

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Avaliação da atividade e do mecanismo de ação antiúlcera de frações
e do alcalóide cantinona, obtidos do rizoma de *Simaba ferruginea* St. Hil.**

ELISÂNGELA SATURNINO DE SOUZA ALMEIDA

Cuiabá – MT

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Avaliação da atividade e do mecanismo de ação antiúlcera de frações
e do alcalóide cantinona, obtidos do rizoma de *Simaba ferruginea* St. Hil.**

ELISÂNGELA SATURNINO DE SOUZA ALMEIDA

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programas de Pós-Graduação em Medicina,
da Faculdade de Ciências Médicas, da
Universidade Federal de Mato Grosso, como
requisito parcial para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências da Saúde, Área de
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Cuiabá – MT
2010

Essa dissertação foi submetida como parte integrante dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde, outorgado pela Universidade Federal de Mato Grosso e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da UFMT.

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

Elisângela Saturnino de Souza Almeida

Dissertação aprovada em: ___/___/___

Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins
(Orientador)

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
(Co-orientador)

Prof. Dr. Lousã Lopes

Prof^a. Dr^a. Zhelmy del Rocío Martín Quintal

**Agradeço a Deus,
de eterna bondade,
por ter me presenteado
com uma família maravilhosa
e ter me concedido essa oportunidade,
permitindo que eu tivesse saúde e força
para iniciar e concluir esse Mestrado.**

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Ostilio Xavier de Souza e Izaura Saturnino de Souza que, que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade; que se doaram por inteiro e, muitas vezes, renunciaram a seus sonhos para que pudessem realizar os meus.

Ao meu Amor, Fábio Lima de Almeida, pelo carinho, pelos bons momentos na alegria, pela força nos dias difíceis, por acreditar em mim e por estar sempre ao meu lado.

Te Amo!

Aos meus irmãos, Alessandra e Ostilio Júnior, pelo amor que nos une.

Aos meus cunhados, Fernanda e Júnior, por estarem sempre presente dando força e incentivo.

A minha sobrinha Sophia, que renova a família e alegria que nos alimenta a vida.

Agradecimentos

Nenhuma obra é fruto do trabalho individual. Por isso sou agradecida a todas as pessoas que participaram deste trabalho, pois sem eles não se tornaria realidade.

Meus mais sinceros agradecimentos...

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins, por sua incansável e criteriosa orientação, por sua dedicação, paciência, apoio, disponibilidade, profissionalismo, ensinamentos e incentivos à minha formação científica que foram essenciais à elaboração deste trabalho, minha eterna gratidão

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, meu co-orientador, pela sua colaboração imprescindível nos estudos fitoquímicos, por toda dedicação, carinho e amizade;

À Universidade Federal de Mato Grosso e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela formação acadêmica e oportunidade, em especial aos professores do programa.

Ao Prof. Dr. Cor Jesus, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, pelo auxílio e apoio na realização do mestrado;

Ao Mestre Joaquim Corsino da Silva Lima, Técnico Administrativo da FCM, pela contribuição nos procedimentos de bancada e coletas a campo;

À Suellen Iara Guirra, companheira de todas as horas nesta caminhada de mestrado, pelo exemplo de pessoa, pelos inúmeros conselhos, amizade e apoio incondicional em todos os experimentos;

À Samyra Buzelli, do laboratório de Bioquímica pela convivência, companheirismo, paciência e apoio incondicional em todos os experimentos e inúmeros conselhos;

À Bruna Clasen, pela ajuda incansável, dedicação e empenho em isolar os compostos do rizoma de *Simaba ferruginea*;

A minha Isanete Geraldine Bieski, por sempre estar pronta para ajudar independente da hora e lugar e inúmeras conversas maravilhosas que tivemos;

A Solange Fernandes Moreira Lopes e Áurea Damaceno Alves, pela colaboração nas atividades experimentais e inúmeros momentos compartilhados;

A Larissa Maria Scalon Lemos, pelo auxílio durante todas as etapas deste estudo, pelos momentos agradáveis e de muitas gargalhadas, enfim foi meu anjo da guarda;

Ao Mestre Ibere Ferreira da Silva Júnior, pela dedicação e ajuda nos experimentos *in vitro* de *Helicobacter pylori*;

Aos alunos de iniciação científica, Guilherme Henrique Tanajura, Mariana Canevari de Oliveira, Roberto Segundo Bueno Borges, Thaís Bezerra Martins e Vinícius Marques Poio, pelo auxílio imprescindível em todos os experimentos;

A todos os colegas do mestrado de Ciências da Saúde da UFMT, pela alegre convivência ao longo das disciplinas cursadas;

Ao Prof. Ms. Rogério Alexandre Nunes dos Santos, da UNIC pela ajuda em todos os experimentos desenvolvidos no laboratório de cultura de células;

A Dr. Ellen Tanus Rangel, pela ajuda e colaboração no experimento de citotoxicidade;

A Naiana Fernandes Leotti, aluna de mestrado da área de doenças infecciosas e tropicais, pelas inúmeras ajudas nos experimentos desenvolvidos no laboratório de cultura de células.

Ao Carlos Roberto Porto Dechandt, aluno de iniciação científica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e da Terra, pela ajuda com as dosagens de antioxidante;

A Danielle Ayr Tavares de Almeida, pela ajuda constante em todos os experimentos;

A Maria Cristina Fuzari, técnica do laboratório da UFMT, pelo apoio constante em todos os momentos dos experimentos;

A Phamela Valéria Fuzari Duarte, bolsista/estagiária UFMT/IFMT – MT, por apoiar nos experimentos e sempre manter sua alegria;

Ao Biotério Central, da Universidade Federal de Mato Grosso, pelo fornecimento dos animais utilizados nos experimentos;

Ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UFMT), pela análise e aprovação de meu projeto;

À Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso, por ter concedido minha liberação para cumprir as atividades do mestrado;

A todos da administração da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, Luciana Ivanete Kapelinski, Gracielly Alves Gama e Eva Elizabeth Pedroso da Silva Moraes, pelo convívio e atenção;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT, Eliana Maria da Silva, pelas orientações administrativas, convívio e atenção;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para a execução desse trabalho.

Nunca te arrependas de um dia de tua vida!
Os bons dias te dão felicidade,
Os maus te dão experiência,
Ambos são essenciais para a vida.
A felicidade te faz doce,
Os problemas te mantêm forte,
As penas te mantêm humano,
As quedas te mantêm humilde,
O bom êxito te mantêm brilhante,
Mas, só Deus te mantêm caminhando...

Terço Bizantino
(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

Lista de Siglas e Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
I INTRODUÇÃO	21
1 PLANTAS MEDICINAIS.....	21
1.1 Cerrado.....	24
1.2 <i>Simaba ferruginea</i> St. Hil	26
2 FISIOLOGIA GÁSTRICA.....	29
2.1 Secreção gástrica	32
2.2 Úlcera péptica.....	35
2.3 Fatores protetores da mucosa gástrica	37
2.3.1 Proteção pré-epitelial	38
2.3.2 Proteção epitelial	399
2.3.3 Proteção Sub-Epitelial.....	411
2.3.4 Sistema Imune da Mucosa Gástrica.....	44
2.4 Fatores Agressores Da Mucosa Gastrintestinal.....	455
2.5 Terapêutica Atual E Perspectivas	50
II OBJETIVOS	533
3.1 Gerais	533
3.2 Específicos	533
III MATERIAIS.....	544
4.1 Material botânico.....	544
4.2 Animais	544
4.3 Microorganismos	54
4.4 Linhagem Celular	55
4.5 Drogas e reagentes.....	555
4.6 Equipamentos	577
IV MÉTODOS	588
5.1 Extrato Metanólico de <i>Simaba ferruginea</i>	588
5.2 Fração Alcaloídica de <i>Simaba ferruginea</i>	588
5.3 Fração diclorometano-resíduo alcalino de <i>Simaba ferruginea</i>	599
5.4 Isolamento do alcalóide cantinona	599
5.5 Análise cromatográfica	611
5.6 Determinação dos peso secos do extrato metanólico e frações de <i>Simaba ferruginea</i>	622
5.7 Determinações dos rendimentos do extrato e frações.....	622
5.8 Citotoxicidade através do método de Sal de Tetrazólio (MTT).....	622
5.9 Ensaio in vivo	63
5.9.1 Lesão gástrica induzida por etanol	63
5.9.2 Úlcera gástrica induzida por Indometacina.....	644

5.9.3	Determinação do óxido nítrico da mucosa gástrica.	65
5.9.4	Determinação da atividade antioxidantes.....	666
5.9.4.1	Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	66
5.9.4.2	Determinação do Malonaldeído (MDA).....	667
5.9.5	Determinação dos níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α	657
5.9.6	Determinação dos níveis de PGE ₂ da mucosa gástrica.	658
5.10	Ensaio <i>in vitro</i>	688
5.10.1	Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> Difusão em disco	688
5.10.2	Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).	699
V ANÁLISES ESTATÍSTICAS		70
VI RESULTADOS.....		711
7.1	Determinação do peso seco e rendimento do extrato metanólico e frações de <i>Simaba ferruginea</i>	711
7.2	Isolamento do Alcaloíde Cantinona.....	711
7.3	Determinação do Alcaloíde Cantinona	Erro! Indicador não definido.2
7.4	Citotoxicidade do extrato, frações e cantinona.	744
7.5	Ensaio <i>in Vivo</i>	744
7.5.1	Avaliação da atividade antiúlcera do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona– Úlcera gástrica por etonal.	744
7.5.2	Avaliação da Atividade Antiúlcera do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e Cantinona - Úlcera Induzida por Indometacina.	788
7.5.3	Úlcera Induzida por Etanol em Animais Pré-tratados com L-NAME.....	799
7.5.4	Determinação da atividade antioxidantes.....	811
7.5.4.1	Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	81
7.5.4.1	Determinação da atividade do Malonaldeído (MDA)	82
7.5.5	Determinação dos níveis de IL-8, TNF- α e PGE ₂	84
7.6	Ensaio <i>in vitro</i>	855
7.6.1	Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> do EMSf, FASf, DCM-RASf e Cantinona, pelo método de Difusão em disco.	855
7.6.2	Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> do EMSf, FASf, DCM-RASf e Cantinona <i>in vitro</i> pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).	866
VII DISCUSSÃO		87
VIII CONCLUSÃO		966
IX REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		988
ANEXOS		1155
	Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico, expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.....	116
	Certificado de conformidade com princípios éticos na experimentação animal, conforme Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT.	117

Lista de Siglas e abreviaturas

AA	Ácido araquidônico
AINEs	Antiinflamatório não esteroideal
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância uma via
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
Bab A	Molécula de adesão de antígeno do grupo sanguíneo do <i>H. pylori</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração
Cant	Cantinona
Cag A	Citotoxina associada ao gene A
CAT	Catalase
Carb	Carbenoxolona
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCK	Colecistocinina
CCK-B	Receptor de colecistocinina tipo B
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CEPA	Comitê de ética em pesquisa animal
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX 1	Ciclo-oxigenase 1
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
DCM-RASf	Fração diclorometano-resíduo alcalino de <i>Simaba ferruginea</i>
DL ₅₀	Dose letal
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium Hepes Modification
ECL	Células do tipo enterocromafins

EGF	Fator de crescimento epidermal
EHSf	Extrato hidroetanólico de <i>Simaba ferruginea</i>
EMSf	Extrato metanólico de <i>Simaba ferruginea</i>
EP2	Receptor de prostaglandina E
EP3	Receptor de prostaglandina E
E.P.M.	Erro padrão da media
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FASf	Fração alcaloídica de <i>Simaba ferruginea</i>
FeCl3	Cloreto férrico
GPS	Global Positioning System
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona-S-transferase
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HAM	Nutrient Mixture F-10 HAM
H ⁺ ,K ⁺ /ATPase	Enzima hidrogênio potássio dependente do trifosfato de adenosine
H ₂	Receptor para histamina tipo 2
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFN-γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-8	Interleucina 8
IL-1β	Interleucina 1β
IP3	Trifosfato de inositol
L-arg	L-arginina

