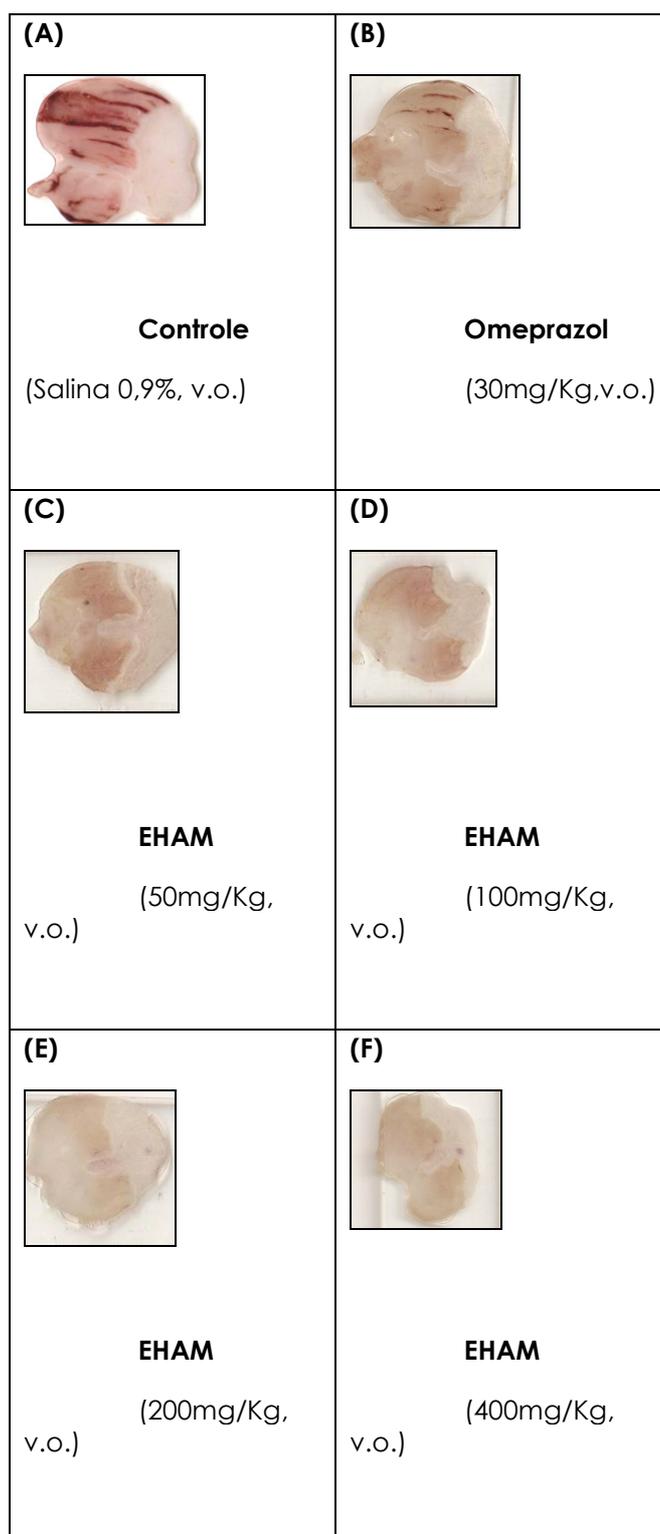


Figura 10. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

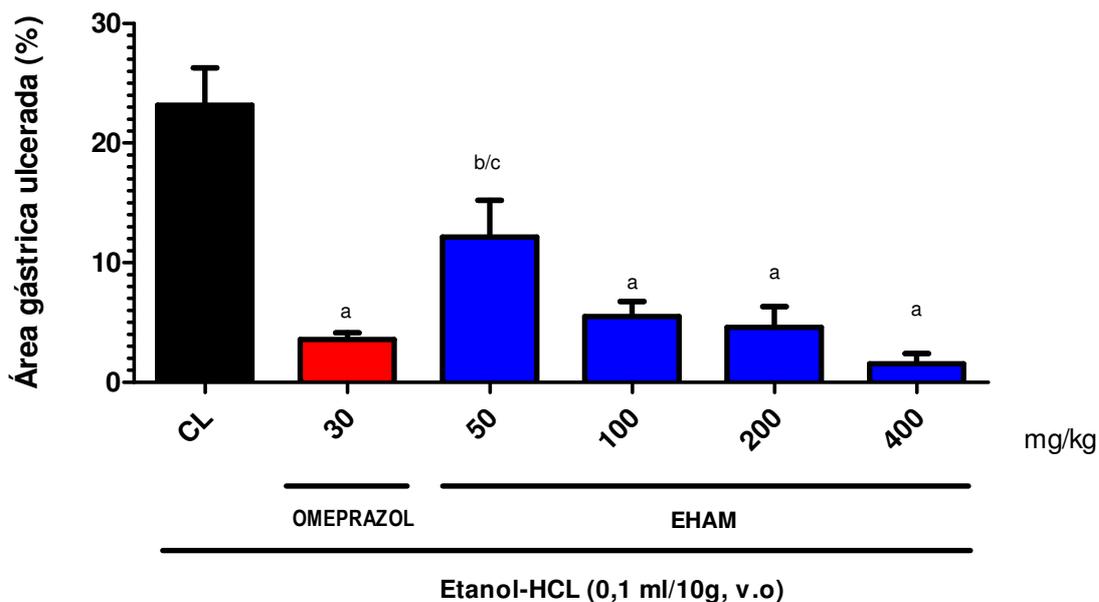


Figura 11 - Efeito do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1 mL/10g, v.o.), o EHAM (50, 100, 200, 400 mg/Kg, v.o.), ou o omeprazol (30mg/kg, v.o.). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 0,2 mL de uma solução 0,3 M de HCl em etanol 70 %. Cada grupo representa a média de 6 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs controle lesionado (CL), $^b p < 0,01$ vs CL e $^c p < 0,05$ vs omeprazol (30mg/kg, v.o.) (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

6.4.4. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por DAINES (indometacina) em camundongos.

A administração subcutânea de indometacina (10mg/Kg) produziu um índice de lesões gástricas de $12,61 \pm 3,27$. O pré-tratamento dos animais com as doses de 200 e 400 mg/kg do EHAM pela via oral, 1 hora antes da administração da indometacina, mostraram alterações dos índices determinados.

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração de indometacina (10mg/kg, s.c.), antiinflamatório não esteroideal (AINE) que atua inibindo as ações das enzimas ciclooxigenase (COX), mostraram resultados significantes (em tamanho e quantidade) nos grupos pré-tratados com o com o EHAM em doses de 200 e 400mg/Kg.

A dose de 200mg/Kg do EHAM, mostrou-se a dose mais eficaz, reduzindo a incidência de úlceras e o índice total em 94,13%, respectivamente (Figura 12; Tabela Anexo IV). A dose de 400 mg/kg do EHAM, mostrou-se também significativa, onde reduziu a incidência de úlceras e o índice total em 91,67%, respectivamente. Apresentando assim um índice significativo para a redução de úlceras. O omeprazol 30mg/kg v.o., controle positivo do teste, reduziu os índices de lesões, de úlceras e o total em 96,82%, quando comparado com o grupo controle (Figura 13.).

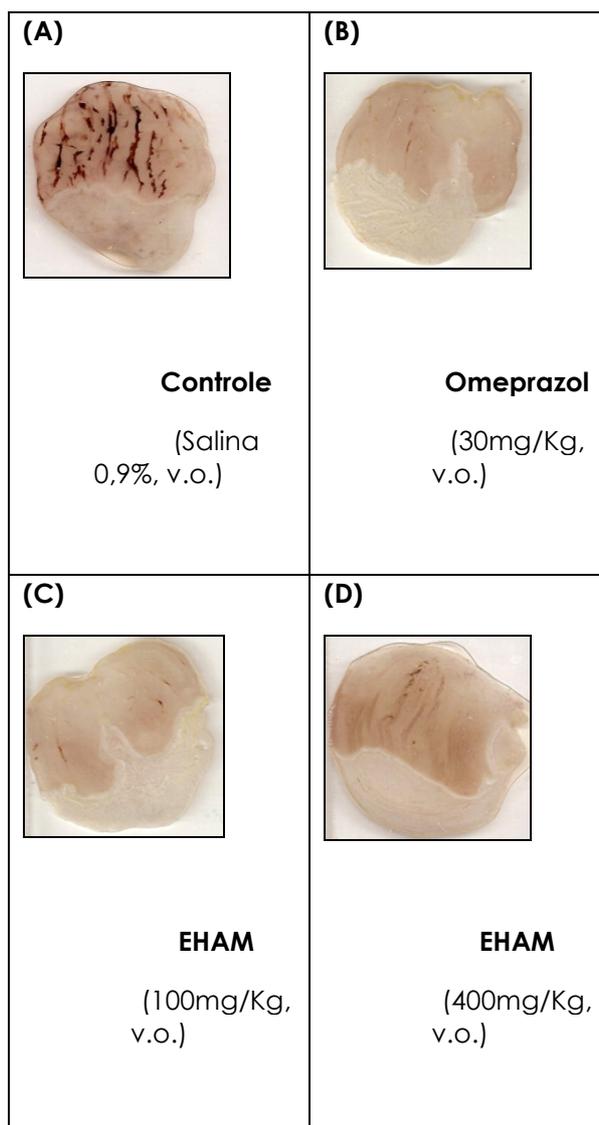


Figura 12. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por DAINES (indometacina). Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C) e (D), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

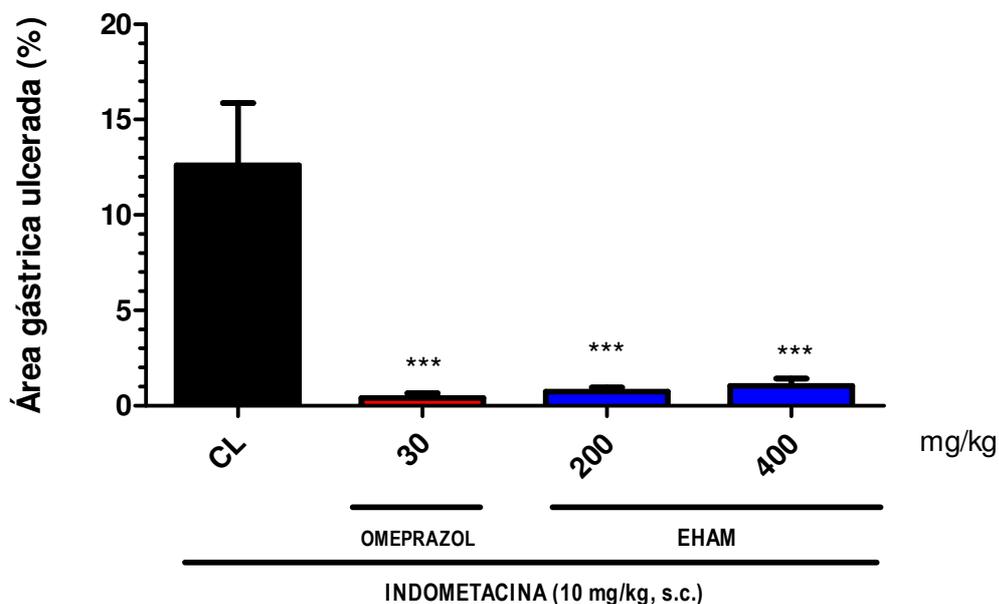


Figura 13 - Efeito do EHAM sobre as lesões gástricas induzidas por DAINE (Indometacina) em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1 mL/10g, v.o.), o EHAM (200, 400 mg/Kg, v.o.), ou o omeprazol (30mg/kg, v.o.). Uma hora após a administração da indometacina (10mg/Kg, s.c.) e após três horas, foram repetidos os tratamentos com o veículo, o EHAM e o omeprazol. Cada grupo representa a média de 6 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e *** $p < 0,001$, significativo quando comparado ao grupo controle lesionado (CL) (ANOVA e Teste de Student Newman Keuls).

6.4.5. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) e o papel do óxido nítrico (NO) na ação gastroprotetora em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

A administração do veículo em associação ao etanol_{abs} oral, produziu um índice de lesões gástricas de $20,52 \pm 2,29\%$. Os animais que receberam L-NAME (10mg/kg, ip) um inibidor da NOS – óxido nítrico sintetase, apresentaram um percentual de lesões de $28,73 \pm 3,83\%$, associado ao etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.). Já os animais que receberam L-Arginina (600mg/Kg, v.o.) um precursor para a síntese de óxido nítrico, em associação ao etanol_{abs} apresentaram um percentual de úlceras de 94,88% (Figura 14). Apresentaram um percentual de redução de lesões significantes (em tamanho e quantidade).

Um grupo foi tratado com o EHAM (200mg/kg,v.o.),

Nos grupos pré-tratados com o com o EHAM em doses de 200 mg/kg, mostrou-se uma redução de áreas lecionada (em tamanho e quantidade) de $0,41 \pm 0,14\%$ e 98,57%, respectivamente. (Figura 14; Tabela Anexo V). Apresentando assim um percentual de redução de lesões significantes .

Nos grupos pré-tratados com o EHAM (200mg/kg, v.o) + L-NAME na dose de (10mg/kg, i.p), mostrou-se uma redução de áreas lesionadas (em tamanho e quantidade) apresentando um índice de redução de 95,58%, respectivamente.

Nos grupos pré-tratados com o com o EHAM (200mg/kg, v.o) + L-ARGININA na dose de (600mg/kg, v.o), mostrou-se uma redução de áreas lesionadas (em tamanho e quantidade) apresentando um índice de redução de 88,54%, respectivamente. (Figura 15).