LPS	Lipopolissacarídeo
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil Ester
LPO	Lipoperoxidação
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MDA	Malonaldeído
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de difeniltetrazólio
NF-κB	Fator nuclear-KappaB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
cNOS	Óxido Nítrico Sintase constitutive
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endothelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
PAF	Fator de agregação plaquetária
PGs	Prostaglandinas
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaglandina I
PGF	Prostaglandina F
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PNPICS	Políticas Nacionais Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde
PNPMF	Políticas Nacionais Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SISBIO	Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade
SH	Grupos sulfidrílicos
SH-NP	Grupos sulfidrílicos não-protéicos
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TGI	Trato gastrointestinal
TGF α	Fator de crescimento transformante alfa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXA2	Tromboxano A2
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
UNIC	Universidade de Cuiabá
UNIVALI	Universidade do Vale de Itajaí
VacA	Citotoxina de vacuolização do <i>H. Pylori</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de figuras

Figura 1.	Produtos naturais utilizados como fármacos para o tratamento do câncer.	22
Figura 2.	Biotomas brasileiros, com destaque para o Cerrado (em verde).....	25
Figura 3.	Rizoma e planta inteira de <i>Simaba ferruginea</i> St Hil.....	27
Figura 4.	Estrutura química do alcalóide Cantinona (1) isolado do rizoma, β -sitosterol (2) e quercetrina (3) isolados das folhas de <i>S. ferruginea</i>	28
Figura 5.	Principais subdivisões anatômicas do estômago	29
Figura 6.	Organização geral das camadas do trato gastrointestinal_	30
Figura 7.	Estrutura da glândula gástrica	31
Figura 8.	Células do epitélio gástrico	32
Figura 9.	Controle da secreção gástrica pelas células parietais.	35
Figura 10.	Mecanismo de defesa e injúria da mucosa gástrica.....	36
Figura 11.	Mecanismo de defesa da mucosa gástrica.....	37
Figura 12.	Resumo da formação das espécies reativas de oxigênio no organismo e ações das enzimas antioxidantes.	40
Figura 13.	Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase.	42
Figura 14.	Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago.	47
Figura 15.	Esquema para obtenção da Fração Alcaloídica a partir do rizoma de <i>Simaba ferruginea</i>	59
Figura 16.	Esquema para obtenção do Alcalóide Cantinona a partir do rizoma de <i>Simaba ferruginea</i>	61
Figura 17.	Preenchimento da microplaca para determinação da Citotoxicidade.....	63
Figura 18.	Ensaio de difusão em disco com <i>Helicobacter pylori</i>	69
Figura 19.	Preenchimento da microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).	70
Figura 20.	Esquema mostrando as quantidades de cantinona, obtidas a partir do extrato metanólico de <i>Simaba ferruginea</i>	72
Figura 21.	Cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com reagente de Dragendorff (cantinona).....	73
Figura 22.	Perfil cromatográfico (HPLC) do alcalóide cantinona	73
Figura 23.	Efeito do EMSf sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 75% em camundongos.....	75
Figura 24.	Efeito da FASf sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 75% em camundongos.....	76
Figura 25.	Efeito da DCM-RASf sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 75% em camundongos.....	77
Figura 26.	Efeito da cantinona sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 75% em camundongos.....	78
Figura 27.	Efeito do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona nas lesões gástricas induzidas por Indometacina em ratos.	79

- Figura 28.** Efeito do EMS*f*, FAS*f*, DCM-RAS*f* e cantinona em lesões gástricas induzidas por etanol 75% em ratos pré-tratados com L-NAME..... 81
- Figura 29.** Efeito do EMS*f*, FAS*f*, DCM-RAS*f* e cantinona sobre os níveis de mieloperoxidase nas lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos. 82
- Figura 30.** Efeito do EMS*f*, FAS*f*, DCM-RAS*f* e cantinona sobre os níveis de malonaldeído nas lesões gástricas induzidas por indometacina em ratos..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Pesos secos e rendimentos do extrato e frações de <i>Simaba ferruginea</i>	711
Tabela 2.	Resultado da citotoxicidade de diferentes concentrações de EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona sobre as células Hep G ₂	74
Tabela 3.	Efeito de EMSf, FASf, DCM-RASf, cantinona e carbenoxolona, sobre os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α e de PGE ₂ , da mucosa gástrica de ratos ulcerados com indometacina	85
Tabela 4.	Avaliação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i> do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, pelo método de difusão em disco.....	85
Tabela 5.	Avaliação da atividade anti- <i>Helicobacter pylori in vitro</i> do EMSf, FASf, DCM-RASf e Cantinona, pelo método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).	86

Lista de ANEXOS

1. Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico - expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA.
2. Certificado de conformidade com princípios éticos na experimentação animal, conforme Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA – expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIÚLCERA DE FRAÇÕES E CANTINONA, OBTIDOS DO RIZOMA DE *SIMABA FERRUGINEA* ST. HIL.

Almeida, E. S.S. Dissertação apresentada à Coordenação do Programas de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Farmacologia. Orientador: Domingos Tabajara de Oliveira Martins, Co-Orientador: Valdir Cechinel Filho.

A *Simaba ferruginea* (calunga) é uma espécie típica do cerrado brasileiro, cujos rizomas são utilizados na forma de infusão ou decocção para tratar úlceras gástricas, diarreias e febres. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade e o mecanismo de ação antiúlcera de frações e cantinona, utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. O rizoma de *S. ferruginea* foi macerado com metanol, obtendo-se o extrato metanólico (EMSf), que após particionado rendeu as frações alcaloídica (FASf) e diclorometano (DCM-RASf). A partir do EMSf, obteve-se a fração clorofórmica, da qual foi purificada o alcalóide cantinona, identificado através de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No ensaio de citotoxicidade utilizando células de hepatoma humano (Hep G₂) pelo método de sal de tetrazólio (MTT), o EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona foram considerados não citotóxicos (CI₅₀>100 µg/mL). Para os ensaios antiúlcera, foram utilizados os modelos experimentais de lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos Swiss e por indometacina em ratos Wistar, tendo o EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona mostrado-se ativos, em ambos os modelos. A cantinona foi a mais potente na úlcera por etanol, com atividade antiúlcera a partir de 0,2 mg/Kg, enquanto que a DCM-RASf, com 94,8% de inibição das lesões ulcerosas, foi a mais ativa na úlcera por indometacina. Para investigar-se o (s) possível (s) mecanismo (s) de ação do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, foram realizadas as dosagens de óxido nítrico, malonaldeído (MDA), mieloperoxidase (MPO), IL-8, TNF- α e PGE₂. A atividade antiulcerogênica do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona foi reduzida quando os animais foram pré-tratados com NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indicando possível papel do óxido nítrico (NO) na ação gastroprotetora destes. O pré-tatamento com EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona reduziu os níveis de MPO e MDA do tecido gástrico, indicando a participação de mecanismos antioxidantes no efeito gastroprotetor destes. Os níveis plasmáticos de IL-8 em ratos ulcerados com indometacina foram reduzidos pela cantinona, mas não pelo EMSf e FASf, indicando que a inibição desta citocina contribui com o efeito gastroprotetor da cantinona. O EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona não reduziram os níveis mucosais de PGE₂, mostrando que a atividade gastroprotetora destes, independe de suas ações sobre a PGE₂. Para os experimentos anti-*Helicobacter pylori* (cepas ATCC), foram utilizados os testes de difusão em disco e microdiluição em caldo. O EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona não apresentaram atividade antimicrobiana no teste de difusão em disco, porém, no teste de microdiluição em caldo, a FASf apresentou moderada atividade anti-*H. pylori* (CIM : 200 µg/mL). Os resultados indicam que a cantinona responde, pelo menos, em parte, pelo efeito antiúlcera do EMSf e FASf, assim como outros compostos presentes na DCM-RASf e FASf. A ausência de citotoxicidade e a eficácia na gastroproteção do EMSf, FASf e DCM-RASf de *S. ferruginea* como promissores fitoterápicos e a cantinona, como potencial fitofármaco, além de confirmar o uso popular desta planta contra úlceras gástricas.

Palavras-Chave: *Simaba ferruginea*, extrato metanólico fração alcaloídica, fração diclorometano, cantinona, úlceras gástricas

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTIULCER ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF FRACTIONS AND CANTHINONE ALKALOID OBTAINED FROM THE RHIZOME OF *SIMABA FERRUGINEA* ST. HIL. Almeida, E. S. S. Dissertation presented to the Coordination of the Post-Graduation Programs in Medicine of Faculty of Medical Science of Federal University of Mato Grosso, as a partial requirement for the Master Degree in Health Science, Pharmacology field. Advisor: Domingos Tabajara de Oliveira Martins, Co-advisor: Valdir Cechinel Filho

Simaba ferruginea (*calunga*, *féo da terra*) is a plant species which is typical from the Brazilian savana, whose rhizomes are used in folk medicine as infusion or decoction for the treatment of several ailments, including gastric ulcers, diarrheas, and fever. This work aimed the evaluation of antiulcer activity and action mechanisms of fractions and canthinone from this plant, using *in vivo* and *in vitro* experimental models. The rhizome of *S. ferruginea* was macerated with methanol, giving the methanolic extract (MESf) generating after partition process the alkaloidal (AFSf) and dichloromethane (DCM-ARSf) fractions after. The alkaloid canthinone was purified from chloroform fraction, obtained the MESf, by conventional chromatographic procedures, and identified by spectral data and the HPLC technique in comparison with an authentic sample. For the assay of cytotoxicity using cells from human hepatoma (Hep G₂) through the method of MTT method, MESf, AFSf, DCM-ARSf and canthinone were considered non-cytotoxic (CI₅₀>100 µg/mL). For the antiulcer assays, the experimental models of gastric lesion induced by ethanol in Swiss mice and by indomethacin in Wistar rats were used, being MESf, AFSf, DCM-ARSf and canthinone considered the most active for both models. The canthinone was showed to be the most potent for the ulcer induced by ethanol model, with antiulcer activity from 0.2 mg/Kg, whereas DCM-ARSf, with 94.8% of inhibition of the ulcerous lesions, was the most active for the ulcer induced by indomethacin model. In order to investigate the possible action mechanism(s) of MESf, AFSf, DCM-ARSf and canthinone, nitric oxid, malonaldehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), IL-8, TNF-α and dosage of PGE₂ dosages were taken. The antiulcerogenic activity of MESf, fractions (AFSf, DCM-ARSf) and canthinone were decreased when the animals were treated with *NG-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME), indicating the possible role of nitric oxid (NO) in their gastroprotector action. The pre-treatment MESf, AFSf, DCM-ARSf and canthinone reduced levels of MPO and MDA in gastric tissue, indicating the involvement of antioxidant mechanisms in the se gastroprotective effect. The plasma levels of IL-8 in rat ulcerated with indomethacin were reduced by canthinone but not by MESf and AFSf, indicating that inhibition of this cytokine contributes to the effect of gastroprotective canthinone. The MESf, AFSf, DCM-ARSf and canthinone did not reduce mucosal levels of PGE₂, showing that these gastroprotective activity, independent of their actions on the PGE₂. For the experiments anti-*Helicobacter pylori* (ATCC strains), the tests of disk diffusion and broth microdilution were carried out. MESf, AFSf, DCM-ARSf and canthinone did not present any activity for the disk diffusion test; however, for the broth microdilution test, AFSf presented moderated anti-*H. pylori* activity. The results indicate that canthinone responds, at least, partially, for the antiulcer effects of MESf and AFSf, as well as other components present in DCM-ARSf and AFSf. The lack of cytotoxicity and the efficacy in gastroprotection indicate the MESf, AFSf and DCM-ARSf from *S. ferruginea* as a promising herbal medicine and canthinone as a potential antiulcer agent, and they confirm the popular use of this plant against gastric ulcers.

Key-words: *Simaba ferruginea*, alkaloidal fraction, dichloromethane fraction canthinone, gastric ulcers

I INTRODUÇÃO

1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais mágicos/religiosos¹ ou como medicamento². O emprego empírico de produtos naturais era e continua sendo, uma das formas usuais de se buscar cura e alívio para moléstias, ferimentos e males de conceituação popular, que sempre acompanham o homem.

Em termos históricos, a pesquisa de plantas medicinais tomou impulso após o isolamento da morfina no século XIX³. Plantas e seus derivados são as maiores fontes de drogas, movimentando cerca de 30% do mercado farmacêutico⁴. De acordo com Newman e colaboradores⁵, entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semi-sintéticos ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural. Para ter uma noção do impacto desses medicamentos no mercado mundial, somente as estatinas (inicialmente isoladas a partir do fungo *Penicillium citrinum*) foram responsáveis por um mercado de US\$ 19 bilhões em 2002⁶.

Dentro desse raciocínio podem-se destacar algumas drogas economicamente importantes, obtidas a partir de vegetais apresentando as mais variadas propriedades terapêuticas, a saber: hormônios esteróides (*Dioscorea* L sp.), glicosídeos digitálicos (*Digitalis purpúrea* L), reserpina (*Rauwolfia serpentina* Benth.), alcalóides do ópio (*Papaver somniferum* L), quinidina, quinina (*Cinchona* L spp.), cocaína (*Erythroxylon coca* Lamarck), d-tubocurarina (*Strychnos* L sp., *Chondodendron tomentosum* Ruiz & Pav), vincristina, vinblastina (*Catharantus roseus* G. Don) e Paclitaxel - Taxol[®] (*Taxus brevifolia*),⁷ (Figura 1).

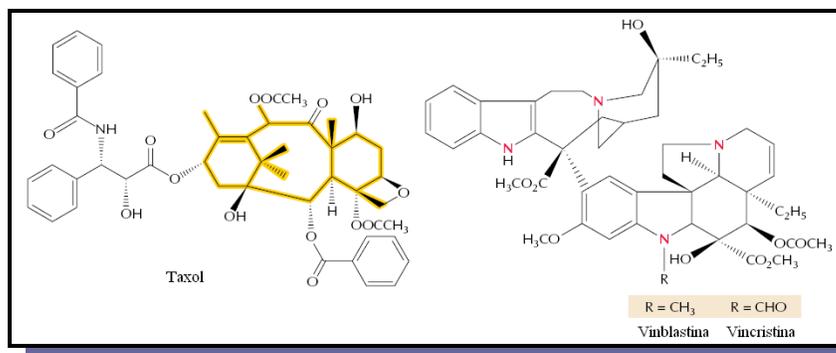


Figura 1 Produtos naturais utilizados como fármacos para o tratamento do cancer (FONTE: MAIA, 1987)⁷.

Durante a última década, o uso da medicina tradicional tem-se expandido mundialmente e vem ganhando popularidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, em 2003, cerca de 60 a 80% da população mundial não tem acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de alívio para muitas doenças. Devido a essa mudança no contexto mundial, a OMS elaborou estratégias para o uso da medicina tradicional, desenvolvendo políticas para segurança, eficácia e qualidade dos produtos naturais, permitindo aumento do acesso à saúde, mas resguardando o uso racional desses produtos naturais⁸.

Com base nos pressupostos da OMS, em 2006 duas grandes Políticas Nacionais: a de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPICS) sob a Portaria nº. 971/07 e a de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos no SUS (PNPMF), validada pelo Decreto Presidencial nº. 5.813/07 e aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos criando o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos com a portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, das responsabilidades oficiais do Ministério da Saúde^{9,10}.

A PNPICS objetiva incorporar e implementar no SUS, com ênfase na atenção básica, sistemas médicos complexos e recursos terapêuticos, denominados pela OMS de medicina tradicional e complementar/alternativas¹¹, envolvendo: Medicina Tradicional Chinesa - Acupuntura, Homeopatia, Termalismo Social e Crenoterapia, Medicina Antroposófica e Plantas Mediciniais e Fitoterapia⁹. A PNPMF objetiva garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional⁹.

O Ministério da Saúde publicou em 2009, pelo Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS - RENISUS, que elenca 71 espécies vegetais de uso popular, que já obtiveram alguma comprovação de eficácia, e com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS¹². Vale ressaltar que na elaboração dessa lista, foram excluídas as espécies exóticas e as ameaçadas de extinção, entretanto, muitas drogas com potencial fitoterápico foram esquecidas.

Para fortalecer as políticas acima descritas e no intuito de unir ciência e tradição, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), regulamentou, com a aprovação da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, publicada em 10/03/2010, a popularização desse conhecimento, visando contribuir para a construção do marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais, a partir da experiência da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso as plantas medicinais que totalizaram 66 espécies¹³.

Considerando a necessidade de ampliação da oferta de fitoterápicos e de plantas medicinais que atenda à demanda e às necessidades locais, respeitando a legislação pertinente às necessidades do SUS é que o Ministério da Saúde instituiu oficialmente no SUS a Farmácia Viva, que existe na história do Brasil desde 1888, sob tradição hereditária do Prof. Dr. Francisco de Abreu Matos (*in memória*) e agora sob gestão estadual, municipal ou do Distrito Federal (Portaria nº 886 de 20 de abril de 2010), que no contexto da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, deverá realizar todas as etapas, desde o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos¹⁴.

Um aspecto a considerar na investigação farmacológica de plantas medicinais são para a seleção das espécies vegetais. A escolha com base no conhecimento popular (etnofarmacologia) traz vantagens em relação a outros métodos, de informações empíricas sobre aquela planta. Com isso, ela permite economia de tempo e dinheiro. Já a seleção com base na similaridade dos constituintes químicos ativos (quimiotaxonomia), encontrados em um dado gênero ou família torna-se interessante principalmente pela possibilidade de se encontrar novos protótipos ou novas estruturas químicas ativas^{15,16,17}.

O Brasil, por ser detentor de uma grande diversidade vegetal, possui um enorme potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (sejam fitoterápicos ou moléculas isoladas) a partir de suas plantas medicinais. O Brasil abriga cerca de 50 mil espécies de plantas superiores, distribuídas em grandes Biomas, como a Amazônia com 25-30 mil espécies, a Mata Atlântica com 16 mil, o Cerrado com 7 mil, e as demais espécies distribuídas na Caatinga e na Floresta Subtropical¹⁸.

Além da floresta Amazônica, bioma brasileiro com maior destaque nacional e internacional devido à diversidade biológica, e principalmente pela grande área territorial e reserva de água doce, o Cerrado e a Mata Atlântica destacam-se pela biodiversidade, e também, pelas imensas áreas de matas destruídas pelo avanço da ocupação humana e suas atividades exploratórias¹⁸.

A flora do Estado de Mato Grosso caracteriza-se por uma grande diversidade de espécies sendo formados pelas áreas biogeográficas do Cerrado, Pantanal, Amazônia e áreas de transição, sendo que a presença de árvores de médio e grande porte é uma das características mais significantes da região¹⁹.

1.1 CERRADO

O Cerrado é o segundo maior Bioma do Brasil, sendo superado em área apenas pela Amazônia. Ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km² cerca de 22% do território nacional (Figura 2) e apenas 1,5 % desta extensão está protegida por lei. “É considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica”¹⁹.

Cerca de metade dos 2 milhões de km² originais do Cerrado foram transformados em pastagens plantadas, culturas anuais e outros tipos de uso. As pastagens plantadas com gramíneas de origem africana cobrem atualmente uma área de 500.000km², ou seja, o equivalente à área da Espanha. Monoculturas são cultivadas em outros 100.000km², principalmente a soja. A área total para conservação é de cerca de 33.000km², claramente insuficiente quando comparada com os principais usos da terra no Cerrado.

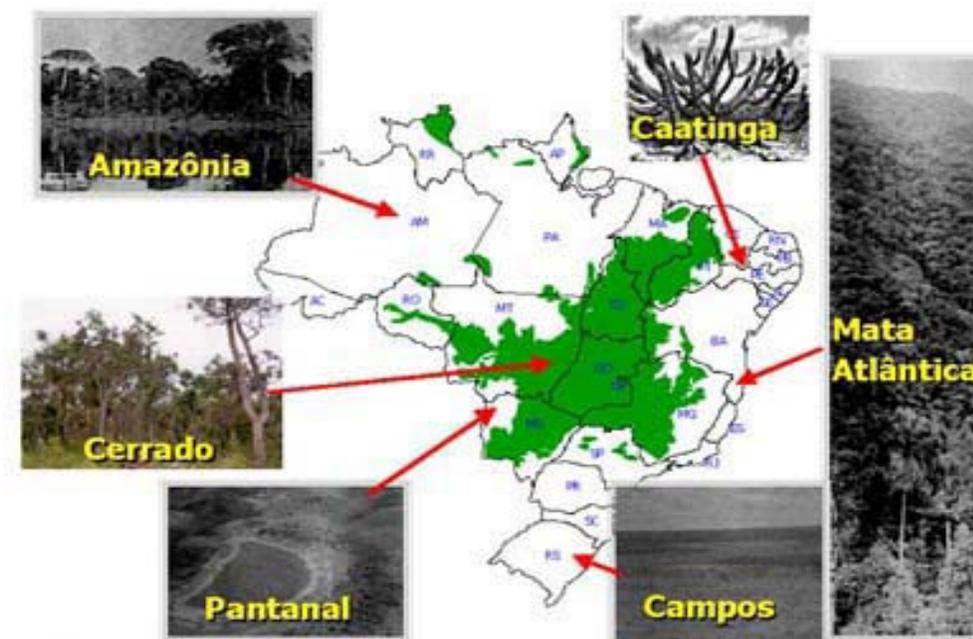


Figura 2. Biomas brasileiros, com destaque para o Cerrado (em verde). Fonte: IBAMA, 2009²⁰.

O clima caracteriza-se por duas estações bem definidas, uma seca (de maio a setembro) e outra chuvosa. São frequentes períodos de estiagem, denominados veranicos, no meio da estação chuvosa. A temperatura média apresenta pequena variação ao longo do ano, mas há uma amplitude diária de mais de 15 °C, com temperatura média anual variando de 21 a 27 °C²⁰.

A típica vegetação que ocorre no Cerrado possui seus troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas. Os estudos efetuados consideram que a vegetação nativa do Cerrado não apresenta essa característica pela falta de água – pois, ali se encontra uma grande e densa rede hídrica – mas sim, devido a outros fatores edáficos, como o desequilíbrio no teor de micronutrientes, a exemplo do alumínio²⁰.

Mato Grosso, localizado na região Centro-Oeste do país, é o estado que possui a maior área de Cerrado do Brasil com 422.125 km²²¹. O Cerrado mato-grossense é rico em espécies medicinais, mas muitas espécies são desconhecidas do ponto de vista científico e o extrativismo descontrolado vem reduzindo a diversidade de espécies vegetais desta região¹⁸.