A dose de 200mg/kg do EHAM, mostrou-se a dose mais eficaz, reduzindo a incidência de úlceras e o índice total em 98,57%. Já o EHAM

associado às drogas L-NAME (10mg/kg, v.o) e L-ARGININA (600mg/kg, v.o) reduziu os índices de lesões de úlceras de maneira significativa, mais com um efeito parcialmente bloqueado, em 95,58% e 88,54%, respectivamente.

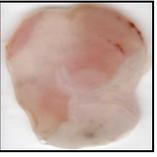
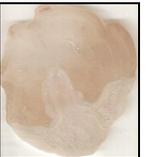
<p>(A)</p>  <p>Controle (Salina 0,9%, v.o.)</p>	<p>(B)</p>  <p>L-NAME (10mg/Kg, v.o.)</p>	<p>(C)</p>  <p>L-Arginina (600mg/Kg, v.o.),</p>
<p>(D)</p>  <p>EHAM (200mg/Kg, v.o.), + L-NAME (10mg/Kg, v.o.)</p>	<p>(E)</p>  <p>EHAM (200mg/Kg, v.o.) + L-Arginina (600mg/Kg, v.o.),</p>	<p>(F)</p>  <p>EHAM (200mg/Kg, v.o.)</p>

Figura 14. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de roedores em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

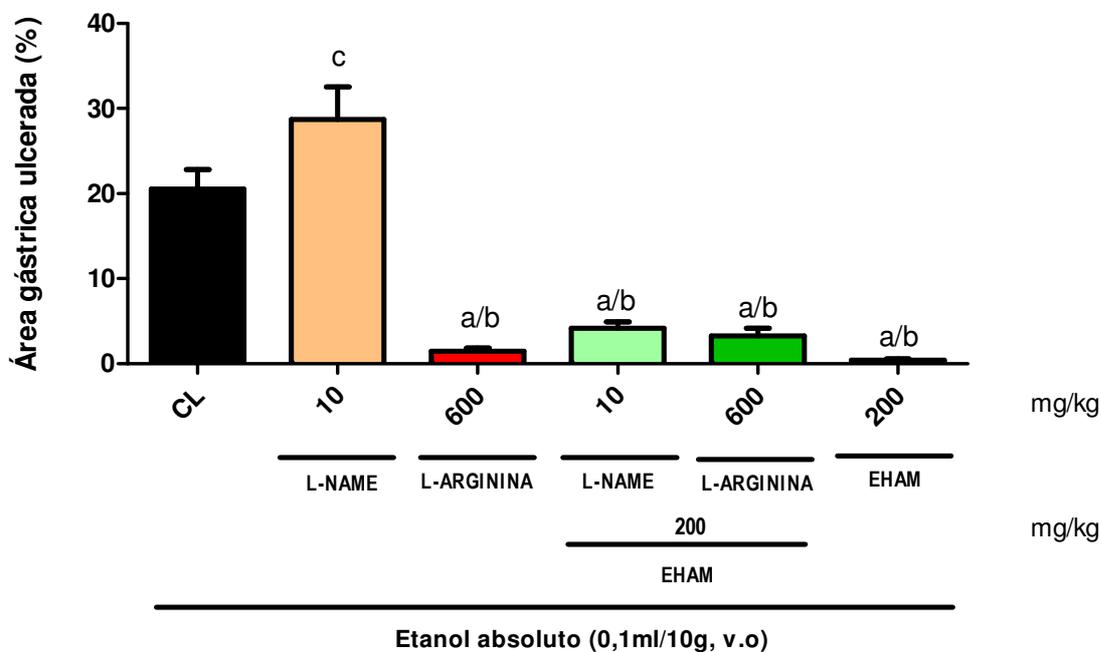


Figura 15. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Administrou-se tratamento com o EHAM (200mg/Kg, v.o.) ou veículo (solução salina, 0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, do L-NAME (10mg/kg, i.p.) ou L-Arginina (600mg/Kg, v.o.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM (200mg/Kg, v.o.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 7 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs CL, $^b p < 0,001$ vs L-NAME (10mg/Kg, v.o.) e $^c p < 0,01$ vs CL (ANOVA e teste de Student Newman-Keuls)

6.4.6. O papel das prostaglandinas no efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto em camundongos

A administração do veículo em associação ao etanol_{abs} oral, produziu um índice total de lesões gástricas de $18,57 \pm 2,12\%$. Os animais receberam Indometacina (10mg/kg, v.o.) um inibidor da síntese de prostaglandinas, associado ao etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) apresentaram um percentual de lesões de $12,33 \pm 1,88\%$. Os animais pré-tratados que receberam misoprostol (0,016mg/Kg, v.o.), um análogo sintético da prostaglandina, em associação ao etanol_{abs}, obtiveram redução de área lesionada (95,37%), antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal).

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração de etanol_{abs} oral (0,2ml/kg) $12,33 \pm 1,88\%$ (Figura 16; Tabela Anexo VI). Mostraram resultados, onde apresentaram um percentual de redução de lesões significantes (em tamanho e quantidade).

Nos grupos pré-tratados com o EHAM na dose de 200mg/kg, observou-se uma redução de áreas lesionadas (em tamanho e quantidade) de $0,41 \pm 0,14\%$ e 96,67%, respectivamente (Figura 17; Tabela Anexo VI).

Nos grupos pré-tratados com o com o EHAM (200mg/kg, v.o) + INDOMENTACINA na dose de (10mg/kg, v.o), observou-se uma redução de áreas lesionadas (em tamanho e quantidade) apresentando um índice de redução de $9,85 \pm 2,50\%$ e 20,11%, respectivamente. (Figura 17; Tabela Anexo VI).

Nos grupos pré-tratados com o EHAM (200mg/kg, v.o) + MISOPROSTOL na dose de (0,016,mg/kg, v.o), um análogo das prostaglandinas do tipo E1 (PGE 1), observou-se uma redução de áreas lecionada (em tamanho e quantidade) apresentando um índice de redução de $0,57 \pm 0,25\%$ e 95,37%, respectivamente . (Figura 17; Tabela Anexo VI).

A dose de 200mg/kg do EHAM, mostrou-se a dose mais eficaz, reduzindo a incidência de úlceras e o índice total em 98,57%.(Figura 17; Tabela Anexo VI). Já o EHAM associado às drogas Indometacina (10mg/kg, v.o) e Misoprostol (0,016mg/kg, v.o) reduziu os índices de lesões de úlceras em 95,37%, quando associado a indometacina o EHAM , teve o seu efeito bastante reduzido, uma vez que a sua ação junto com o Misoprostol potencializou ainda mais a ação do extrato.

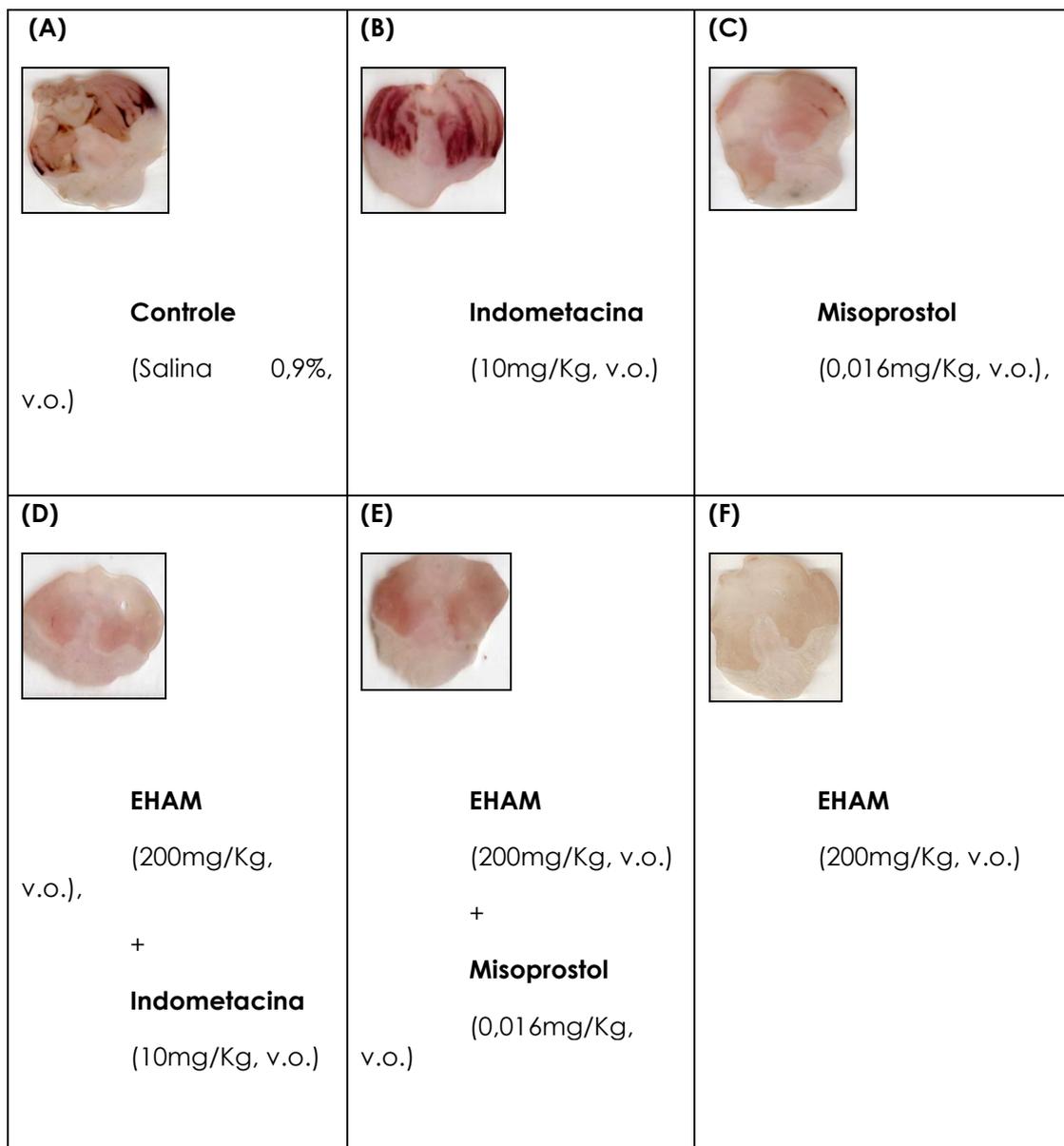


Figura 16. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C), (D), (E) e (F), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

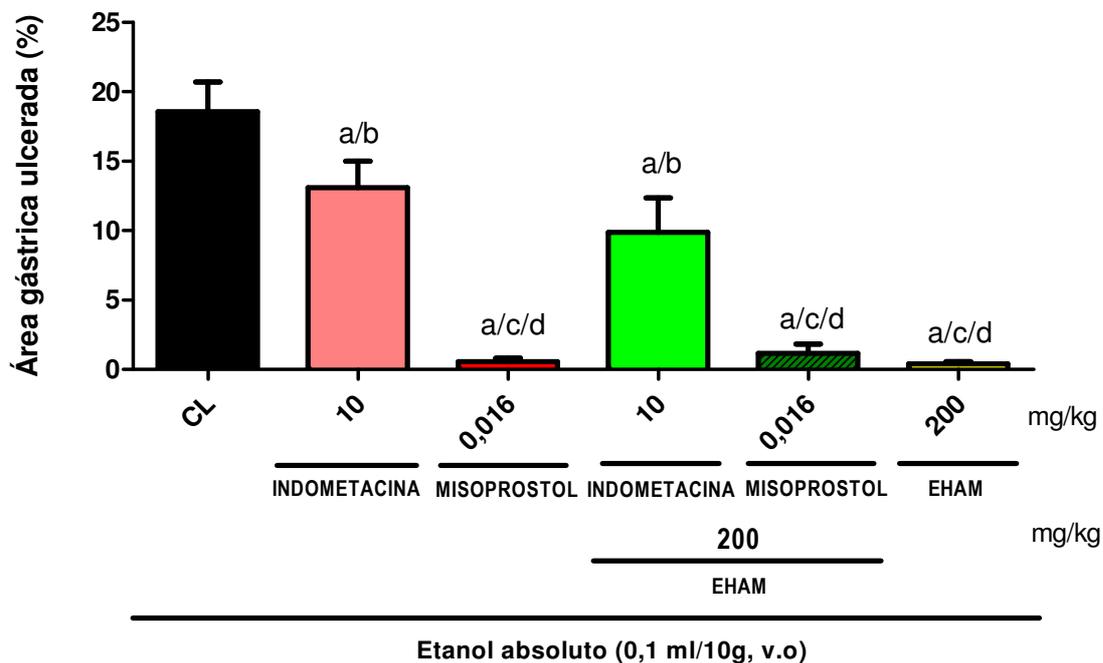


Figura 17. Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Administrou-se tratamento com o EHAM (200mg/Kg, v.o.) ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da indometacina (10mg/Kg, v.o.), ou Misoprostol (0,016mg/Kg, v.o), 2 horas e 1 hora, respectivamente, antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM (200mg/Kg, v.o.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 7 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs controle lesionado (CL), $^b p < 0,01$ vs CL, $^c p < 0,01$ vs indometacina, $^d p < 0,001$ vs indometacina na combinação com o EHAM (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

6.4.7. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto (o papel dos receptores noradrenérgicos α_2).