Ainda há carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado, principalmente quando considerando à diversidade e à área ocupada. O desconhecimento de sua riqueza soma-se à estimativa de que 40% deste Bioma encontra-se em risco de extinção. Por isso, a importância de estudar as espécies vegetais deste Bioma, visa não somente conhecer e avaliar o perfil fitoquímico e farmacológico, mas também a sua preservação, sendo que tais recursos, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações¹⁹.

Apresenta um alto nível de endemismo nas plantas superiores, com cerca de 4 mil espécies (44%), sendo consideradas um hotpost para a conservação da biodiversidade mundial.

1.2 *SIMABA FERRUGINEA* ST. HIL

A *Simaba ferruginea*, é um sub arbusto tipicamente tropical, pertencente à família Simaroubaceae, a qual compreende 32 gêneros e cerca de 200 espécies²². O gênero *Simaba* apresenta 49 espécies distribuídas em todo o continente americano, com exceção da Argentina, Chile e Uruguai, verificando-se a maior ocorrência em território brasileiro²³.

Diversos gêneros da família Simaroubaceae são distinguidos pela quantidade de substâncias amargas, sendo os derivados quassinóides os mais relevantes. Provavelmente é a presença destas substâncias que conferem as propriedades farmacológicas atribuídas a estas plantas. A *Quassia amara* L, é o exemplo de espécie mais estudada desta família, a qual apresenta vários compostos com atividades para distúrbios gastrintestinais. As principais atividades biológicas atribuídas aos gêneros desta família são: antitumoral, antimalárica, amebicida, antiinflamatória, inseticida, herbicida, etc^{24,25,26}. Os constituintes químicos mais comumente encontrados nesse gênero são os quassinóides e alcalóides do tipo cantinona²⁷.

A *Simaba ferruginea*, popularmente conhecida como calunga ou fel da terra, com sinonímia científica de *Quassia ferruginea* D. Dietr., *Picrodendron calunga* Mart. Ex. Engl. e *Simaba hiensis* Moric, é uma arvoreta perenifolia, de 3 – 5 m de altura, pouco ramificada, nativa do Cerrado seco do Brasil Central, desde Pernambuco até Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. Folhas com 2 - 4 pares de folíolos, os quais são coriáceos, elípticos, ferrugíneo-pubescentes e nevados na face inferior, de 7 - 16 cm de comprimento; as flores são discretas, subsésseis, de cor amarela, dispostas em panículas terminais compostas e mais curtas que a folhagem. Os frutos são de cor marrom-esverdeados quando maduros²⁸. Apresentam na casca

do caule, no lenho, nas folhas e especialmente na raiz, substâncias muito amargas, empregadas na medicina popular²⁹ (Figura 3).



Figura 3 Rizoma e planta inteira de *Simaba ferruginea* St Hil (Fonte: Marcello, 2001)³³

Em Mato Grosso, sua casca tanto do tronco quanto do rizoma, é empregada pela população para o tratamento de dispepsia, febre, edema, cicatrização de feridas, úlceras gastro-duodenais, desinterias, dores reumáticas, machucaduras e obesidade, nas formas de maceração à frio em água ou por decoção e chás, sendo utilizada 1 colher de sopa 2 vezes ao dia^{30,31,32,33,28}.

A constituição química dos rizomas e folhas de *Simaba ferruginea* é distinta, prevalecendo nos rizomas compostos graxos e alcalóides, enquanto nas folhas, compostos fenólicos³⁴.

Do rizoma da *Simaba ferruginea* foram isolados os alcalóides cantin-6-ona (cantinona) e 4-metoxicantin-6-ona e das folhas β -sitosterol e quercetrina que são constituintes majoritários desta planta³⁴ (Figura 4).

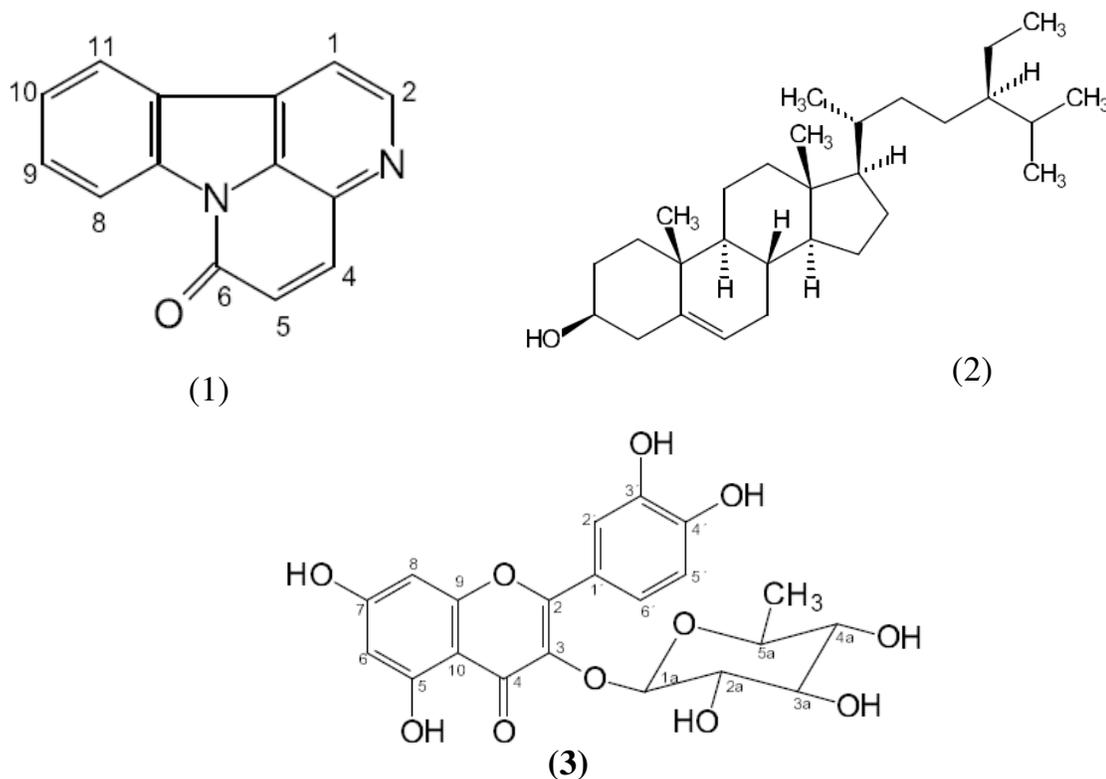


Figura 4 Estrutura química do alcalóide Cantinona (1) isolado do rizoma, β -sitosterol (2) e quercitrina (3) isolados das folhas de *S. ferruginea*. (Fonte: Noldin et al., 2005)³⁴

Estudos farmacológicos realizados por Marcello³³ com o extrato hidroetanólico de *Simaba ferruginea* (EHSf), demonstraram efeitos antiulcêrogenicos, baixa toxicidade aguda em camundongos, com DL50 de 1800 mg/Kg, e aparente ausência de toxicidade subcrônica em ratos tratados com dose de até 100 mg/Kg, exceto a redução dos níveis de fosfatase alcalina.

Em trabalho desenvolvido por Barros³⁵ o EHSf desta planta foi estudado quanto a seus efeitos na fertilidade, desempenho reprodutivo e desenvolvimento intra-uterino dos filhotes de ratas adultas da linhagem Wistar, sendo que os resultados encontrados sugerem interferência do extrato em todas as fases do desenvolvimento embrionário fetal, fazendo-se necessário novos trabalhos para elucidação destes dados.

Silva³⁶ avaliou a atividade hipolipidêmica de *Simaba ferruginea*, demonstrando seu efeito hipolipidêmico através dos modelos de Triton WR 1339 e hipertrigliceridemia induzida por etanol.

Noldin et al.,³⁴ em ensaios biomonitorados com o extrato metanólico de *S. feruuginea* (EMSf), frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) e compostos isolados como o alcalóide cantinona e o 4-metoxican-6-ona evidenciaram atividades antiulcerogênicas e antinociceptivas, sendo que o EMSf e o alcalóide cantinona apresentaram maior atividade antiulcerogênica.

Até o momento não foram realizados ensaios clínicos com a *S. ferruginea*.

II Fisiologia Gástrica

O trato gastrointestinal (TGI) é um dos sistemas do organismo de importância fundamental, considerando sua função de prover o mesmo de água, eletrólitos e alimentos³⁷.

Anatomicamente, o estômago divide-se em 3 porções: fundo, corpo e antro pilórico; sendo limitado por 2 sistemas esfinterianos: o esfíncter esofágico inferior, na parte superior ou proximal do estômago; e o esfíncter pilórico ou piloro, na parte inferior ou distal do estômago³⁸ (Figura 5).

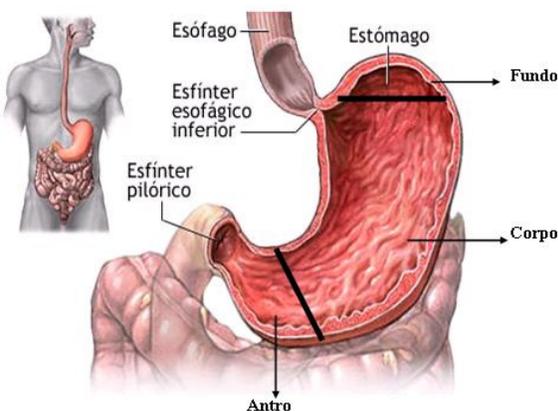


Figura 5 Principais subdivisões anatômicas do estômago (Fonte A.D.A.M.)³⁹

A estrutura do trato gastrintestinal varia ao longo do tubo digestivo, mas características comuns na organização geral do tecido se mantêm (Figura 6). A *mucosa* é a camada mais interna e consiste de um epitélio, da lâmina própria e da muscular da mucosa. A camada seguinte é a *submucosa*, onde em algumas regiões do trato gastrintestinal glândulas estão presentes. A seguir, temos a *muscular externa*, que tipicamente consiste de duas camadas de músculo liso: uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa. A

serosa ou adventícia, é a camada mais externa e consiste principalmente de tecido conectivo recoberto por células mesoteliais escamosas⁴⁰.

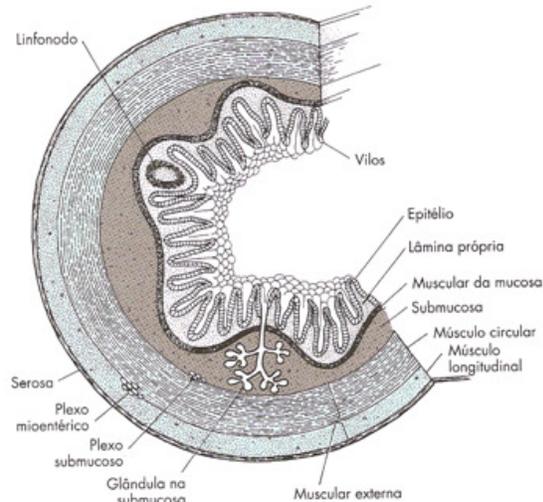


Figura 6 Organização geral das camadas do trato gastrintestinal (Fonte: KUTCHAI, 2004. Elsevier).⁴⁰

A submucosa contém uma rede densa de células nervosas, denominada *plexo submucoso* (plexo de Meissner). O *plexo mioentérico* (plexo de Auerbach) está localizado entre as camadas muscular circular e longitudinal. Estes plexos intramurais, conjuntamente com outros neurônios do trato gastrintestinal, formam o *sistema nervoso entérico*, responsável pela integração das atividades motoras e secretórias do sistema gastrintestinal⁴⁰.

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em duas regiões glandulares: a mucosa oxíntica e a mucosa antral. A mucosa oxíntica é mais extensa, ocupando o corpo e o fundo, e é o sítio da secreção de ácido clorídrico. A mucosa oxíntica é formada por glândulas oxínticas, que são constituídas por células parietais (ou oxínticas), células principais, células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL). No colo glandular, predominam as células produtoras de muco, que protegem a mucosa gástrica da ação corrosiva das secreções originadas pela glândula^{41,42}.

A unidade secretora da mucosa gástrica é a glândula gástrica

A estrutura de uma glândula gástrica na região glandular oxíntica é ilustrada na Figura 7. As células epiteliais superficiais estendem-se um pouco para dentro da abertura do duto.

Células mucosas, que secretam muco, estão localizadas no estreito pescoço da glândula. *Células parietais* ou oxínticas, que secretam ácido clorídrico (HCl) e o *fator intrínseco*, e as *células principais* ou pépticas que secretam o *pepsinogênio*, estão localizadas mais profundamente na glândula^{43,44,45,40}.

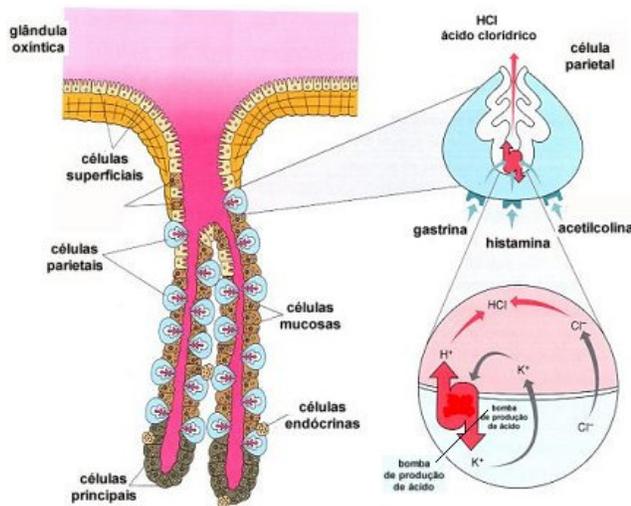


Figura 7. Estrutura de uma glândula gástrica (FONTE: Fisiologia Animal Comparada)⁴⁶

As células parietais são particularmente numerosas nas glândulas do fundo, enquanto as células secretoras de muco são mais numerosas nas glândulas pilóricas^{40,47,48}.

As funções do TGI dependem de propriedades inerentes à musculatura lisa intestinal, reflexos de neurônios intrínsecos no intestino e no sistema nervoso central (SNC), efeitos parácrinos de mediadores químicos e hormônios gastrointestinais⁴⁹. Porém, a maioria de suas funções é autônoma e controlada predominantemente pelo sistema nervoso entérico (SNE)⁵⁰.

O SNE está presente na parede do TGI, do esôfago até o ânus, e é formado por aproximadamente 100 milhões de neurônios, o equivalente ao total de neurônios presentes na medula espinhal. Está envolvido no controle da motilidade e secreção do TGI. Fibras extrínsecas do simpático e parassimpático são responsáveis pela conexão entre estes plexos³⁷.

As fibras parassimpáticas do trato gastrointestinal são pré-ganglionares e predominantemente colinérgicas. Essas fibras não agem diretamente sobre as células exócrinas e endócrinas do estômago. Os alvos desses neurônios pré-ganglionares colinérgicos são os neurônios intrínsecos que estão localizados nos gânglios do plexo mioentérico. Esses

neurônios intrínsecos é que inervam as células G, células D, células tipo enterocromafins e células parietais⁵¹ (Figura 8)

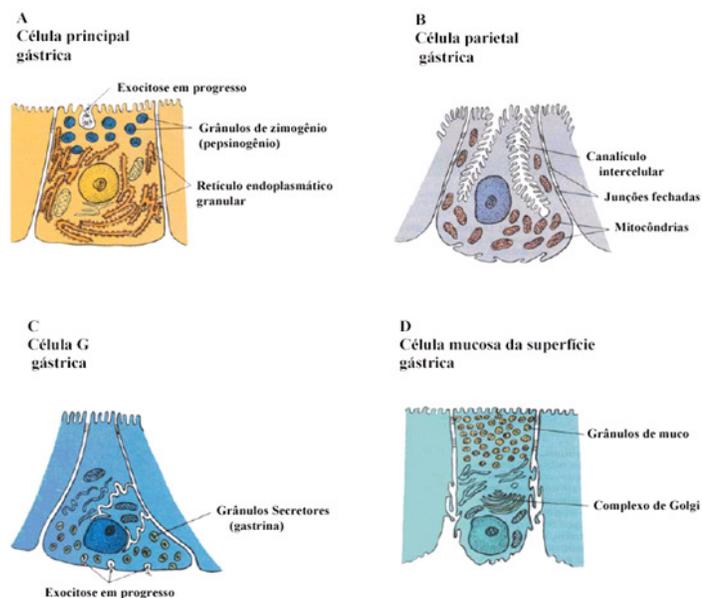


Figura 8. Células do Epitélio Gástrico. Célula principal (A) responsável pela secreção de pepsina e fator intrínseco; célula parietal (B) responsável pela secreção de HCl; célula G (C) responsável pela síntese e secreção de gastrina; e célula mucosa (D) responsável pela síntese e secreção de muco e bicarbonato (Fonte: SCHAUF)⁵²

O estômago é rico em células neuroendócrinas. Até o momento, se conhece seis células neuroendócrinas no estômago: *células G*, *células D*, *células tipo enterocromafins*, *células tipo A*, *células D₁/P* e *células enterocromafins*^{47,51}. As *células G* são encontradas apenas no antro (glândulas pilóricas)⁵¹ e secretam o hormônio *gastrina*^{40,47,48,51}. As *células tipo A* e as *células tipo enterocromafins* estão localizadas na mucosa oxíntica⁵¹ e secretam *grelina/obestatina* e *histamina*, respectivamente^{42,39,44,45}. As *células D* e *D₁/P* são encontradas tanto no antro como na mucosa oxíntica e secretam *somatostatina* e hormônios peptídicos desconhecidos, respectivamente^{47,51}.

2.1 SECREÇÃO GÁSTRICA

Uma das mais importantes funções do estômago é a produção e secreção do *suco gástrico*. O suco gástrico é uma mistura de secreções e entre os componentes mais

importantes estão o ácido clorídrico (HCl), sais, água, pepsina, fator intrínseco, muco e bicarbonato⁴⁰.

O HCl mata a maior parte dos microorganismos ingeridos, catalisa a clivagem dos pepsinogênios inativos em pepsinas ativas e confere ao ambiente um pH baixo necessário para a ação das pepsinas na digestão das proteínas e peptídeos^{40,51}. O fator intrínseco liga-se à vitamina B₁₂ e permite que ela seja absorvida pelo íleo. A secreção de muco e bicarbonato protege o estômago de danos mecânicos e químicos⁴⁰.

A secreção ácida é o aspecto mais importante da função gástrica estudada na prática médica. A regulação desta secreção ácida pelas células parietais é particularmente importante na úlcera péptica e, portanto, constitui um alvo específico para a ação de fármacos⁵¹.

A secreção ácida gástrica é um processo rigorosamente controlado pela ligação ligante-receptor na membrana basolateral e que culmina com a liberação de H⁺, Cl⁻ e H₂O através da membrana apical da célula parietal⁵³.

As células parietais são as principais células secretoras de ácido na mucosa gástrica. Esta secreção é regulada por mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico⁵⁴.

O sistema nervoso central é considerado o principal mecanismo responsável pelo início da secreção gástrica em resposta a uma antecipação do alimento através da liberação de acetilcolina pelos neurônios eferentes vagal.

A *acetilcolina* é liberada nas proximidades das células parietais pelos terminais nervosos colinérgicos após estímulos provenientes do olfato, visão, paladar, mastigação ou provenientes da distensão das paredes do estômago com a chegada do alimento. Atua sobre receptores muscarínicos do tipo M₃, elevando os níveis de Ca⁺² intracelular, estimulando a secreção ácida pela célula parietal^{40,51}.

A *histamina* é um dos principais mediadores fisiológico da secreção de HCl. É sintetizada e armazenada pelas células tipo enterocromafins que estão presentes na mucosa oxíntica. Quando estimuladas pela gastrina e/ou acetilcolina, as células tipo enterocromafins liberam histamina, que se difunde para as células parietais circunvizinhas estimulando a secreção de HCl. A histamina age via receptores H₂, que ativa a adenililato ciclase e aumenta

os níveis intracelulares de AMP cíclico. Este secretagogo é mais potente que a gastrina em estimular diretamente a célula parietal. Os bloqueadores dos receptores H_2 podem reduzir enormemente a resposta fisiológica aos níveis elevados de gastrina. Portanto, grande parte da resposta à gastrina resulta da liberação da histamina estimulada pela gastrina^{40,51}.

A gastrina é um hormônio produzido pelas células G na mucosa do antro gástrico e do duodeno, e atinge as células parietais via corrente sanguínea. Age estimulando os receptores CCK-B da célula parietal, elevando os níveis de Ca^{+2} intracelular (como a acetilcolina). Além disso, a gastrina tem importante efeito trófico, elevando o número e tamanho das células tipo enterocromafins, estimulando-as a liberarem histamina. A gastrina é liberada em resposta a produtos de digestão (tais como aminoácidos), além da estimulação vagal e da alcalinização do antro^{40,48,51}. Quando ocorre hipergastrinemia (produção excessiva de gastrina), a gastrina estimula a proliferação exagerada da mucosa, surgindo então a hiperplasia da mucosa gástrica (inclusive no número de células parietais e tipo enterocromafins) e/ou câncer gástrico⁴⁸.

A ligação da acetilcolina, histamina e gastrina com seus respectivos receptores acoplados a proteína G ativam segundos mensageiros. A ativação das vias que dependem do Ca^{+2} intracelular pela gastrina e acetilcolina e/ou de AMPc pela histamina, ativam a H^+ , K^+ -ATPase nas células parietais, resultando na secreção ácida estomacal⁵³.

Com relação aos mecanismos de transdução de sinais dos secretagogos, algumas vias de sinalização intracelular têm sido identificadas como importantes na ativação da célula parietal incluindo: proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), Ca^{+2} -calmodulina, trifosfato de inositol (IP3) e várias outras quinases⁵³. A estimulação da secreção ácida envolve tipicamente uma elevação inicial do Ca^{+2} intracelular e AMPc, seguida pela ativação da cascata de proteínas quinases que acionam a bomba de próton (H^+ , K^+ -ATPase) na célula parietal⁵³.

A bomba H^+ , K^+ -ATPase fica armazenada na forma inativa em vesículas citoplasmáticas na célula parietal⁵³. Após estímulo dos secretagogos, H^+ , K^+ -ATPase é translocada e inserida na membrana apical da célula parietal⁵⁵. O íon Cl^- é transportado ativamente do interior da célula parietal para o lúmen gástrico acompanhado de K^+ e, a seguir, é trocado pelo H^+ através da bomba de próton⁵⁵ (Figura 9).