A administração de etanol_{abs} induziu a produção de lesões na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia, com índices de lesões, de úlceras e índice total de $18,57 \pm 2,12\%$ (tabela Anexo VII.). Os animais que receberam ioimbina (10mg/Kg, i.p.), um agente antagonista dos receptores noradrenérgicos α_2 , associado ao etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) apresentaram extensa área ulcerada ($26,52 \pm 3,75\%$).

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol_{abs} foram reduzidas (em tamanho e quantidade) no grupo pré-tratado com o EHAM na dose de 200mg/kg, ($p < 0,001$), (redução do índice de lesões em 98,45%), (Figura 18; Tabela Anexo VII).

Foi demonstrado assim que o EHAM, associado à ioimbina (10mg/kg, i.p), para tratamento de lesões gástricas induzidas pelo o etanol_{abs} em camundongos, bloqueou parte da sua ação citoprotetora. A úlcera causada por etanol_{abs} foi significativamente aumentada pela ação da ioimbina e o pré-tratamento com o EHAM diminuiu significativamente a úlcera causada pela associação do etanol+ioimbina.

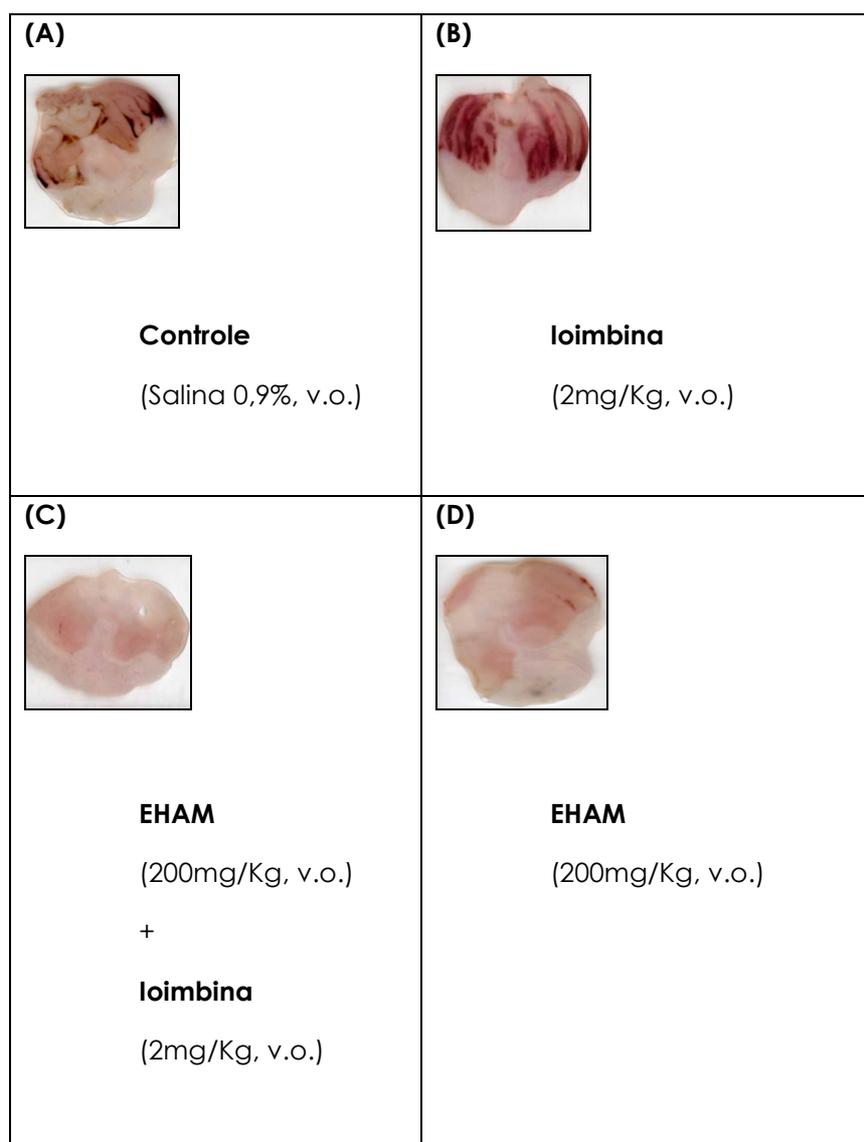


Figura 18. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C) e (D), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

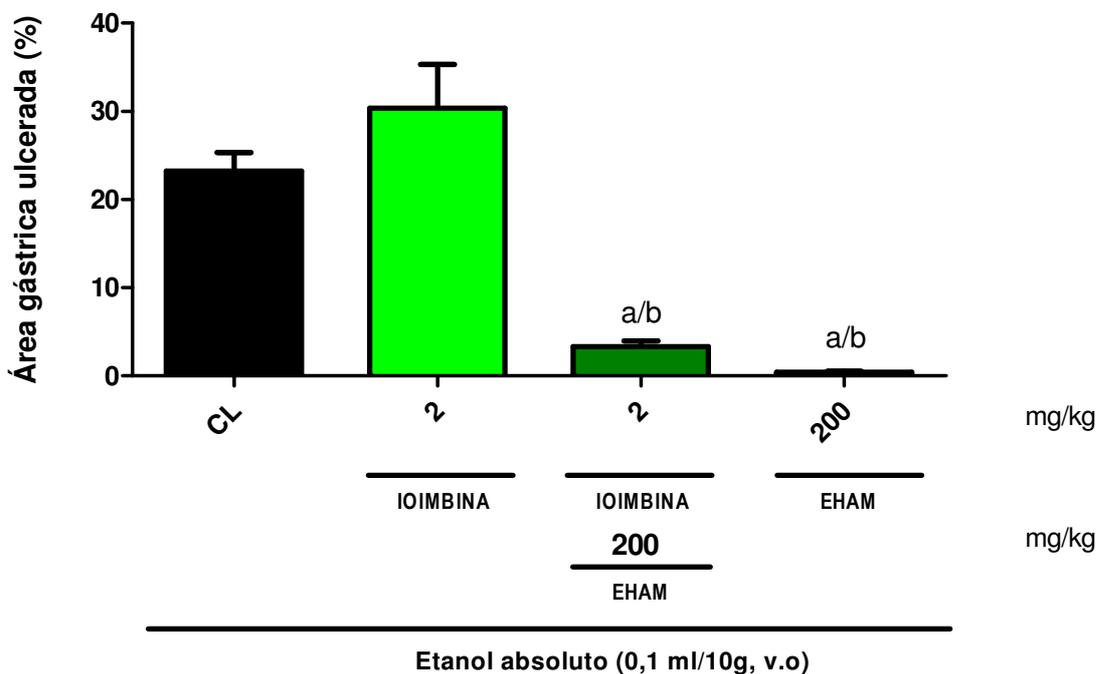


Figura 19: Papel dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Administrou-se tratamento com o EHAM (200mg/Kg, v.o.) ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da ioimbina (2mg/Kg, i.p.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM (200mg/Kg, v.o.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 7 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs controle lesionado (CL), $^b p < 0,001$ vs ioimbina (2mg/kg, i.p.) (ANOVA e teste de Student Newman-Keuls)

6.4.8. O papel dos Canais de K⁺ dependentes de ATP. No efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol absoluto em camundongos,

A administração de etanol_{abs} induziu lesões na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia, com índices de lesões total de $17,17 \pm 2,44\%$ (Tabela Anexo VIII). Os animais que receberam glibenclamida (5mg/Kg, i.p.), um bloqueador dos canais de K⁺ dependentes de ATP, associado ao etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) apresentaram extensa área ulcerada ($13,30 \pm 2,25\%$).

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol_{abs} foram reduzidas (em tamanho e quantidade) no grupo pré-tratado com o EHAM (200mg/kg), v.o, (redução do índice de lesões em 96,91%), respectivamente (Figura 20) reduzindo o índice de úlceras no grupo pré-tratado com o EHAM em relação ao grupo controle.

Mostrando assim, que o EHAM associado a Glibenclamida (5mg/kg i.p), bloqueou parte da sua ação citoprotetora, o EHAM demonstrou a sua ação eficaz para redução de lesões estomacais em camundongos (redução nas áreas gástricas lesionadas de 89,09%). (Figura 21).

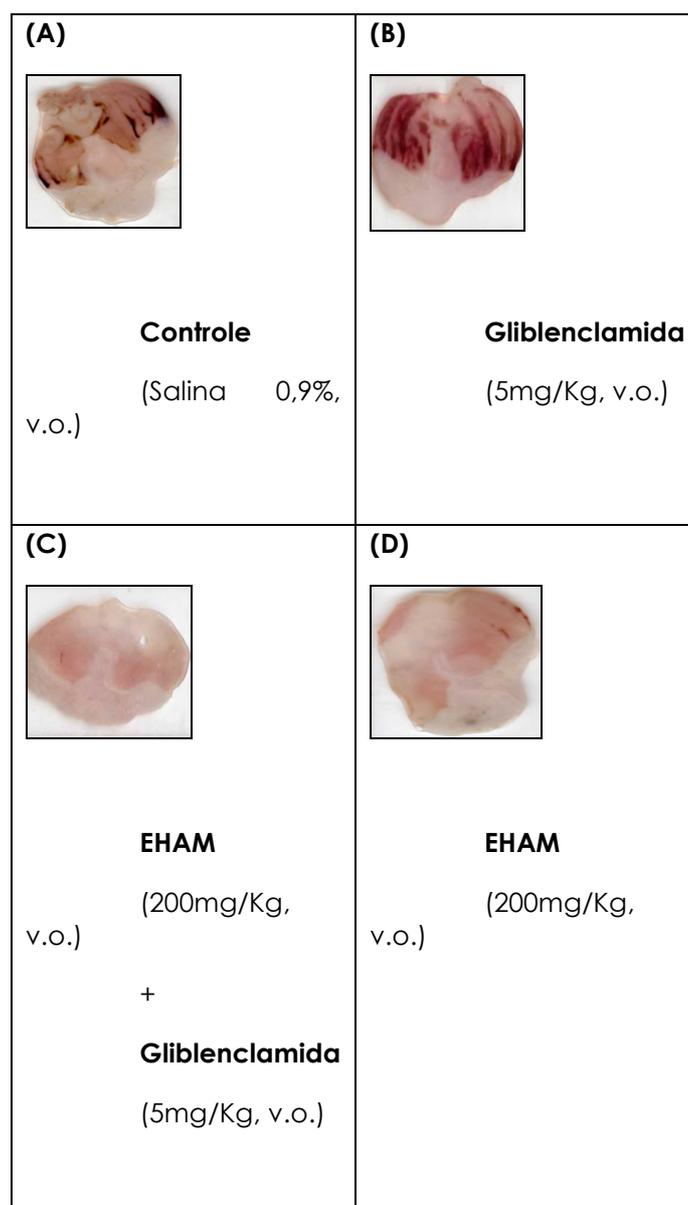


Figura 20. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C) e (D), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

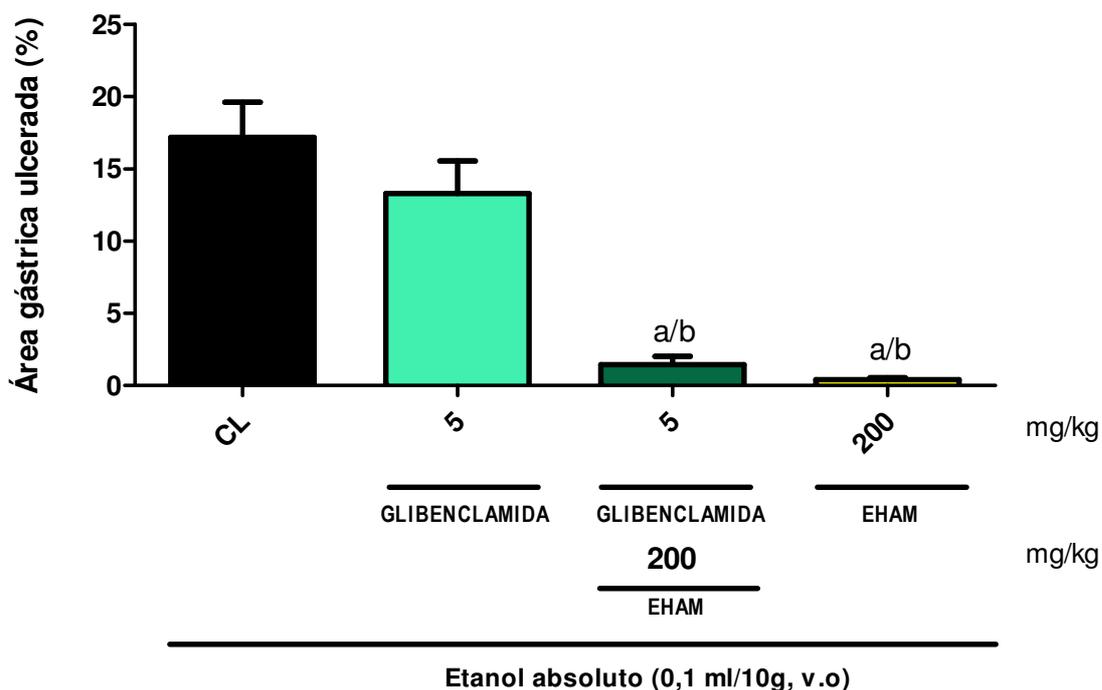


Figura 21. Papel dos Canais de K⁺ dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do EHAM em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Administrou-se tratamento com o EHAM (200mg/Kg, v.o.) ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da glibenclamida (5mg/Kg, i.p.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM (200mg/Kg, v.o.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 7 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $^a p < 0,001$ vs controle lesionada (CL), $^b p < 0,001$ vs glibenclamida (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

6.4.9. Envolvimento do efeito gastroprotetor do EHAM em associação à capsaicina em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

A administração de etanol_{abs} induziu a produção de lesões na mucosa gástrica, acompanhada pela perda de pregas, aparecimento de edema e hemorragia, com índices de lesões de úlceras de $23,80 \pm 3,80\%$ (Tabela Anexo IX). Os animais que receberam capsaicina (4mg/Kg, v.o.), um agente protetor gástrico, associado ao etanol_{abs} (0,2 mL/animal, v.o.) apresentaram significativa ($p < 0,001$) e percentual de redução de úlcera de 93,27%.