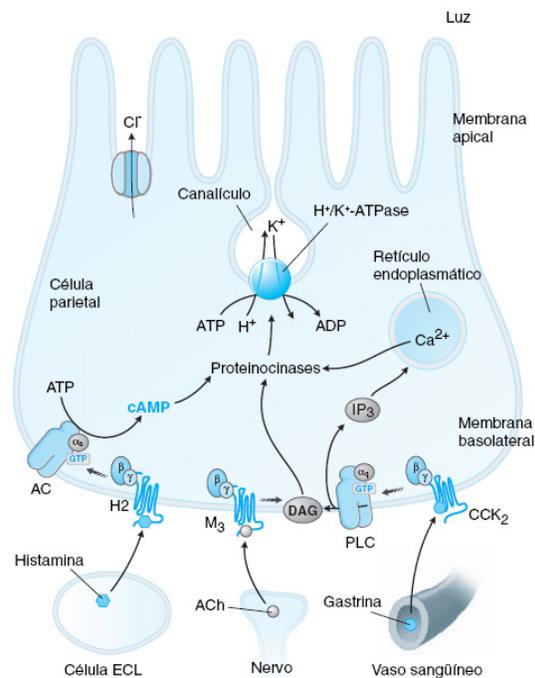


Figura 9 Controle da secreção gástrica pelas células parietais.(FONTE: Golan, 2009)⁵⁶

Três classes endógenas de fatores inibitórios regulam a secreção ácida: a somatostatina; o fator de crescimento epidermal e fator de crescimento transformante alfa (EGF/TGF α); e as PGs da série E e I⁵⁵. A *somatostatina* é o principal fator que exerce efeitos inibitórios indiretos sobre a secreção ácida⁵¹. No antro a somatostatina age sobre as células G, inibindo a secreção de gastrina, enquanto que no piloro a somatostatina afeta tanto as células tipo enterocromafins quanto as células parietais^{55,51}. A inibição da secreção ácida pelo EGF/TGF α ocorre dentro da célula parietal, através da modulação das tirosinas quinase intracelular⁵⁵. As prostaglandinas E₂ (PGE₂) exercem seu efeito de diversas maneiras, inibindo a liberação de histamina e suprimindo as vias de sinalização intracelular na célula parietal⁵⁵.

2.2 ÚLCERA PÉPTICA

A úlcera péptica pode ser definida como uma doença crônica caracterizada por áreas de escoriações na mucosa gástrica ou duodenal, com ou sem episódios hemorrágicos, causadas por um desequilíbrio entre fatores protetores endógenos (secreção de muco e bicarbonato, PGE₂, sulfridrilas, fluxo sanguíneo adequado, NO, etc.) e fatores agressores

(ácido clorídrico do suco gástrico, pepsina, espécies reativas de oxigênio (EROs), etc). Segundo Peckenpaugh⁵⁷, fatores como hábitos alimentares inadequados, uso contínuo de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), stress e a presença de *Helicobacter pylori* contribuem para esses desequilíbrios. (Figura 10)

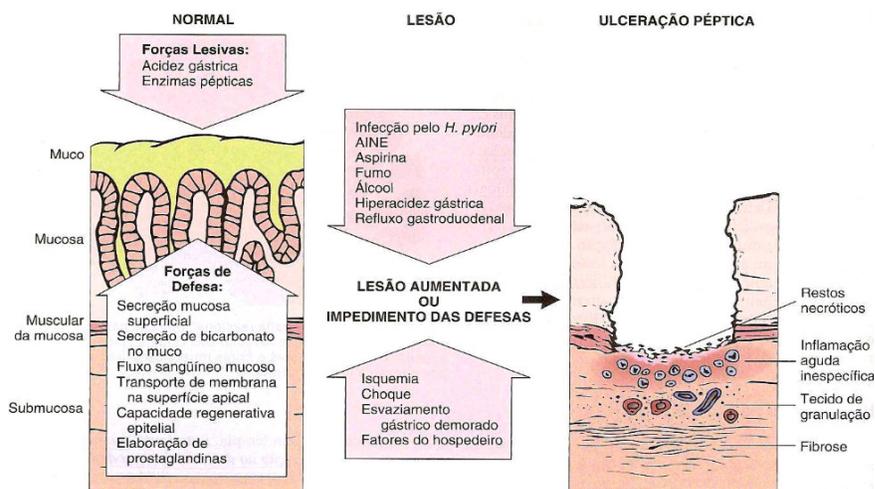


Figura 10. Mecanismo de defesa e injúria da mucosa gástrica (ROBBINS & COTRAN, 2005)⁵⁸.

Tanto as úlceras localizadas no estômago quanto as do duodeno são referidas como úlcera péptica. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno, onde 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%)⁵⁹.

A úlcera péptica é considerada um grande fator de morbidade, havendo alto índice de morte em casos extremos, como úlceras hemorrágicas promovidas por estresse⁶⁰. Na média populacional o risco de complicação com úlcera aumenta quatro vezes, resultando em 1,25 hospitalizações adicionais para cada 100 pacientes por ano. É uma doença crônica e recorrente que acomete aproximadamente 10% da população mundial⁶¹.

Sua incidência é ligeiramente maior nos homens em relação às mulheres (1,3:1) e, apesar de ocorrerem em qualquer idade, a úlcera duodenal ocorre com mais freqüência na faixa de 30-55 anos, enquanto a úlcera gástrica na faixa de 50- 70 anos⁵⁹.

Os sintomas típicos da úlcera péptica são: dor epigástrica em queimação, dor após duas ou cinco horas após as refeições ou com o estômago vazio; dor noturna pela ingestão de alimento, antiácidos ou agentes antissecretores⁶². Sintomas menos comuns incluem indigestão, vômito, falta de apetite, intolerância a alimentos gordurosos, sensação de queimação cardíaca e história familiar⁶².

Diversos medicamentos têm sido empregados para o tratamento das úlceras gastrintestinais, resultando em menores taxas de mortalidade e morbidade desta doença. Contudo, tais tratamentos não são completamente efetivos e produzem vários efeitos adversos⁶³.

2.3 FATORES PROTETORES DA MUCOSA GÁSTRICA

O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem ser os antiinflamatórios não esteroidais, álcool, alimentos em várias temperaturas, infecções por *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas à isquemia/reperfusão e fatores endógenos como a produção fisiológica de ácido gástrico ou alterações de mucosa provocadas por estresse. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção (pré-epitelial, epitelial e subepitelial)⁶⁴ (Figura 11).

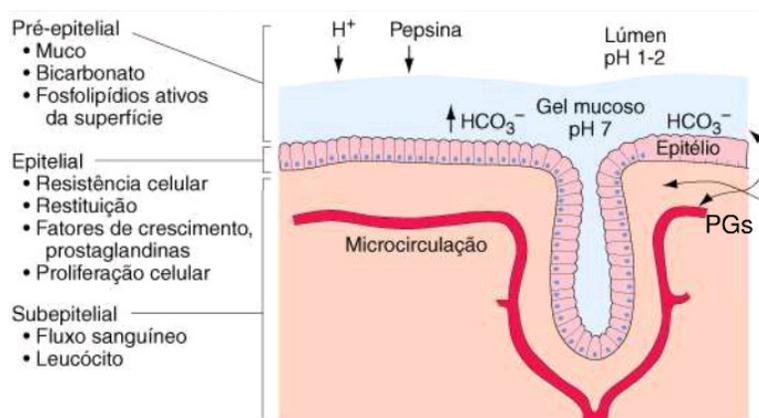


Figura 11. Mecanismo de defesa da mucosa gástrica (Fonte: ROBBINS & COTRAN, 2005)⁵⁸

2.3.1 PROTEÇÃO PRÉ-EPITELIAL

* Muco/bicarbonato

O epitélio gástrico é coberto por uma camada aderente e contínua de muco gelatinoso e visco-elástico, que promove uma barreira física entre o lúmen gástrico e a superfície das células apicais. Um gradiente de pH é formado, com um pH consideravelmente maior na superfície das células apicais que na solução contida no lúmen gástrico. Assim, a difusão de macromoléculas do lúmen para a superfície epitelial, incluindo as pesinas, é prevenida ou restrita⁶⁵.

O muco gástrico ocorre em 3 formas:

- * Mucina solúvel presente no suco gástrico;
- * Muco (aderente) insolúvel cobrindo as células da mucosa;
- * Muco presente nas células secretoras de muco, dispostas entre as células apicais⁶⁶.

A infecção por *H. pylori* e o uso de AINES inibem a síntese e secreção de mucina e há queda da densidade/espessura da camada de muco. Por isso, em muitos estudos, a densidade da camada de muco está sendo correlacionada com a proteção da mucosa⁶⁷.

No estômago, o aumento da secreção de bicarbonato (HCO_3) é regulado pela prostaglandina E_2 (PGE_2) através da interação com receptores EP1 ⁶⁸, óxido nítrico (NO) e neurônio aferentes sensíveis a capsaicina, e regulada pelo ácido luminal⁶⁹. Para cada próton secretado pela célula parietal, um íon bicarbonato é liberado de sua membrana basolateral por capilaridade, até a superfície do epitélio gástrico. Este transporte de HCO_3 , durante a secreção ácida é provavelmente importante para a manutenção de um pH neutro na superfície epitelial, enquanto que o pH luminal é baixo⁶⁷.

2.3.2 PROTEÇÃO EPITELIAL

As células epiteliais gástricas têm propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica⁷⁰.

As *junções fechadas* e outras *barreiras intercelulares* controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica. Agentes que conseguem atravessar estas junções ainda são contidos pela membrana celular das células gástricas através da *hidrofobicidade* devido elevada concentração de fosfolipídios que restringem a difusão de moléculas hidrofílicas, como o íon H^{+} ^{71,65}.

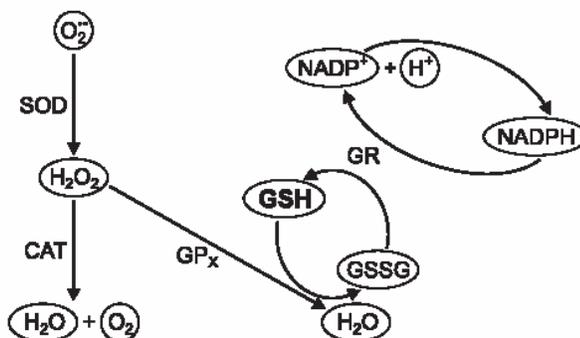
Quando esse equilíbrio se rompe, quer por aumento na produção de radicais livres, quer por redução nos mecanismos antioxidantes, inicia-se um processo de *estresse oxidativo* que pode resultar em lesões⁷². Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. EROs é uma expressão que inclui radicais de oxigênio, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH), peroxila (RO_2) e hidroperoxila (HO_2) e outros agentes oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3), porém podem ser convertidos fácil e rapidamente em radicais⁷³.

As EROs geradas durante o metabolismo do ácido araquidônico, por macrófagos e por células musculares lisas podem contribuir para os danos na mucosa gástrica⁷⁴. Durante a ulcerogênese ocorre ativação da superóxido dismutase (SOD), diminuição da atividade das peroxidases, com geração de OH^{\bullet} e acúmulo de H_2O_2 , resultando em aumento da lipoperoxidação (LPO) na mucosa gástrica e formação de radicais lipídicos. Os radicais lipídicos, por sua vez, agem como propagadores de danos oxidativos, levando a uma diminuição dos níveis de glutatona (GSH) e desestruturação de grupamentos sulfidrila não protéicos (NP-SH).^{75,76}

O trato gastrointestinal também tem a capacidade de produzir grandes quantidades de EROs pelas oxidases de mucosa como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase, encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria⁷⁷. Além disto, vários fatores podem acarretar o aumento da produção de EROs como, por exemplo, o processo inflamatório e consequente recrutamento de neutrófilos por

citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 8 (IL8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)^{64,78}.

Em geral, o ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células impede os danos causados pelos radicais livres. Este ambiente redox é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, como a SOD, catalase (CAT) e GSH. (Figura 12)



SOD - superóxido dismutase, CAT- catalase, GPX – Glutathione peroxidase, GR Glutathione reductase, GSH- Glutathione reduzida, GSSG - Glutathione oxidada, NADP+ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

Figura 12 Resumo da formação das espécies reativas de oxigênio no organismo e ações das enzimas antioxidantes. (FONTE: KWIECIEN et al., 2002)⁷⁹

ROBERT et al.⁸⁰ foi o primeiro a descrever a habilidade das prostaglandinas em reduzir as lesões gástricas induzidas por diversos irritantes tópicos, fenômeno descrito como *citoproteção*. A citoproteção gástrica parece envolver principalmente dois mediadores endógenos, as prostaglandina (PGs) e as sulfidrilas na mucosa^{80,81}.