As ulcerações na mucosa gástrica induzidas pela administração do etanol_{abs} foram menores (em tamanho e quantidade) no grupo pré-tratado com o EHAM na dose de 200mg/kg, v.o, ($0,41 \pm 0,14\%$ e 97,79%), respectivamente (Figura 22; Tabela Anexo IX).

Foi demonstrado assim, que o EHAM, associado à Capsaicina (4mg/kg v.o), para tratamento de lesões gástricas induzidas pelo o etanol_{abs} em camundongos, manteve sua ação eficaz, demonstrando redução significativa nas áreas gástricas lesionadas e significativo percentual de redução de úlceras, (90,63%), com valores de $p < 0,001$. (Figura 23)

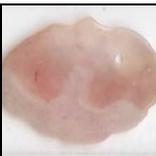
<p>(A)</p>  <p>Controle (Salina 0,9%, v.o.)</p>	<p>(B)</p>  <p>Capsaicina (0,2mg/Kg, v.o.)</p>	<p>(C)</p>  <p>Capsaicina (4mg/Kg, v.o.)</p>
<p>(D)</p>  <p>EHAM (200mg/Kg, v.o.) + Capsaicina (0,2mg/Kg, v.o.)</p>	<p>(E)</p>  <p>EHAM (200mg/Kg, v.o.) + Capsaicina (4mg/Kg, v.o.)</p>	<p>(F)</p>  <p>EHAM (200mg/Kg, v.o.)</p>

Figura 22. Aspectos macroscópicos da mucosa estomacal de camundongos em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura, (A), (B), (C) e (D), respectivamente, trata-se das drogas, doses e as vias de administração utilizadas.

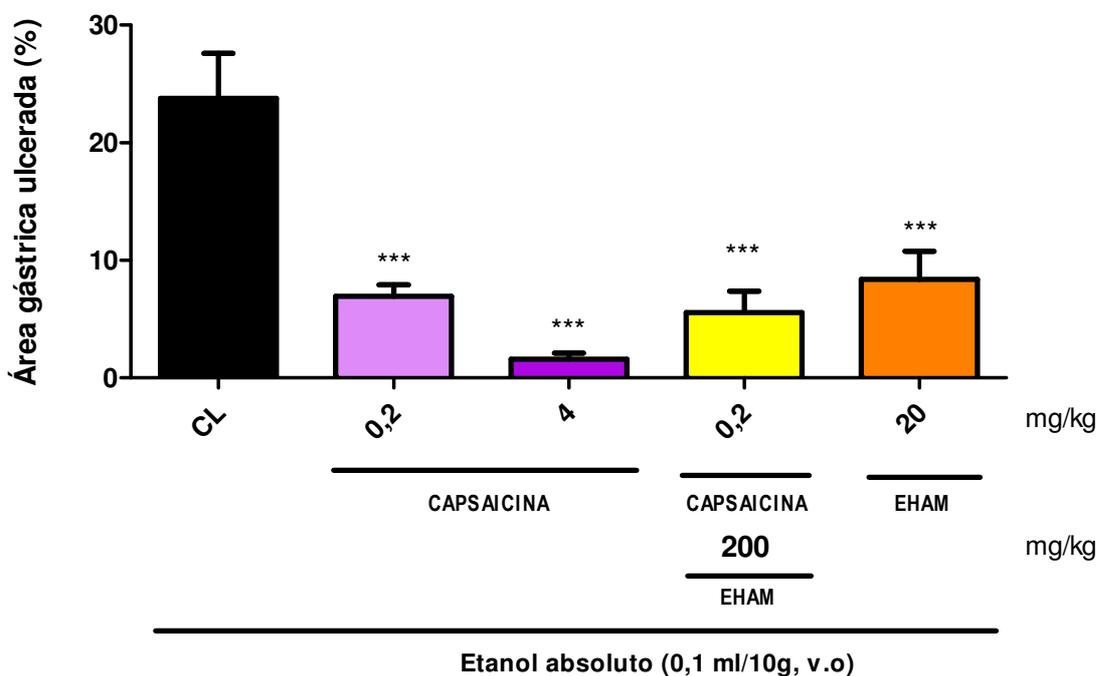


Figura 23. Envolvimento do efeito gastroprotetor do EHAM em associação à capsaicina em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos. Administrou-se tratamento com o EHAM (20mg/Kg, v.o.) ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da capsaicina (4mg/Kg, v.o.; 0,2 mg/kg, v.o.), 1 hora antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM (20mg/Kg, v.o.), 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Cada grupo representa a média de 7 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $p > 0,05$ e $***p < 0,001$ vs controle lesionado (CL) (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

6.5 Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona muricata* (EHAM) sobre o trânsito intestinal em camundongos.

Nos animais controle, o carvão ativado percorreu $82,77 \pm 4,29$ % do intestino delgado dos animais. A administração do EHAM (200mg/kg, v.o.), apresentou um índice $70,14$ % \pm $6,48$ %, que não mostra significância na alteração do trânsito intestinal dos animais na dose testada com relação ao controle (Figura 24; Tabela Anexo X).

A atropina (0,01g/Kg, v.o.), um antagonista muscarínico, redutor da motilidade intestinal, diminuiu a distância percorrida para $63,21 \pm 2,05$ %, quando comparado ao grupo controle veículo (solução salina a 0,9%, v.o.), $p < 0,05$ (Figura 24; Tabela Anexo X).

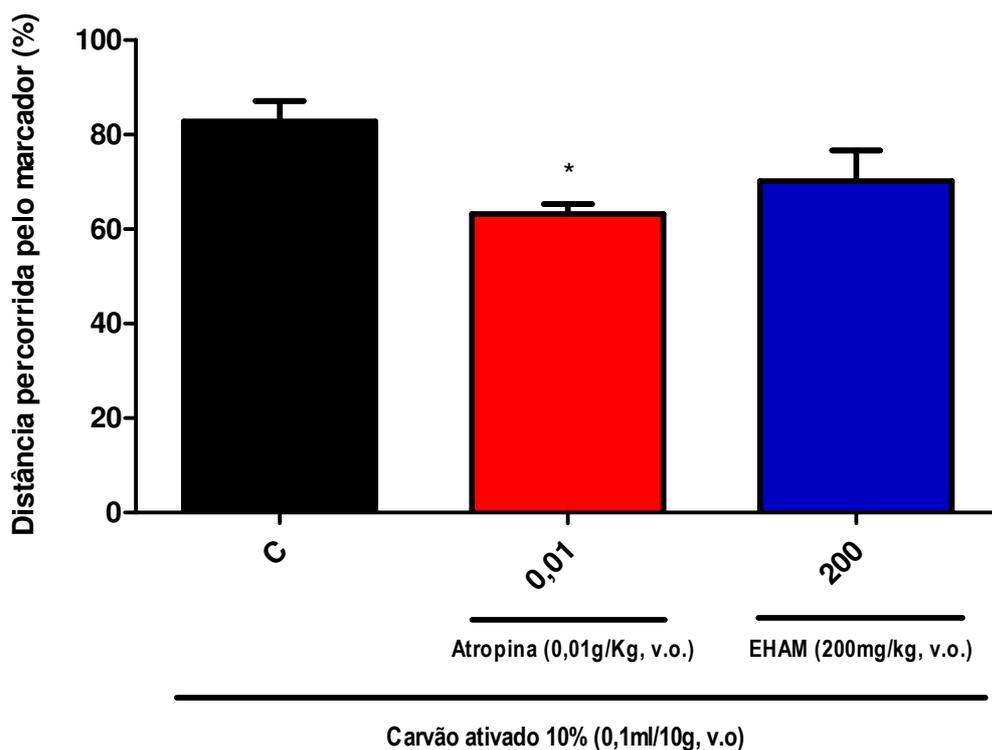


Figura 24. Efeito do EHAM sobre a motilidade intestinal em camundongos. Os animais foram tratados com veículo (solução salina 0,9%, 0,1 mL/10g, v.o.), o EHAM (200 mg/Kg, v.o.) e atropina (0,01g/Kg, v.o.). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam carvão ativado 10% (0,1ml/10g, v.o.). Cada grupo representa a média de 10 animais. Na análise estatística, foi considerado não significativo $P > 0,05$ e $*P < 0,05$ vs C (controle salina) (ANOVA e Teste de Student Newman-Keuls).

7. DISCUSSÃO

Os estudos de um novo medicamento, incluindo os fitoterápicos, costumam ser divididos em etapas seqüenciais. A primeira etapa do estudo é a seleção do material a ser testado. É essencial garantir a uniformidade química e a estabilidade do produto a ser utilizado durante todo o ensaio. Nesse sentido, os estudos envolvendo as plantas medicinais oferecem dificuldades já na fase preliminar. Primeiramente, porque é comum a confusão botânica entre espécies afins; em segundo lugar, porque exemplares de uma mesma espécie, colhidos em épocas diferentes, ou de locais diferentes, não têm necessariamente a mesma atividade biológica e; em terceiro lugar, porque é difícil controlar quimicamente um extrato vegetal em virtude do grande número de substâncias normalmente presentes (LAPA *et al.*, 2000).

A investigação etnofarmacológica da *Annona muricata* L.(Graviola) na Bioregião da Chapada do Araripe, na zona rural dos Municípios de Crato-CE, Exu-PE, Santana do Cariri-CE, mostrou que os maiores níveis de fidelidade indicam o uso medicinal da planta para o tratamento de doenças do trato respiratório, seguidos do uso para inflamação em geral, câncer e dores, por outro lado a revisão bibliográfica demonstrou que esta espécie vegetal é usada popularmente, também como anti-reumática, antiinflamatória, antiespasmódica, antitussígena, adstringente, também para o tratamento de neoplasias e doenças renais (JUNQUEIRA *et al.*,1999)

Dados da literatura confirmam o uso da indicação das folhas da *Annona muricata* L. (Graviola). Muitos compostos bioativos e fitoquímicos são encontrados na graviola, e vários estudos têm mostrado ação hipotensiva, antiespasmódica, vasodilatadora, relaxante do músculo estomacal e atividade citotóxica contra células cancerígenas a partir dos extratos das folhas e troncos. Evidências científicas revelam o uso da graviola para fins nutricionais e terapêuticos, podendo ser utilizada em sua totalidade, as folhas, as flores e os brotos, as pesquisas indicam que a graviola possui um novo grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas anonáceas que atuam na depleção dos níveis de ATP ao inibir o complexo I na cadeia de transporte de

elétrons nas mitocôndrias, e inibindo a NADH oxidase de membranas plasmáticas principalmente de células tumorais (ALALI *et al.*, 1999) .

Pesquisas revelam que a graviola possui uma grande concentração de compostos, entre eles os compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonóides que têm seus usos terapêuticos como agentes antiinflamatórios, antifúngicos, antioxidantes e ainda, propriedades cicatrizantes (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Os taninos teriam papel importante papel antiinflamatório e por isso o uso no tratamento de ferimentos. Os flavonóides participariam da ativação de enzimas nos processos antiinflamatórios (MIDDLETON; KADASWAMI; THEOHARIDES, 2008; OKUDA, 2005).

A graviola pode ser utilizada sob a forma *in natura*, sob a forma de chás preparados como cataplasmas que são sobrepostos diretamente nas afecções cutâneas e também em cápsulas que contêm os princípios nutricionais desta espécie. (JUNQUEIRA *et al.*, 1999).

Os taninos promovem a cicatrização de feridas por ação antioxidante, atuando como seqüestradores de radicais de oxigênio, favorecendo o processo de fibroplastia, a reorganização do leito capilar, a proliferação de queratinócitos e a diferenciação celular (FERNANDEZ *et al.*, 2000; DETERS *et al.*, 2001).

Investigações etnofarmacológicas de espécies da Biorregião do Araripe, no Nordeste Brasileiro, representam a possibilidade de subsídios para a realização de estudos promissores por pesquisadores regionais, sobre as propriedades bioativas de plantas largamente empregadas pelas comunidades locais como recursos terapêuticos.

A frequência relativa de citação – RFC da espécie *Annona muricata* L., foi de 0,56 para o Município do Crato-CE, 0,32 em Santana do Cariri-CE e 0,12 em Exu-PE, com RFC total de 1,00. Evidencia-se, portanto que o maior RFC determinado foi para o município de Crato-CE, localidade esta que deteve o maior número de informantes no estudo.

O conhecimento etnofarmacológico sobre a espécie *Annona muricata* L. é relevante e promissor para subsidiar pesquisas com vistas a explorar o

potencial biológico desta planta, como modo de melhorar o acesso a medicamentos por grupos populacionais que possuem dificuldade na disponibilidade de serviços de saúde de maior custo.

Os resultados desta pesquisa etnofarmacológica, relatam o uso da espécie para uma variedade de afecções, dentre as quais, destacam-se as doenças pulmonares, processos inflamatórios, infecciosos, dor e câncer. Quanto às partes da planta utilizadas, a pesquisa pode revelar a predominância da utilização das folhas, empregadas em sua maioria sob a forma de decocto em água por via oral. Em se tratando da duração do tratamento e da frequência das doses utilizadas, verificou-se que a terapêutica empregada geralmente foi até a remissão dos sintomas com a dose de 1 a 3 vezes/dia. Os informantes relataram ainda não haver restrições de uso para a espécie.

Este estudo ressalta a importância do conhecimento empírico das comunidades da Biorregião do Araripe, bem como a necessidade da preservação cultural e biológica deste patrimônio local, com vistas a contribuir para o uso sustentável desta biodiversidade.

Uma das maiores riquezas do Ceará está na biodiversidade da Floresta Nacional do Araripe, por outro lado encontra-se uma população nativa utilizando-se de plantas medicinais e preparações caseiras, onde estas preparações assumem importância fundamental no tratamento das patologias, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (FLONA) (MATOS, 1989, LIMA; LIMA; TEIXEIRA, 1984). Neste contexto os produtos derivados de plantas são uma das mais promissoras fontes de novas drogas e têm mostrado resultados satisfatórios no tratamento das úlceras gástricas (ALKOFAHI et al., 1999; ZAYACHKIVSKA et al., 2004, ZAYACHKIVSKA et al., 2005).

Na prospecção fitoquímica feita com o extrato bruto hidroalcoólico de *Annona muricata* L.(EHAM), identificou-se a presença das seguintes classes de metabólitos: taninos pirogálicos, flavonas, flavononóis, flavononas e alcalóides, corroborando com a literatura que demonstra a identificação destas identidades químicas, (ANDRADE et al., 2003; LEBOUF et al., 1982).

Levando em consideração a importância de se conhecer os efeitos tóxicos do extrato investigado e considerando, a inexistência de estudos anteriores a partir do extrato bruto (EHAM) das folhas da *Annona muricata* L. em torno da toxicidade da espécie vegetal ora avaliada, observamos que o EHAM possui uma baixa toxicidade. A $DL_{50\%}$ do EHAM por via oral foi determinada como sendo maior ou igual a 5000mg/Kg, sendo a mesma para a via intraperitoneal.. Nesta faixa de $DL_{50\%}$, segundo HODGEN E STERNER, 1949, um substância é considerada de toxicidade baixa.

A atividade antibacteriana dos flavonóides e polifenóis foi relacionada aos patógenos humanos, devido a sua capacidade em proteger plantas que os contém, contra a invasão de microorganismos (HARBONE & WILLIAMS, 2000). Desta forma realizou-se a análise microbiológica, que não revelou atividade significativa quando empregada a técnica de microdiluição. No entanto, o EHAM na concentração de 128µl/ml, em combinação com os antibióticos amicacina, garamicina, canamicina e neomicina, apresentou atividade importante na potencialização do efeito antibacteriano desses fármacos.

O EHAM demonstrou atividade antimicrobiana não significativa contra as linhagens bacterianas testadas do ponto de vista clínico, com valor de CIM ≥ 1024 .

Para a espécie *Annona muricata* L., a investigação da atividade moduladora do extrato obtido das folhas representa um ensaio pioneiro e promissor para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. Estudos sobre o sinergismo entre produtos naturais e fármacos antibacterianos vêm sendo realizados com outras espécies vegetais, a exemplo da *Mentha arvensis* (Coutinho *et al*, 2009d), do *Hyptis martusii* Benth (Coutinho *et al*, 2009c), da *Momordica charantia* L. (Coutinho *et al*, 2009a) e da *Turnera ulmifolia* L. (Coutinho *et al*, 2009b).

O uso de plantas medicinais para fins e tratamento de cura de doenças é empregado pela humanidade a partir da disseminação do conhecimento em geração em geração, sendo motivo de inquietação de pesquisadores que buscam confirmação científica para as práticas populares. A avaliação

do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde são comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a serem aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Os fármacos disponíveis no comércio para o tratamento de doenças gastrintestinais, incluindo antiácidos, inibidores da bomba de prótons, anticolinérgicos e antagonistas histaminérgicos, produzem inúmeros efeitos adversos, como ginecomastia, alterações hematopoiéticas, nefrite intestinal aguda (RA & TOBE, 2004), trombocitopenia (ZLABEK & ANDERSON, 2002), reações anafiláticas (GONZALEZ et al., 2002), nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (FISHER & LE COUTEUR, 2001).

Os produtos naturais podem contribuir para a terapêutica dos distúrbios gástricos, através de tratamentos mais acessíveis, atendendo uma grande parcela da população brasileira (70-80%) que não tem poder aquisitivo suficiente para participar do mercado consumidor (FERREIRA et al., 1998). Este fato, aliado a grande biodiversidade de nossa região, estimula a pesquisa por novas drogas gastroprotetoras a partir de produtos naturais. Dessa forma, os estudos nortearam, também, da ação gastroprotetora do EHAM, em modelos animais de úlcera gástrica aguda, bem como na investigação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Os protocolos envolvendo animais exercem um papel importante na busca de novas drogas com propriedades gastroprotetoras. Considerando que a etiologia da úlcera é multifatorial, as lesões na mucosa gástrica podem ser induzidas por diferentes modelos experimentais, utilizando diversos mecanismos (SAMONINA et al., 2004). Alguns dos modelos agudos mais utilizados para avaliação de substâncias antiulcerogênicas em animais são os de lesão gástrica induzida por etanol absoluto e por indometacina (PANDIAN et al., 2002). No presente trabalho, além de utilizar esses modelos, foi, também avaliado o efeito do EHAM em modelo de ulceração gástrica induzida por etanol acidificado.

As úlceras pépticas afetam um número considerável de pessoas no mundo. As lesões na mucosa gástrica ocorrem quando existe um desequilíbrio entre os fatores agressores (como a secreção ácida gástrica) e os fatores protetores da mucosa gástrica (como as sulfidrilas endógenas, as prostaglandinas e o óxido nítrico) (GLAVIN e SZABO, 1992; WALLACE e GRANGER, 1996). As drogas disponíveis atualmente para o tratamento das úlceras pépticas desempenham seu efeito por reduzir fatores agressivos da mucosa gástrica (como os antiácidos e inibidores da secreção ácida gástrica) ou por estimular fatores defensivos (como o análogo de prostaglandina).

De acordo com vários autores a úlcera induzida por etanol é um dos testes mais comuns aplicados para avaliação de atividade anti-úlcera ou citoprotetora. O dano gástrico induzido por etanol pode ser devido a estase do fluxo sangüíneo gástrico, que contribui para o desenvolvimento de aspectos de hemorragia, erosão e necrose da injúria tecidual. Esta ação é direta no epitélio gástrico, podendo causar perturbação de mastócitos e liberação de mediadores vasoativos tais como a histamina; este mediador age na microvasculatura, desencadeando uma série de eventos que conduzem a possibilidade de danos ao tecido submucoso.

O EHAM nas doses de; 50, 100, 200 e 400mg/Kg, via oral, foi capaz de prevenir as lesões gástricas induzidas pela administração de etanol absoluto (0,1ml/10mg, via oral). As doses inibiram em 92,78 e 96,49%, assim como o omeprazol (30mg/Kg, via oral), um conhecido inibidor da bomba de prótons, que inibiu 95,79%. Resultados estes que manteve a eficácia citoprotetora do EHAM (nas mesmas doses supra citadas via oral) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida pela administração de etanol acidificado.

Fármacos que agem inibindo o metabolismo do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases (COX), como indometacina e aspirina, são conhecidas por induzir dano gástrico por múltiplos mecanismos, incluindo ação irritante local, aumento da secreção ácida gástrica, redução do fluxo sangüíneo e redução da biossíntese de prostaglandinas por inibição da via das ciclooxigenases (constitutivas) do metabolismo do ácido araquidônico. Estas prostaglandinas fortalecem fatores defensivos da mucosa gástrica, tais como a estimulação da síntese de muco promovendo a manutenção da

mucosa gástrica; por isso, o modelo de úlcera induzida por indometacina é um teste bastante utilizado para estudo de drogas antiulcerogênicas (LANZA et al, 1995; WAGNER et al, 1995; GONZALEZ et al, 2001 e WHITTLE et al., 1985).

A ação local na mucosa gástrica pode ser descartada já que a indometacina foi administrada por via subcutânea, evidenciando assim que os danos causados foram em consequência da inibição da COX.

Tendo em vista a capacidade do EHAM em inibir os danos gástricos causados pelos DAINEs (drogas antiinflamatórias não-esteroidais), efetuamos um modelo clássico de indução da lesão gástrica por indometacina (10mg/Kg, via subcutânea). O EHAM (via oral), nas doses de 200mg/Kg ($0,74 \pm 0,21\%$ e $94,13\%$) e 400mg/Kg ($1,05 \pm 0,38\%$ e $91,67\%$), foi capaz de prevenir o aparecimento de lesões gástricas em animais submetidos ao tratamento com esta droga, evidenciando resultados significantes com $p < 0,001$ em todas as doses quando comparado ao controle lesionado.

O óxido nítrico é um fator relevante na prevenção e reparo de injúrias no trato gastro intestinal (TGI), participando no controle da produção de muco e secreção de bicarbonato, na regulação do fluxo sanguíneo capilar da parede gastrintestinal, além de atuar como agente citoprotetor, antiinflamatório e como complemento aos efeitos protetores das prostaglandinas no estômago (WALLACE & GRANJIER, 1996; MUSCARA & WALLACE, 1999). O NO reduz efetivamente a injúria na mucosa gástrica provocada por agentes químicos, além de facilitar a cicatrização do tecido lesado e a inibição da sua síntese aumenta a susceptibilidade do estômago à injúria provocada por agentes químicos como o etanol (MASUDA et al., 1995; KAWANO & TSUJI, 2000). A presença de 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 citotóxicos (WALLACE & MILLER et al., 2000). O mesmo tem um papel chave na perfusão e regulação vascular por promover a vasodilatação pela sinalização da célula muscular lisa (SHAH et al., 2004). O principal fluxo sanguíneo para o TGI chega através da veia mesentérica, e a regulação do fluxo até as arteríolas mesentéricas é um passo importante para a regulação do fluxo sanguíneo intestinal geral e local (SHAH et al., 2002).

O excesso na produção de NO associado com estados inflamatórios é caracterizado pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do NO na permeabilidade da mucosa e proteção. (SHAH et al., 2004) Estudos clínicos têm demonstrado que a co-administração de agentes doadores de NO com AINE podem proteger contra a indução da úlcera pelos AINE, e a combinação aos AINE 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).

Na presente pesquisa, do papel do óxido nítrico no efeito gastroprotetor do EHAM no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos, revelam que, os animais que receberam L-NAME (um inibidor não específico das enzimas NO sintetases), na dose de 10mg/Kg, *i.p.*, apresentaram uma extensa área gástrica ulcerada ($28,73 \pm 3,83\%$), após a administração do etanol absoluto, semelhante ao grupo controle veículo lesionado ($20,52 \pm 2,29\%$). O EHAM (200mg/Kg, *v.o.*) inibiu o aparecimento das lesões gástricas em cerca de 98,57% e esse efeito gastroprotetor foi revertido com o pré-tratamento com L-NAME (10mg/Kg, *i.p.*), onde o extrato nesta situação apresentou percentual de redução de úlcera de 95,58%. De forma semelhante, observamos que a L-arginina (um substrato da NO sintetase), na dose de 600mg/Kg, *v.o.*, reduziu o percentual de área gástrica ulcerada ($1,47 \pm 0,38\%$), em comparação com o grupo controle veículo lesionado. Na associação do EHAM com a L-arginina, foi observado pequeno percentual de área gástrica ulcerada ($3,29 \pm 0,88\%$).

A mucosa gástrica, ação protetora das prostaglandinas, é mediada pelo aumento na produção de muco e secreção de bicarbonato, modulação da secreção do ácido gástrico, inibição da liberação de mediadores inflamatórios por mastócitos e na manutenção do fluxo sanguíneo durante a exposição a agentes irritantes. Onde a prostaglandina E2 possui uma ação gastroprotetora contra a lesão provocada pelo etanol pelo aumento da guanosina-3',5'-monofosfato cíclica (BATISTA et al., 2004, SAKAI et al., 1995)

Na análise de participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHAM, o misoprostol, um análogo das prostaglandinas do tipo E1 e a indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, foram utilizados para a investigação do provável envolvimento desta via. O misoprostol inibe a secreção de ácido gástrico, aumenta o fluxo sanguíneo da mucosa e a secreção de muco e bicarbonato, por outro lado a indometacina é um agente ulcerogênico onde as úlceras induzidas por este DAINÉ localizam-se predominantemente na porção glandular do estômago (RANG *et al.*, 2004 e NWAFOR *et al.*, 2007).

As prostaglandinas têm efeito na motilidade, secreção e citoproteção do trato gastrointestinal. As PGE₂ podem influenciar de duas maneiras a secreção ácida gástrica. Em baixas concentrações inibem a secreção ácida através da interação com receptores EP₃ e em concentrações maiores estimulam a secreção ácida através da interação com receptores EP₄. Ambos os receptores estão presentes nas células parietais e nas células principais da mucosa gástrica (DING *et al.*, 1997).