As PGs são derivados de ácidos graxos compostos por 20 carbonos, são encontradas em todos os tecidos e órgãos e estão envolvidas em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas. São sintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA), através das enzimas ciclooxigenases (COX). As PGs derivadas do ácido araquidônico são denominadas de série-2, e consistem a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina F₂ (PGF₂) e tromboxano A₂ (TXA₂). As PG são liberadas da célula imediatamente após a síntese e vão exercer suas funções biológicas através da interação com receptores prostanóides presentes nas superfícies das células de maneira autócrina e parácrina⁸².

As PGs endógenas (principalmente PGE₂) mantêm a integridade da mucosa principalmente por estimular a produção de muco e HCO₃⁻ no estômago e duodeno⁸³, mas também por manter o fluxo sanguíneo, aumentar a resistências das células epiteliais a injúria induzida por citotoxinas⁸⁴ e suprimir o recrutamento de leucócitos para a mucosa⁷⁸. As PGs também regulam a liberação de diversos outros mediadores inflamatórios que possivelmente contribuem para a injúria da mucosa gástrica em certas circunstâncias⁷⁸. Por exemplo, PGE₂ tem mostrado ser um potente inibidor da liberação do *fator de necrose tumoral-alfa* (TNF- α) e interleucina-1beta (IL-1 β) de macrófagos; e da liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e IL-8 de neutrófilos⁷⁸.

2.3.3 PROTEÇÃO SUB-EPITELIAL

Um dos mais importantes componentes de defesa da mucosa é a resposta da circulação sanguínea a agentes irritantes. Quando ácidos ou outros irritantes entram na camada subepitelial, neurônios aferentes sensoriais medeiam um rápido aumento no fluxo sanguíneo da mucosa, permitindo a rápida remoção das substâncias tóxicas, limitando a penetração em camadas mais profundas da mucosa⁸⁴.

O suprimento de sangue oxigenado para a mucosa gástrica é um fator importante, determinante para a integridade da mucosa gástrica. A elevação do fluxo sanguíneo é importante para a proteção da mucosa gástrica, quando a barreira protetora mucosa do estômago é rompida e ocorre retrodifusão de H⁺ para as células da mucosa⁸⁵. Todos os mecanismos de defesa e reparo dependem de um suporte eficiente de fluxo sanguíneo.

Lesões na mucosa do TGI são frequentemente associados com distúrbios na microcirculação. Danos promovidos pelo etanol envolvem a degranulação de mastócitos, que liberam mediadores com ações adversas variadas. A degranulação de mastócitos e a liberação de fator ativador de plaquetas (PAF) são também responsáveis pelo efeito do *H. pylori* em reduzir o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, em ratos⁸⁶.

Os distúrbios microcirculatórios que acompanham os danos na mucosa podem estar relacionados a um desequilíbrio nos mensageiros endoteliais vasculares, como a endotelina-1, NO, e prostaciclina (PGI₂). O mediador endotelial PGI₂ é liberado durante o estresse de imersão na água e contraria a vasoconstrição induzida pelo estresse, aumentando a

permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos. A PGE_2 dilata ambas, arteríolas e vênulas, na submucosa gástrica de ratos, via ação do receptor EP_2 , enquanto que a constrição venular é feita pelos receptores EP_3 ⁸⁶.

Esta microcirculação pode ser modulada por muitas substâncias endógenas como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), PGs e NO. Um dos mais importantes componentes de defesa da mucosa é a resposta hiperêmica a irritantes no lúmen^{80,77}. CGRP e NO são componentes essenciais desta resposta hiperêmica na mucosa^{87,84}.

A potente ação vasoconstritora da endotelina tem probabilidade de estar envolvida na patogênese de várias condições caracterizadas pelo espasmo vascular. A infusão de endotelina-1, na artéria gástrica ou na submucosa gástrica, induz erosões na mucosa de ratos, enquanto que a infusão intravenosa aumenta os danos induzidos pela instilação intra-gástrica de etanol ou ácido. Existem relatos de que as lesões na mucosa gástrica induzidas pela endotelina-1 são suprimidas pela prostaciclina ou antagonistas do PAF, indicando que, junto com as propriedades vasoconstritoras, vários outros fatores estão envolvidos no mecanismo de lesão da mucosa⁸⁸.

Outro mecanismo protetor sub-epitelial é o NO, sua biossíntese compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo. O NO é formado a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, sob a ação catalítica da enzima sintase do óxido nítrico, gerando concentrações equimolares de L-citrulina^{89,90}. O processo de formação do NO está ilustrado na Figura 13.

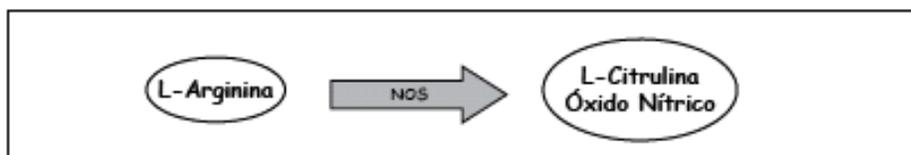


Figura 13 - Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir o metabolismo da Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase (adaptado de LEHNINGER, 2002)⁹⁰.

Para que a síntese do NO se realize é necessário que uma enzima seja ativada, desencadeando todo o processo de sua formação. Assim, a síntese de NO ocorre somente a partir da ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que existe em duas isoformas: a isoforma constitutiva e a induzível^{91,90}.

As isoformas constitutivas (cNOS) são originalmente encontradas no endotélio e nos neurônios, sendo então denominadas de eNOS (NOS endotelial) e nNOS (NOS neuronal), respectivamente. A isoforma nNOS, comumente chamada de isoforma I ou de bNOS (brain NOS), é encontrada no cérebro, na medula espinhal, nos gânglios simpáticos, em glândulas adrenais, nos neurônios nitrérgicos e em outras estruturas como células epiteliais de pulmões, útero e estômago, células da mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e do músculo esquelético⁸⁹. A isoforma eNOS, também chamada de isoforma III, está ligada à membrana das células endoteliais, regulando o tônus da célula muscular lisa vascular, bem como a adesão e agregação plaquetária. A eNOS também pode ser encontrada em sinciciotroblastos, células epiteliais tubulares do rim, células intersticiais do cólon e hipocampo. Ambas as isoformas encontram-se presentes nas células e são estimuladas por uma cascata bioquímica que pode ser dependente ou independente de íons cálcio (Ca^{2+}). As duas enzimas expressas constitutivamente (nNOS e cNOS) são isoformas cálcio-dependente, enquanto a forma induzida (iNOS) é cálcio-independente⁷⁸. Em humanos e, presumivelmente, na maioria das outras espécies, essas isoformas são codificadas por três diferentes genes localizados em três cromossomos distintos⁹².

A isoforma induzível (iNOS) é ativada a partir de alguns estímulos patológicos, como, por exemplo, lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), incluindo a interleucina-1, endotoxinas e fator de necrose tumoral, e são independentes de íons Ca^{2+} . Essa isoforma pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares incluindo macrófagos, como as células de Kupffer, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos e células epiteliais. Uma das grandes diferenças entre a NOS constitutiva e a induzível é que a iNOS é capaz de liberar grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos, podendo gerar alguns efeitos exagerados, produzindo respostas tóxicas ao organismo, enquanto que a cNOS produz pequenas quantidades de NO e por tempo menor^{92,93}. Apesar de existirem diferenças entre as isoformas de NOS, todas elas atuam no sentido de catalisar a oxidação do átomo de nitrogênio terminal do grupamento guanidino a L-arginina, formando quantidades equimolares de NO e L-citrulina^{91,90}. (Figura 13).

A ativação da NOS e a consequente síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos que podem ser químicos ou físicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógenos/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais, como, por exemplo, a acetilcolina, o ATP, e a bradicinina. A interação

agonista-receptor, na célula endotelial, promove a formação de trifosfato de inositol (IP3) que, por sua vez, induz a liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático, eleva os níveis de Ca^{2+} intracelular, formando o complexo cálcio-camodulina ativando a enzima NOS que irá atuar na L-arginina, gerando a formação do NO pelo endotélio^{92,94}.

NO foi descrito como um regulador da secreção do ácido gástrico e modulação da integridade da mucosa gástrica, juntamente com prostaglandinas endógenas⁹⁵.

É evidenciado na literatura o efeito protetor ou prejudicial do NO na patofisiologia da gastroproteção⁹⁶. Embora a produção de NO pela cNOS seja importante na manutenção da integridade da mucosa, recentes estudos demonstram que o NO atua de maneira bifásica na resposta ulcerogênica da mucosa gastrointestinal, dependendo da isoforma da NOS. Ou seja, o NO produzido pela cNOS apresentaria em efeito protetor, e o NO originário da iNOS teria um efeito pró-ulcerogênico⁹⁷.

O NO é importante no controle da secreção ácida e alcalina, no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e na secreção de muco gástrico⁹⁸. O estudo de SUGAMOTO e colaboradores,⁹⁹ demonstrou que a ação do NO na secreção de HCO_3^- - induzida por ácido, pelo menos parcialmente, é devido o estímulo realizado pela ação das PG.

Não há dúvidas de que o NO é um importante mediador da defesa da mucosa gastrintestinal, pois todos os componentes envolvidos na proteção gastrintestinal podem ser modulados pelo NO, e a supressão da síntese de NO resulta num marcante aumento da susceptibilidade do trato gastrintestinal à injúria^{100,87}.

2.3.4 SISTEMA IMUNE DA MUCOSA GÁSTRICA

Quando os níveis superficiais de defesa da mucosa falham, ou são transpostos por fatores agressores, o próximo nível de defesa da mucosa ativado é a resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos são recrutados da circulação para o local de ação para facilitar a cicatrização e reduzir a entrada de microorganismos na circulação sistêmica⁸⁴.

A liberação de fatores quimiotáticos (LTB_4 , PAF) dos imunócitos da mucosa, como mastócitos e macrófagos, é sinal para o extravasamento de neutrófilos com migração para o sítio da lesão⁸⁴.

Há várias maneiras nas quais aderências de neutrófilos ao endotélio vascular contribui para a formação de úlceras gastroduodenais. A aderência de neutrófilos ao endotélio vascular é acompanhada por liberação de proteases e EROs. Estas substâncias medeiam vários danos provocados na mucosa gástrica por agentes irritantes, como os antiinflamatórios não esteroidais⁸⁴.

Outro mecanismo de defesa são as interleucinas IL4 e IL10, que são citocinas anti-inflamatórias que tem importante papel no controle de recrutamento de neutrófilos e das células inflamatórias crônicas mononucleadas, rementendo à possibilidade de estarem envolvidas na úlcera crônica por *H. pylori*, o que merece investigação¹⁰¹.

2.4 FATORES AGRESSORES DA MUCOSA GASTRINTESTINAL

Uso de álcool, Antiinflamatório não esteroidal (AINES), cigarros, trauma, sepse, *H. pylori* e estresse, contribuem para a formação de úlcera gástrica^{102,103,104,105}.

Pacientes com doenças relacionadas ao álcool possui um importante papel na medicina clínica, onde aproximadamente 29% dos homens e 9% das mulheres são hospitalizados devido a doenças relacionadas ao álcool, afetando os órgãos internos¹⁰⁶.

O álcool é conhecido como uma substância necrosante que causa injúria na mucosa gástrica, e a ingestão excessiva de etanol pode resultar em gastrite, caracterizada por edema na mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias¹⁰⁷.