Segundo Takeuchi *et al.* (2001) muitas prostaglandinas (PG) incluindo PGE₂ e PGI₂ previnem a formação da úlcera por um mecanismo adicional a inibição da secreção gástrica, chamado de citoproteção gástrica. A secreção de muco e bicarbonato, a vasodilatação e a rápida regeneração epitelial são alguns dos componentes de defesa da mucosa que são regulados pelas PG (WALLACE & GRANGER, 1996). A inibição da produção de PG endógena, como a que ocorre pela ingestão de AINE, leva a formação de úlceras no estômago e intestino. A identificação de duas isoformas de PG sintase (ciclooxigenase, COX) no começo dos anos 90, direcionou as atenções para a possibilidade de que a supressão da isoforma COX-2 poderia produzir muitos dos efeitos antiinflamatórios dos AINE, mas poupando a síntese de PG gástrica e, assim, causando menos irritação ao estômago (FLOWER, 2003).

Algumas observações sugerem que a COX-2 contribui significativamente para a defesa da mucosa gástrica. Por exemplo, a indução de lesão gástrica em ratos induzido por AINE, requer a inibição de ambas as isoformas, a inibição seletiva de somente uma isoforma de COX não causa significativo dano gástrico (WALLACE *et al.*, 2000). Além disso, dados de

estudos com animais e humanos tem mostrado que a combinação de aspirina com inibidores seletivos de COX-2 resulta em aumento do dano gástrico maior do que os danos observados quando as duas drogas são administradas sozinhas. (FIORUCCI, et al., 2002).

Na pesquisa, da avaliação do papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHAM no modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos, revelam que, os animais que receberam indometacina na dose de 10mg/Kg, v.o.) apresentaram uma grande área gástrica ulcerada ($12,33 \pm 1,88\%$), após a administração do etanol absoluto, próximo ao grupo controle veículo lesionado ($18,57 \pm 2,12\%$). O EHAM (200mg/Kg, v.o.) conseguiu inibir o aparecimento das lesões gástricas em cerca de 95,37% e esse efeito gastroprotetor foi revertido com o pré-tratamento com indometacina (10mg/Kg, i.p.), onde o extrato nesta situação apresentou percentual de redução de úlcera de 20,11% (não significativo). De forma semelhante, observamos que o misoprostol na dose de 0,016mg/Kg, v.o., reduziu o percentual de área gástrica ulcerada ($0,57 \pm 0,25\%$), em comparação com o grupo controle veículo lesionado. Na associação do EHAM com a misoprostol, foi observado pequeno percentual de área gástrica ulcerada ($1,15 \pm 0,66\%$). Estes resultados sugerem que o efeito gastroprotetor do EHAM esteja possivelmente envolvido com o papel das prostaglandinas, pois a inibição das prostaglandinas reverteu seu efeito gastroprotetor.

Os receptores noradrenérgicos α_2 pré-sinápticos estão envolvidos na regulação da secreção do ácido gástrico e são efetivos na proteção contra agentes químicos, como DAINÉ's e etanol, sendo que os seus efeitos anti-secretórios podem ser mediados por esses receptores centrais e periféricos, por outro lado a modulação da atividade dos receptores α_2 periféricos, localizados nos gânglios parassimpáticos intramural, diminui a descarga vagal da acetilcolina, a qual reduz a secreção e motilidade gástrica e aumenta o fluxo sanguíneo, um representante destes agentes é a ioimbina, um alcalóide extraído da casca de uma árvore africana que age pelo bloqueio α_2 pré-sináptico utilizado para reduzir ou melhorar problemas de ereção (YELKEN *et al.*, 1999, GYIRES *et al.*, 2000, HOFFMAN, 2007).

No nosso estudo, a administração de ioimbina (10mg/Kg, i.p.), não foi capaz de reverter o efeito gastroprotetor do EHAM. Estes resultados indicando que o EHAM não atua via modulação da atividade dos receptores α_2 periféricos para a promoção do seu efeito gastroprotetor

As sulfoniluréias exercem a sua principal ação sobre as células, estimulando a secreção de insulina, reduzindo, assim, o nível plasmático de glicose. Existem receptores de alta afinidade das sulfoniluréias nos canais de K_{ATP} na membrana plasmática das células e a ligação de várias sulfoniluréias acompanha sua potência na estimulação da liberação de insulina. O fármaco reduz a permeabilidade das células ao K^+ ao bloquear os canais de K_{ATP} , causa despolarização, entrada de Ca^{2+} e secreção de insulina. A participação dos canais de K_{ATP} nas úlceras induzidas por etanol, poderia estar aclopada a um sistema de abertura dos canais de K^+ sensíveis ao ATP, com conseqüente relaxamento endotelial na vasculatura gástrica e aumento do fluxo sanguíneo na região afetada, impedindo assim a formação de úlceras. (KATZUNG, 2008, CAMPOS, 2008)

Nossa pesquisa evidenciou que o EHAM (200mg/Kg, v.o.) quando associado à glibenclamida (5mg/Kg, i.p.), manteve o seu efeito protetor gástrico de forma significativa ($p < 0,001$) com percentual de área ulcerada ($1,45 \pm 0,57\%$) e percentual de redução de úlceras de 89,09%. Indicando que possivelmente os princípios ativos do extrato não possuem mecanismo de ação gastroprotetora pela via da estimulação dos canais de potássio ATP-dependentes.

A capsaicina é extraída da pimenta vermelha (*Pipiper*), esta substancia age sobre os neurônios sensoriais estimulando os receptores de membrana, predominantemente receptores vanilóides, liberando neuropeptídeos. Em pequenas doses, a capsaicina funciona como um potente gastroprotetor, estimulando a microcirculação gástrica, porém em altas doses, ela destrói seletivamente as terminações neuronais das fibras C resultando em uma inativação dos nervos sensoriais e perda dos reflexos nos quais estes nervos estão envolvidos (SZOLCSANYI & BAETHO, 2001; EVANGELHISTA, 2006). Evidências mostram que, no estômago, os nervos sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina estão envolvidos no mecanismo de defesa local contra a formação de úlceras gástricas e que a administração oral de capsaicina exerce proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol (PARK et al., 2000).

Com base no exposto acima, procuramos avaliar a possível ação do EHAM como potencializador do efeito gastroprotetor da capsaicina. Verificamos que quando o EHAM (200mg/Kg, v.o.) teve administração associada com a capsaicina (4mg/Kg, v.o.), manteve seu efeito gastroprotetor de forma significativa ($p < 0,001$) com percentual de área ulcerada ($2,23 \pm 0,96\%$), e que este resultado não foi significativo quando comparado ao percentual de redução de área ulcerada ($1,60 \pm 0,49\%$) do grupo onde foi administrado somente a capsaicina (4mg/Kg, v.o.). Assim, observamos que a associação de EHAM à capsaicina não modifica de forma significativa o potencial gastroprotetor da droga.

Outra via em que o EHAM poderia estar atuando para promover a proteção da mucosa gástrica seria através do aumento da motilidade gastrointestinal, assim, o trânsito intestinal aumentado promoveria uma aceleração do esvaziamento gástrico diminuído o efeito agressor do ácido no estômago e duodeno. A via colinérgica que inerva a camada de músculo circular do TGI, atuando nos receptores muscarínicos M1 e M3, é a principal responsável pela motilidade gastrointestinal (HANSEN, 2003).

Na pesquisa, a não participação do sistema colinérgico no mecanismo de ação do EHAM foi confirmada pela ausência de efeito do extrato sobre a motilidade gastrointestinal, observada no modelo de determinação do trânsito intestinal realizado em camundongos. Evidenciando assim, que o EHAM não alterou de forma significativa o trânsito intestinal dos camundongos quando em comparação com o grupo veículo (carvão ativado 10%) e o grupo que recebeu atropina (0,01g/Kg, v.o.) droga bloqueadora da ação muscarínica da acetilcolina.

Na tentativa de determinar pela primeira vez uma possível ação gastroprotetora das folhas de *Annona muricata* L, foi possível observar que esta planta oferece gastroproteção contra lesão gástrica aguda induzida por etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina em camundongos. Indicando uma ação associada envolvido com o papel das prostaglandinas. As folhas de *Annona muricata* L. possuem diversos compostos que possivelmente age em sinergismo para a ativação de fatores defensores e na redução de fatores agressores da mucosa gástrica, o que torna este extrato promissor para o desenvolvimento de novas terapias no combate a gastropatias associadas à DAINES e doença ulcerosa péptica.

No presente trabalho, podemos sugerir que as folhas da *Annona muricata* L. apresentam um potencial fitoterápico para o tratamento de algumas dispepsias, como úlceras e gastrites da mucosa estomacal, pois,

enquanto, as drogas disponíveis para o tratamento das úlceras pépticas desempenham seu efeito apenas por reduzir fatores agressores do Trato Gastro Intestinal ou por estimular fatores citoprotetores (como o análogo de prostaglandina), folhas da *Annona muricata* L. possuem diferentes compostos que agem em conjunto na ativação de fatores protetores e na redução de fatores agressores da mucosa gástrica.

8. CONCLUSÕES

O conjunto de nossos resultados, permite sugerir que o EHAM possui ação de efeito ciproteror e fornece evidências que a *Annona muricata* L., é uma espécie promissora para o desenvolvimento de novas terapias no combate a gastropatias associadas á DAINE's e úlceras induzidas pelo etanol.

- As folhas da espécie *Annona muricata* L. são utilizadas pelos integrantes das comunidades tradicionais da Biorregião do Araripe para fins medicinais em doenças do trato respiratório, seguidos do uso para inflamação em geral, câncer e dores.
- A toxicidade relativa do extrato hidroálcoolico da *Annona muricata* L é baixa após administração, tanto por via oral como intraperitoneal.
- O extrato hidroálcoolico da *Annona muricata* L não apresentou atividade antimicrobiana significativa pela técnica de microdiluição, com valores de CIM \geq 1024, no entanto, o mesmo apresentou importante ação moduladora frente às drogas antimicrobianas utilizadas no controle;
- O extrato hidroálcoolico da *Annona muricata* L, por via oral, demonstrou importante atividade gastroprotetora contra lesões gástricas induzidas por etanol absoluto, assim como contra as induzidas por etanol acidificado e também contra lesões gástricas induzidas por DAINE's (indometacina), todos com intervalo de confiança de 99,99%.
- O estudo dos possíveis mecanismos de ação gastroprotetora do extrato aquoso da *Annona muricata* L. revelou que este tem sua atividade gastroprotetora revertida na presença de indometacina, associado ao etanol absoluto, sugerindo que a atuação deste extrato esta envolvido no papel protetor das prostaglandinas.
- O extrato hidroálcoolico da *Annona muricata* L. não alterou a motilidade gastrintestinal dos camundongos, demonstrando não apresentar atividade sobre o sistema colinérgico a nível de receptores muscarínicos.

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.

AHAMMADSAHIB, K.I.HOLLINGWORTH, MR., MCGOVREN, J.P., MCLAUGHLIN, J.L. Mode of action of bulltacin. A potent antitumor and pesticidal. Annonaceous acetogenin. **Life Sci**, 53, 113, 1993.

ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J. Nat. Prod.** 62 (3):504-540, 1999.

AL-HARBI M.M.; QURESHI S.; RAZA M.; AHMED M.M.; AFZAL M.; SHAH A.H. **Gastric Antiulcer and Cytoprotective Effect of *Commiphora molmol* in Rats.** Journal of Ethnopharmacology, v. 55, p.141-150, 1997.

ALICAN, I.; KUBES, P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. **The American Journal of Physiology**. v.270, p.225-237, 1996

ALVES, R.E.; FILGUEIRAS, H.A.C.; MOSCA, J.L. Colheita e pós-colheita de Anonáceas. In: SÃO JOSÉ, A.R.; SOUZA, I.V.B.; MORAIS, O.M.M.; REBOUÇAS, T.N.H. **Anonáceas - Produção e mercado (Pinha, graviola, atemóia e cherimólia).** Vitória da Conquista: DFZ/UESB, p.240-256, 1997.

ANDRADE, N. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L. & SILVA, M. S. Terpenoids of the Annonaceae: Distribution na compilation of ¹³C NMR data. **Recent Res. Devel. Phytochem.**, v. 7, p.1-85, 2003.

ANGELIS, R.C. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Ed. Atheneu, 295p, 2001.

ARAÚJO FILHO, G.C. de; ANDRADE, O.M.S.; CASTRO, F.de A.; SÁ, F.T. **Instruções Técnicas para o cultivo da Gravioleira.** Instruções Técnicas – Embrapa Agroindústria Tropical, nº02, p.1-10, dez/ 1998.

ARAÚJO, J.F.; ARAÚJO, J.F.; ALVES A.A.C. **Instruções técnicas para o cultivo da pinha (Annona squamosa L.)** Salvador. EBDA, . 44f, 1999.

ARNASON, J.T.; MATA, R.; ROMEO, J, T. Annonaceous acetogenins. *Phytochemistry of medical plants*, 29, 251, 1995.

BARBOSA, Zenaíde, SOARES, Ismail e CRISOSTOMO, Lindbergue Araújo. **Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de gravioleira.** Rev. Bras. Frutic., , vol.25, no.3, p.519-522. ISSN 0100-2945, 2003.

BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.; PIETRO, M.L.; TOMA, W.; CALVO, T.R.; VILEGAS, W.; BRITO, B.A.R.S. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus asthrotrichus* Silveira. **Biol. Pharm. Bull**, v.27(3): p.328-332, 2004.

BAZZANO, Félix Carlos Ocariz. Aspectos Éticos da Pesquisa Científica, p. 149-180. In: SILVA, José Vitor da (Org.) et al. **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa.** 1. ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BERRY, P. **Croton Research Network. Madison**, University of Wisconsin Board of Regents. 2006. Disponível em: <http://www.botany.wisc.edu/croton>. Acesso em: março de 2009.

BLUMENTAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal medicine – Expanded Comission e Monographs**. Austin: American Botanical Council, 2000.

BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVÉ, A. & LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Medica**. v. 57, p.434-436, 1991.

BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVÉ, A. & LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Medica**. v. 57, p.434-436, 1991. BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-91, 2000.

BRAGA SOBRINHO, R.; OLIVEIRA, M.A.S.; WARUMBY, J.; MOURA, J.I.L. Pragas da Gravioleira. In:BRAGA SOBRINHO, R.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F. das C.O. **Pragas de Fruteiras Tropicais de Importância Agroindustrial**. Brasília: Embrapa-SPI; Fortaleza: Embrapa-CNPAT, p.131-141, 1998.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Escola Superior de Agricultura de Mossoró. 3ª Ed. Fortaleza, 1976.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova-SBQ**. v. 17, p.405; 1994.

BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, p. 714–18, 1991.

BROGLIO-MICHELETTI, Sônia Maria Forti e BERTI-FILHO, Evôneo. **(Annona Parasitóides de Cerconota anonella (Sepp., 1830) (Lep.: Oecophoridae) em gravioleira muricata L.)**. Sci. agric., jul./set. 2000, vol.57, no.3, p.565-566. ISSN 0103-9016.

BROUILLARD, R., CHEMINANT, A. Flavonoids and plant color, in Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties (Cody V, Middleton E and HARBORNE JB eds) p. 93-106, **Alan R. Liss, Inc.**, New York, 1988.

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 sensory nerve pathways. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11(41): p. 6450-6058, 2005.

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

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

CAMPOS D.A.; LIMA A.F.; RIBEIRO E.R.; SILVEIRA E.R.; PESSOA O.D.; RAO V.S.; SANTOS F.A. **Gastroprotective Effect of a Flavone From *Lonchocarpus araripensis***

Benth (Leguminosae) and the Possible Mechanism. Journal of Pharmacy of Pharmacology. v. 60(3): p.391-397. 2008.

CARDOSO, T.A.O. **Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios.** Biol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, p. 64-67:3-17, 1998 – 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, 21(1): p. 99-105, 1998.

CHOLBI, M. R., PAYA, M., ALCARAZ, M. J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄ induced microsomal lipid-peroxidation. **Experimentia** v. 47, p. 195-199, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.v.6. 1984.

COSTA, M. P. et al. Uma revisão das atividades biológicas da *trans*-desidrocrotolina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 17(2): 275-286, Abr./Jun. 2007.

COUTINHO, H.D.M., CORDEIRO, L.N. and BRINGEL, K.P. **Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte – Ceará.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde. 09, 127-138, 2005.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Review*, v. 55, p.396-407, 1997.

DETERS, A. *et al.* **High molecular compounds (polysaccharides and proantocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin.** *Phytochemistry*. 2001, **58**:949-958.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

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

EASTWOOD, G. L. Is Smoking Still Important in the Pathogenesis of Peptic Ulcer Disease?. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v.25, Suppl.1:S1-S7, 1997

EVANGELISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. **Curr Pharm Des**, v.12: p.2977-2984, 2006.

FALK, A. J.; SMOLENSKI, S. J.; BAUER, L. & BELL, C. L. Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 11, p. 1838-1842, 1975.

FERNANDEZ, O. *et al.* **Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the of open surgical wounds.** *Fitoterapia*, **73**:564-568, 2000.

FERREIRA, S.H. (org.) **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FISHER, A.A.; LE COUTEUR, D.G. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H₂ receptor antagonists. **Drug Safety**, v.24: p.39-57, 2001.

FLEMSTRÖM, G. & ISENBERG, J. I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection. **News Physiol. Sci.**, v. 16, p. 23-28, 2001.

FONTANA, J.D., Almeida, E., GUIMARÃES, M., SHWARTSMAN, G., LANCAS, F. Screening of acetogenins-producing plants in Brazilian flora of the bioactive compounds and subproducts. **Biochem. Biotechnol.**, 45, 295, (1994).

GALATI, E. M.; MONDELLO, M. R.; GIUFFRIDA, D.; et al. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4903-4908, 2003.

GIL, A.C. **Métodos e técnicas de Pesquisa Social**. 5ª Ed.: Atlas S.A., São Paulo, 2006. (<http://www.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u13823.shtml>)

GLEYE, C.; AKENDENGUE, B.; LAURENS, A. & HOCQUEMILLER, R. Coronin from roots of *Annona muricata*, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis. **Planta Medica**. v. 67, p.570-572, 2001.

GLEYE, C; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L. & CAVÉ, A. Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 44, p.1541-1545, 1997.

GOEL, R. K.; GAMBHIR, S. S.; DASGUPTA, G. Mechanism of anti-ulcerogenic effect of ametrnoflavone. **Indian Journal of Medical Research**, v. 88, p. 192-196, 1988.

GOEL, R.K.; BHATTACHARYA, S.K. Gastroduodenal mucosal defense and mucosal protective agents. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 29, p. 701-14, 1991.

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

GONZALEZ, P.; SORIANO, V.; LOPEZ, P.; NIVEIRO, E. Anaphylaxis to próton pump inhibitors. **Allergie Immunopathology**, v.30: p.342-343, 2002.

GRACIOSO, J.S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA BRITO, A.R. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25: p.487-491, 2002.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O. & PELZER, L. E. Antiinflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.

GUÉDON, D.; ABBE, P. & LAMAISON, J. L. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. subspecies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.21, n. 5, p. 607-611, 1993.

GYIRES, K.; MÜLLNER, K.; RÓNAI, A.Z. Functional evidence that gastroprotection can be induced by activation of central α_2 B-adrenoceptor subtypes in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v.396(2-3): p.131-135, 2000.

HARBORNE, J. B. (Ed.), *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London, p. 619-652, 1994.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992.

HARBORNE, J.B. *Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships, in Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Middleton E, HARBORNE JB and Beretz A eds) **Alan R. Liss**, Incorporated: New York, p. 17-28, 1988.

HASRAT, J. A.; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J. P.; VAUQUELIN, G. & VLIETINCK, A. J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 49, p.1145-1149, 1997.

HAWKINS, C. & HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. A review of the literature. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, n. 2, p. 140-151, 2000.

HISHAM, A.; SREEKALA, U.; PIETERS, L.; BRUYNE, T.; van den HEUVEL, H. & CLAEYS, M. Epoxymurins A and B, two biogenetic precursors of annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Tetrahedron**. v. 49, p.6913-6920, 1993.

HODGEN, H.C., STERNER, J.H., Tabulation of toxicity classes. **Am. Ing. Hyg.Quart.**, v.10, p.93-96, 1949.

HOFFMAN, B.B. Fármacos antagonistas dos adrenerreceptores. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10 ed. São Paulo: McGraw-Hill. p.127-141, 2007.

HOPPE, R.; SCHRIF, H.D. Annonaceous Acetogenin-Synthetic Approaches Towards a Novel class of natural products. *J. of Synth. Org. Chem.* 12, 1447, 1995.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain.** *Pain*, v. 30, p. 103-104, 1987.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. Antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **J Med Chem** 39: p.3107-3113, 1996.

JOLAD, S.D., Hoffman, J.J., SCHRAM, K.H., COLE, R.J. Uvaricin, a NEW Agent from *Uvacarina accuminata* (Annonaceae). **J.Org.Chem**, 47, 3151, 1982.

JUNQUEIRA, N.T.V.; OLIVEIRA, M.A.S.; ICUMA, I.M.; RAMOS, V.H.V. **Cultura da Graviola. In: Incentivo à fruticultura no Distrito Federal: Manual de fruticultura.** SILVA, J.M. de M., coord. – 2ª ed. rev. atual. – Brasília: OCDF, COOLABORA, 1999.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastrointestinal injury and protection. **J Gastrointest Hepatol**, v. 15 (Suppl): D1-D6, 2000.

KEFFORD J.F., CHANDLER B.V. The Chemical Constituents of Citrus Fruits. **Academic Press**, New York, 1970.

KIM, D. H.; SON, J. K. & WOO, M. H. Annonocheerin, annonacin and annomontacin: A novel and two known bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Archives of Pharmacal Research**. v. 24, p. 300-306, 2001.

KIM, J. R.; YEON, S. H.; KIM, H. S. & AHN, Y. J. Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. **Pest Management Science**. v. 58, p.713-717, 2002.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.39-50, 2002.

LANZA L.L.; WALKER A.M.; BORTNICHAK E.A.; DREYER N.A. **Peptic Ulcer and Gastrointestinal Hemorrhage Associated with Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use in Patients Younger Than 65 Year**. Arch. Intern. Med. v. 155 p. 1371 – 1377, 1995.

LAPA A.J., LIMA T.C.M. **Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento/Rede Iberoamericana de Validação de Plantas Mediciniais**, 1997.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.L.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. SBPC, Campinas-SP, 2008.

LAPA, F.R. **Avaliação da atividade antinoceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroetanólico bruto de *Polygala paniculata* L.** 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná e Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2006.

LEBOUEF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B. & MUKHERJEE, R. The phytochemistry of Annonaceae. **Phytochemistry**. v. 21, p.2783-2813, 1982.

LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H. F.; WU, M. J. & WU, Y. C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v. 65, p.470-475, 2002.

LIMA, M. F.; LIMA, F. A. M.; TEIXEIRA, M. S. Mapeamento e demarcação definitiva da Floresta Nacional do Araripe - Ceará, Brasil. **Ciê. Agron.**, Fortaleza, 15(1/2): 59-69, dez. 1984.

LIPOF, T.; SHAPIRO, D.; KOZOL, R. A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World Journal of Gastroenterology**. v.20, p.3248-3252, 2006

LOPES, José Gilber Vasconcelos; OLIVEIRA, Fátima Maria Martins; ALMEIDA, José Inácio Lino de. **A gravioleira**. Fortaleza, BNB, 1994

MANN, J. Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxford Science Publications, 20,40, (1994).

MARTINS, J. E. C. **Plantas Medicinais de Uso na Amazônia**. 2a Edição Cultural CEJUP, 1989.

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.

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

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: IOCE, 1989.

MATOS, L.G.; SANTOS, L.D.A.R.; VILELA, C.F. et al. **Atividades analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hill.** (manacá). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, supl., p. 15-16, 2003.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWM, 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.

MCLAUGHLIN, J. L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous. **Cancer Letters**. v. 96, p.55-62, 1995.

MELO, B.S.C. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE PRODUTOS NATURAIS E SÍNTÉTICOS NO CONTROLE DAS BROCAS DA GRAVIOLA**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal do Ceará. FORTALEZA.2006.

MIDDLETON, JR.; KADASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C: **The effects of planflavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer**. *Pharmacological Review*. 2000, **52**:673-751.

MIDDLETON, E. JR., KANDASWAMI, C. *The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer*. In: HARBORNE, J. B. (Ed.), *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London, p. 619-652, 1994.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Floresta. **Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade brasileira**. 2007.

MUSCARA, M.N.; WALLACE, J.L. Nitric oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.**, v.276: p.1313-1316, 1999.

NODARI, R.O; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, M.O, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2a Edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2001.

NWAFOR, P.A.; BASSEY, A.I. Evaluation of anti-diarrhoeal and antiulcerogenic potential of ethanol extract of *Carpolobia lutea* leaves in rodents. *J Ethnopharmacol.*, v. 111(3), p. 619-24, 2007.

OBERLIES, N. H.; JONES, J. L.; CORBETT, T. H.; FOTOPOULOS, S. S. & MCLAUGHLIN, J. L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous. **Cancer Letters**. v. 96, p.55-62, 1995.

OKUDA, T. **Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants**. *Phytochemistry*. 2005, **66**: 2012-2031.

OLIVEIRA F.A.; JUNIOR G.M.V.; CHAVES M.H.; ALMEIDA F.R.C.; FLORÊNCIO M.G.; JUNIOR R.C.P.L.; SILVA R.M.; SANTOS F.A.; RAO V.S.N.; **Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats**. *Pharmacological research*, v. 49, p. 105-111, 2004.

PANDIAN, R.S.; ANURADHA, C.V.; VISWANATHAN, P. Gastroprotective effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81: p.393-397, 2002.

PARK J.S.; CHOI M.A.; KIM B.S.; HAN I.S.; KURATA T.; YU R. **Capsaicin Protects Against Ethanol – Induced Oxidative Injury in the Gastric Mucosa of Rats**. *Life sciences*, v. 67, p. 3087 – 3093, 2000.

PARK, J.S.; CHOI, M.A.; KIM, B.S.; HAN, I.S. KURATA, T.; YU, R. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. *Life Science*; v. 67, n. 25, p. 3087-3093, 2000.

PAULA JÚNIOR, W. **Atividades biológicas *in vitro* de extratos hidroetanólicos de folhas e do mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense***

Cambess. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PRATT, D.E., BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity in soybeans. *Journal of Food Science*, v. 44, p. 1720-1722, 1979.

RA, A.; TOBE, S.W. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 38, p. 41–45, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora. Tradução da 5ª edição americana, 2001.

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.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 152-159, 1997.

RICHARDSON, G.A., EL-RAFEY, M.S., LONG, M.L. Flavones and flavone derivatives as antioxidants. *Journal of Dairy Science*, v. 30, p. 143-397, 1974.

RIOS, J.L., MAÑEZ, S., PAYA, M., ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1947-1950, 1992.

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

ROBLOT, F.; LAUGEL, T.; LEOEUF, M.; CAVE, A. & LAPREVOTE, O.
Acetogenins of annonaceae. 21. 2 acetogenins from *Annona muricata* seeds.
Phytochemistry, v. 34, p.281- 285, 1993.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; AMORNLERDPISON, D.; POJANA, S.
Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102: p. 120-122, 2005.

SACRAMENTO, Célio Kersul do, FARIA, José Cláudio, CRUZ, Fábio Lopes da *et al.* **Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.)**. Rev. Bras. Frutic., ago. 2003, vol.25, no.2, p.329-331. ISSN 0100-2945 Santos,L.P.;Boaventura,M.A.D.O.;BRAGA,A. Crassiflorina, uma acetogenina tetrahidrofurânica de *Annona crassiflora*. Química nova,17, 387,(1994)

SAKAI, H.; KUMANO, E.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. A gastric housekeeping Cl channel activated via prostaglandin EP3 receptor-mediated Ca²⁺ nitric oxide/cGMP pathway. **J. Biol. Chem**, v.270: p.18781-18785, 1995.

SAMONINA, G.E.; KOPYLOVA, G.N.; LUKJANZEVA, G.V.; ZHUYKOVA, S.E; SMIRNOVA, E.A.; GERMAN, S.V.; GUSEVA, A.A. Antiulcer affects of amylin: a review. **Pathophysiology**, v.11: p.1-6, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000.

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G.. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterology**, v.126, p.903–13, 2004.

SIEGMUND, S. Animal models in gastrointestinal alcohol research—a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 4, p. 519-542, 2003.

SUMMERS, C.B., FELTON, G.W. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, p. 943-953, 1994.

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

SZABO, S., Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v. 13, p. 21S-34S, 1991.

SZOLCSANYI, J.; BARTHO, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. **J. Physiol.**; v. 95, n. 1-6, p. 181-188, 2001.

TAHA, A.S.; DAHILL, S. NAKASHABENDI, I.; LEE, F.D.; STURROCK, R.D.; RUSSEL, R.I. Duodenal histology, ulceration, and *Helicobacter pylori* in the presence or absence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gut.*; v. 34, p. 1162-1166, 1995.

TIMBERLAKE C.F., HENRY B.S. *Plant pigments as natural food colours*. *Endeavour*, v. 10, p. 31-36, 1986.

VASQUEZ, M. R. Useful Plants of Amazonian Peru. Second Draft. Filed with USDA's National Agricultural Library, USA, 1990.

WAGNER K.A.; NANDI J.; KING. R.L.; LEVINE R.A. **The Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Ulcerogenesis and Gastric Secretion in Pylorus-ligated Rat.** Dig. Dis Sci.; v. 40, p. 134-140, 1995.

WAGNER; WISENAUER. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas.** São Paulo – SP: Ed. Pharmabooks, 2006.

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

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v.15, p.691-703, 2001.

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

WATERMAN, P. G.. **Phytochemistry**. v. 25, p.3-17, 1986.

WHITTLE, B.J.; OREN-WOLMAN, N.; GUTH, P.H. Gastric vasoconstrictor actions of leukotriene C4, PGF2 alpha, and thromboxane mimetic U-46619 on

rat submucosal microcirculation *in vivo*. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**; v.248: p.G580-G586, 1985.

WINTER C.A.; RISLEY E.A.; NUSS G.W. **Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs**. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.03, p. 544-547, 1962.

YAMANAKA, N., ODA, O., NAGAO, S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Letters*, v. 405, p. 186-190, 1997.

YELKEN, B.; *et al.* Clonidine pretreatment inhibits stress-induced gastric ulcer in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v.89: p.159-162, 1999.

YU, J. G.; GUI, H. Q. & LUO, X. Z. & SUN, L Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 49, p.1689-1692, 1998.

Yu, J.G., Liu, X.Z., Sun, L., Hong, S.L. Chemistry and Pharmaceutical uses of Annonaceae . *Yaoxue Xuebao*,19,156,(1988)

YUAN, S. F.; CHANG, H.; CHEN, H.; YEH, Y.; KAO, Y.; LIN, K.; WU, Y. & SU, J. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sciences**. v. 72, p.2853, 2003.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; BRZOZOWSKI, T.; GZHEGOTSKY., M. R. Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. **Fiziologicheskii Zhurnal**, v. 50, n. 6, p. 118-127,2004.

ZAYACHKIVSKA, O. S.; KONTUREK, S. J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M. R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 56, Supl 1, p. 219-31, 2005.

ZLABEK, J.A.; ANDERSON, C.G. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. ***Annals of Pharmacotherapy***, v.36: p.809-811, 2002.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC;2004.

APÊNDICES



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

APÊNDICE A - MODELO DE FORMULÁRIO PARA PESQUISA
ETNOBOTÂNICA SOBRE A *Annona muricata* L.(GRAVIOLA)

1. LOCAL DE COLETA DAS INFORMAÇÕES:

MUNICÍPIO: _____ UF: _____

LOCALIDADE: _____

2. DADOS DO INFORMANTE:

NOME _____

IDADE: _____ SEXO: F () M () NATURALIDADE: _____

TEMPO EM QUE RESIDE NA ÁREA: _____

OCUPAÇÃO: _____

TRABALHA DIRETAMENTE COM PLANTAS MEDICINAIS NA COMUNIDADE:

SIM _____ NÃO _____

CASO SIM, ESPECIFIQUE:

3. DADOS SOBRE A PLANTA E SEU USO:

Nome(s) popular (es) da planta	Parte usada	Via de admin.	Modo de preparo	Indicação
GRAVIOLA				

4 - DADOS COMPLEMENTARES:

QUEM MAIS UTILIZA? (H, M, C, I) _____

INDICAÇÃO *versus* DURAÇÃO DO TRATAMENTO:

VARIAÇÃO NO MODO DE UTILIZAÇÃO *versus* INDICAÇÃO:

FREQUÊNCIA DA DOSE *versus* INDICAÇÃO:

RESTRIÇÕES AO USO: _____

RESULTADOS GERAIS OBTIDOS COM O USO?

Modelo de formulário adaptado de Matos (1998)



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

APÊNDICE B - MODELO DE TERMO DE CONSETIMENTO PARA PESQUISA
ETNOBOTÂNICA SOBRE A *Annona muricata* L.(GRAVIOLA)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, declaro estar ciente da pesquisa: **BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS CULTIVADAS NO NORDESTE DO BRASIL: AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR E ANTIMICROBIANO DA *Annona muricata* Linnaeus. (GRAVIOLA)**, a qual tem como objetivo realizar o estudo das atividades biológicas destas plantas.

Estou ciente, também, de que tenho direito a esclarecimentos a qualquer momento e que os mesmos se fizerem necessários, de que tenho plena liberdade de recusar a participar desta pesquisa, ou, mesmo tendo aceitado e assinado este termo, de excluir meu consentimento, no todo ou em parte dos dados em qualquer fase do processo, sem que disso resulte algum prejuízo, e que os dados são confidenciais e serão mantidos em sigilo, conforme assegura a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde. Estou ciente de que não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando ciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, da isenção de despesas, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO e permito que os pesquisadores utilizem os resultados da análise do formulário com confidencialidade, inclusive para publicação. Assinatura do sujeito do estudo

Elizangela Beneval Bento

Pesquisadora

Data: ____/____/____

ANEXOS

Anexo I. Efeito do EHAM no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	18,57±2,12	-
Controle positivo (Omeprazol)	30,v.o.	0,78±0,34***	95,79
EHAM	50,v.o.	1,32±0,25***	92,89
	100,v.o.	1,09±0,49***	94,13
	200,v.o.	0,41±0,14***	97,79
	400,v.o.	0,65±0,45***	96,49

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM, o omeprazol ou o veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado), por via oral, 30 minutos antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 6 animais por grupo. ***p<0,001 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo II. Efeito do EHAM (via intraperitoneal) no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO (%)
Controle Lesionado (veículo)	-	26,60±3,43	-
EHAM	100,i.p.	6,16±0,92***	76,84
EHAM	100,v.o.	1,09±0,49***	95,90

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM (i.p. e v.o.) ou o veículo (0,1ml/10g, i.p., para o grupo controle lesionado), 30 minutos antes da administração oral de etanol absoluto (0,2 mL/animal). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 10 animais por grupo. ***p<0,001 vs controle lesionado (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo III. Efeito do EHAM no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol acidificado em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	23,19±3,09	-
Controle positivo (Omeprazol)	30,v.o.	3,58±0,56***	84,56
EHAM	50,v.o.	14,30±2,66**	38,33
	100,v.o.	6,48±0,93***	72,05
	200,v.o.	4,59±1,73***	81,06
	400,v.o.	0,75±0,26***	96,76

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM, o omeprazol ou o veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado), por via oral, 30 minutos antes da administração oral de etanol acidificado (0,2 mL/animal). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 6 animais por grupo. ***p<0,001, **p<0,01 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo IV. Efeito do EHAM no modelo de lesões gástricas induzidas por DAINES (indometacina) em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	12,61±3,27	-
Controle positivo (Omeprazol)	30,v.o.	0,40±0,24***	96,82
EHAM	200,v.o.	0,74±0,21***	94,13
	400,v.o.	1,05±0,38***	91,67

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM, o omeprazol ou o veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado). Após uma hora foi administrado subcutaneamente a indometacina (10mg/Kg) e após três horas, foram repetidos os tratamentos com o veículo, o extrato e o omeprazol. Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram sacrificados. Foram utilizados 6 animais por grupo. ***p<0,001 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo V. Papel do óxido nítrico (NO) no efeito gastroprotetor do EHAM em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	20,52±2,29	-
Controle Lesionado + L-NAME	10,i.p.	28,73±3,83*	-
Controle Lesionado + L-ARGININA	600,v.o.	1,47±0,38**	94,88
EHAM	200,v.o.	0,41±0,14**	98,57
EHAM + L-NAME	200,v.o. + 10,i.p.	4,14±0,76**	95,58
EHAM + L-ARGININA	200,v.o. + 600,v.o.	3,29±0,88**	88,54

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, do L-NAME por via intraperitoneal, ou L-ARGININA por via oral, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 7 animais por grupo. ***p<0,001, **p<0,01 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo VI. Papel das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do EHAM em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	18,57±2,12	-
Controle Lesionado + indometacina	10,v.o.	13,09±1,92	-
Controle Lesionado + misoprostol	0,016,v.o.	0,57±0,25**	95,64
EHAM	200,v.o.	0,41±0,14***	96,67
EHAM + indometacina	200,v.o. + 10,v.o.	9,85±2,50**	20,11
EHAM + misoprostol	200,v.o. + 0,016,v.o.	1,15±0,66**	90,67

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da Indometacina por via oral, ou Misoprostol por via oral, 2 horas e 1 hora, respectivamente, antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 7 animais por grupo. ***p<0,001, **p<0,01 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo VII. Papel dos receptores noradrenérgicos α_2 no efeito gastroprotetor do EHAM em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	23,22±2,08	-
Controle Lesionado + Ioimbina	10,i.p.	30,34±4,96	-
EHAM	200,v.o.	0,41±0,14***	98,45
EHAM + Ioimbina	200,v.o. + 10,i.p.	3,31±0,65***	87,51

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da ioimbina por via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 7 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo VIII. Papel dos Canais de K⁺ dependentes de ATP no efeito gastroprotetor do EHAM em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO
Controle Lesionado (veículo)	-	17,17±2,44	-
Controle Lesionado + Glibenclamida	5,i.p.	13,30±2,25	-
EHAM	200,v.o.	0,41±0,14***	96,91
EHAM + Glibenclamida	200,v.o. + 5,i.p.	1,45±0,57***	89,09

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da glibenclamida por via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 7 animais por grupo. ***p<0,001 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo IX. Envolvimento do efeito gastroprotetor do EHAM em associação à capsaicina em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos.

GRUPOS	DOSE (mg/kg;via)	ÁREA GÁSTRICA ULCERADA (%)	PERCENTUAL DE REDUÇÃO(%)
Controle Lesionado (veículo)	-	23,80±3,80	-
Controle Lesionado + capsaicina	0,2,v.o.	6,94±0,96***	70,84
Controle Lesionado + capsaicina	4,v.o.	1,60±0,49***	93,27
EHAM	20,v.o.	5,57±1,81***	76,59
EHAM + capsaicina	20,v.o. + 0,2,v.o.	8,38±2,38***	64,78

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da percentagem de área gástrica ulcerada. Administrou-se tratamento com o EHAM ou veículo (0,1ml/10g para o grupo controle lesionado) por via oral, 1 hora antes, da Capsaicina por via oral, 1 hora antes da administração do etanol absoluto (0,2 mL/animal). Um grupo foi tratado com o EHAM, 30 minutos antes da administração do etanol absoluto. Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do etanol. Foram utilizados 7 animais por grupo. ***p<0,001 vs controle (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Anexo X. Efeito do EHAM sobre o trânsito intestinal em camundongos.

GRUPOS	DOSE/VIA	DISTÂNCIA PERCORRIDA PELO MARCADOR (%)
Controle (veículo)	-	82,77±4,29
EHAM	200mg/kg,v.o.	70,14±6,48
Atropina	0,01g/kg,v.o.	63,21±2,05*

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) da distância percorrida pelo marcador. Administrou-se tratamento com o EHAM, atropina ou o veículo (0,1ml/10g, para o grupo controle lesionado), 1 hora antes da administração oral de carvão ativado 10% (0,1 mL/10g, v.o.). Os animais foram sacrificados 30 minutos após a administração do marcador. Foram utilizados 10 animais por grupo. *p<0,05 vs controle (veículo) (ANOVA, Teste de Student Newman-Keuls).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)