Desta maneira, as doenças do trato gastrointestinal, relacionadas ao consumo excessivo de álcool, possuem um importante papel na gastroenterologia clínica. Modelos de animais representam uma ferramenta importante para se investigar as doenças relacionadas ao álcool porque dão aos pesquisadores a oportunidade de usar métodos que não podem ser usados em seres humanos, tais como a tecnologia nocaute¹⁰⁸. Assim, a lesão gástrica induzida por álcool é frequentemente usada como modelo experimental para selecionar compostos com atividade gastroproterora.

No estômago o álcool interfere na secreção de ácido gástrico, um efeito possivelmente mediado pela histamina e gastrina. A barreira da mucosa é a principal proteção da mucosa

gástrica contra o ácido gástrico e o etanol em altas concentrações aumenta a permeabilidade epitelial como consequência de mudanças no potencial celular, causando re-difusão de íons H^{+109} . Nesse órgão também causa depleção dos grupos sulfidrilas, que são necessários para estabilização das membranas celulares, bem como na eliminação de radicais livres. Ainda no estômago, o etanol influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, provocando estase gástrica, congestão capilar e aumento da permeabilidade vascular, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações, associados às injúrias macroscópicas e histológicas na mucosa^{110,111,112}. A congestão capilar é quase sempre acompanhada de estase circulatória que não está associada somente com a constrição de vênulas na submucosa, mas também com a dilatação de arteríolas na submucosa^{113,114}.

Como consequência dos danos aos microvasos, o álcool promove a liberação de mediadores inflamatórios e vasoconstrição de artérias na submucosa, podendo resultar em isquemia, além de promover também, a liberação de endotelina e degranulação de mastócitos. Alguns produtos do metabolismo do ácido araquidônico têm sido implicados na patogênese da injúria gástrica causada por etanol^{115,116}.

O etanol também causa depleção de muco, possivelmente por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago, contribuindo assim, para a formação de úlceras^{117,118}. A liberação de muco em resposta a aplicação de agentes irritantes possui um papel importante no reparo do epitélio e no processo de restituição.

Com base nos conhecimentos produzidos, SIEGMUND et al¹⁰⁸ propôs um esquema para representar os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica (Figura 14).

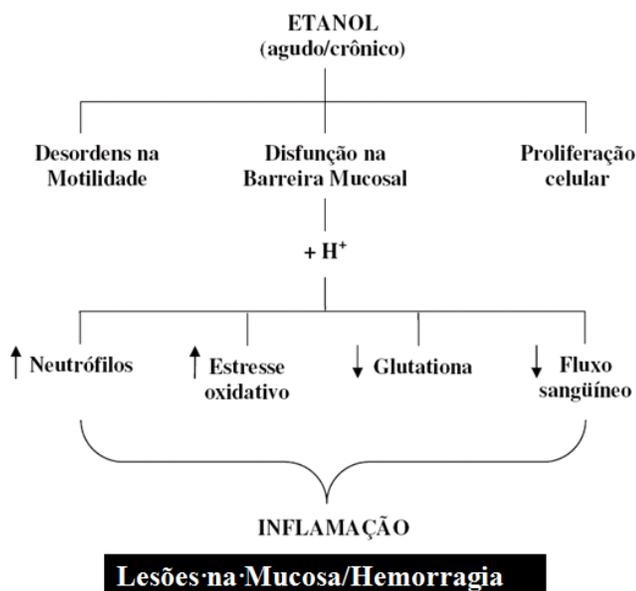


Figura 14 Esquema representativo dos efeitos do consumo agudo e crônico de etanol no estômago (Fonte: SIEGMUND et al., 2002)¹⁰⁸

Preparações antiinflamatórias têm sido usadas por milênios, mas seu mecanismo de ação foi elucidado há menos de 40 anos¹¹⁹. Os AINES são geralmente considerados seguros, contudo, seu uso tem provocado problemas de toxicidade no trato gastrointestinal de indivíduos que fazem uso de forma crônica¹¹⁹.

As PGs são mediadores importantes na manutenção da integridade da mucosa gástrica. Os AINES reduzem a produção dessas PGs por inibirem a COX-1 e COX-2 na mucosa gástrica e por provocar um relativo aumento no conteúdo de leucotrienos (LTs)¹²⁰. É bem estabelecido que o uso de AINES aumenta o desenvolvimento de lesões pépticas (erosão, inflamação e ulceração) no trato gastrointestinal em humanos e ratos^{121,122,123,124}, aumentando o risco de sérias complicações como hemorragia^{121,123,124}.

A susceptibilidade a injúria gástrica pelos AINES deve-se a vários mecanismos:

1) significativa diminuição da biossíntese de PGs e a supressão da atividade tanto da COX-1 quanto da COX-2^{123,124,125} reduzindo outros vários fatores envolvidos nos sistema de defesa da mucosa gástrica e exarcebando o efeito lesivo dos LTs^{123,125};

2) redução da regeneração celular e inibição da contração da úlcera¹²⁴;

3) diminuição do fluxo sanguíneo na margem da úlcera¹²⁴.

A Indometacina (IND), um representante dos AINES, causa úlceras gástricas através de vários processos, incluindo geração de EROs, o início da peroxidação lipídica, infiltração de leucócitos, a indução de apoptose e inibição da síntese de prostaglandinas¹²⁶. A diminuição de prostaglandina prejudica quase todos os aspectos da gastroproteção e aumenta a secreção de ácido que por sua vez, agravam a úlcera¹²⁷. Além de prostaglandinas, um segundo sistema defensivo da mucosa gástrica é via NO/L-arginina^{128,129}. NO regula a secreção de ácido gástrico e modula a integridade da mucosa gástrica, juntamente com prostaglandinas endógenas^{130,131,95}. Em modelos animais de úlcera gástrica, utilizando o L-name que é um inibidor do NOS¹³², a administração de um precursor do NO, L-arginina, protege contra úlceras gástricas induzidas por um mecanismo independente da modulação da secreção de ácido ou atividade da pepsina, mas através de manutenção de NO na mucosa^{128,131}.

Além disso, um dos maiores distúrbios durante tratamento com AINES é a geração de altos níveis de radicais livres em consequência da depleção de GSH na mucosa gástrica¹²³.

Desta maneira, a manutenção adequada dos mecanismos antioxidantes tem um papel crítico na prevenção dos eventos relacionados ao uso de AINES¹²³.

O uso de AINES e a Infecção por *H. pylori* são as principais causas de úlcera péptica^{124,62}. Porém outras infecções e co-morbidades estão associadas a úlcera péptica, aumentando o risco dessa doença, como por exemplo, o citomegalovírus, tuberculose, doença de Crohn, cirrose hepática, falência renal crônica, sarcoidose e desordens mieloproliferativas⁶².

A descoberta de uma bactéria espiralada no estômago em 1983 por B.J.Marshall e R.J.Warren foi o maior avanço na fisiopatologia da gastrite e úlcera péptica^{123,133}. Inicialmente denominado *Campylobacter pylori*, esta bactéria foi adequadamente identificada como *H. pylori*¹³³.

É uma bactéria Gram-negativa, que não forma esporos, possui flagelo polar e que cresce em ambiente micro-aerófilo¹³⁴. Se multiplica num pH de 6,0-8,0, com crescimento ótimo em pH 7,0¹³⁵. Este nível ótimo de pH é devido à urease, produzida em altas concentrações por este microorganismo, que catalisa a formação de amônia (NH₃) a partir da ureia do suco gástrico¹³⁵.

A ocorrência da infecção gástrica por *H. pylori* é alta no mundo inteiro e atinge 40 % e 80 % nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Apesar das numerosas pesquisas, o seu modo de transmissão na população permanece desconhecido. Existem relatos que ambas vias de transmissão, oral-oral e oral-fecal, ocorre em humanos. O homem parece ser o principal reservatório do agente infeccioso¹³⁶.

O *H. pylori* apresenta como fatores de virulência os fatores de colonização gástrica: os flagelos, a enzima urease e fatores de adesão (codificados pelos genes *babA* e *babB*); e os fatores lesivos a mucosa: produtos da urease, lipopolissacarídeos, quimiocinas, citocinas (*cagA* e *vagA*), proteínas pró-inflamatórias, proteínas do choque térmico (“heat shock protein” - HspA e HspB), proteases que hidrolisam proteínas do muco, e produção de NO que promove lesões nas células do hospedeiro¹³⁷.

O gene *cagA* (*citotoxin antigen associated*), marcador de CagPAI (ilhas de patogenicidade Cag), está fortemente associado ao risco para desenvolvimento de câncer. Cepas CagA+ induzem níveis mais altos de expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-8, e elevam em 3 vezes a probabilidade de desenvolvimento do câncer gástrico¹³⁸, desta maneira o *H. pylori* é a primeira bactéria a ser classificada como grupo I cancerígeno pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer^{138,139}.

O gene *vacA* está relacionado à capacidade de sobrevivência da bactéria no ambiente inóspito da acidez gástrica. Possui também papel importante na capacidade de aderência da bactéria à mucosa gástrica e de penetração no lúmen do estômago. O fator chave para esse processo de adaptação do *H. pylori* às condições gástricas é a presença da enzima urease que promove a hidrólise da uréia presente no suco gástrico produzindo amônia, molécula acceptora de íons H⁺, que gera um pH neutro no interior da bactéria, possibilitando assim sua sobrevivência. Tombola et al.¹⁴⁰ demonstram que o gene *vacA* se comporta como um redutor de pH transportando passivamente a uréia e otimizando a atividade da urease. Pode-se dizer que o gene *vacA* confere infectividade à bactéria. A presença de urease é um dos métodos utilizados para diagnóstico da infecção por *H. pylori*.

Na ausência de erradicação do *H. pylori*, a infecção tende ter vida longa e a resposta imune é inefetiva no combate ao agente. Na maioria dos casos de infecção natural, a resposta imune do hospedeiro direciona para inflamação crônica, promovendo atrofia e neoplasia da

mucosa. Com a erradicação do organismo infeccioso a inflamação tende a resolução, o que, em muitos casos, pode resultar na redução do risco de atrofia e câncer gástrico¹⁴¹.

Os danos na mucosa gástrica proporcionado pelo *H. pylori* são resultado da sua capacidade de chegar até as células da mucosa gástrica e promover danos, acompanhados pelo aumento da expressão e liberação de citocinas pró inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ e MIP-1 α ¹⁴². Esta ação afeta a secreção ácida gástrica e altera a taxa gastrina-somatostatina, assim como a atividade secretora das células mucosas, produtoras de muco/bicarbonato, e a qualidade de aderência da camada de muco, resultando na gastrite aguda e, posteriormente, crônica¹⁴³. A indução pelo *H.pylori* de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento é mediado pelas vias de sinalização das quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) e do fator nuclear de transcrição K - B¹⁴¹.

JUNG et al.¹⁴⁴ mostrou que a gastrite induzida pela infecção por *H. pylori* em humanos deve-se em parte pela produção de EROs, redução de GSH e pela peroxidação lipídica. O grande conteúdo de EROs estimulado por essa bactéria promove um intenso infiltrado de células inflamatórias e indução de mais citocinas^{124,145}. Pacientes com úlcera duodenal, câncer gástrico e gastrite infectados pelo *H. pylori* têm uma produção aumentada e patogênica de iNOS, enzima que provoca uma série de estímulos inflamatórios e que contribui para o estresse oxidativo¹³⁸. A infecção por *H. pylori* parece interferir também com a expressão e liberação de grelina da mucosa, um peptídeo gastroprotetor conhecido por estimular o apetite e crescimento de crianças¹³³.

A infecção por *H. pylori* afeta fortemente a secreção ácida gástrica, alterando a proporção gastrina/somatostatina, destruindo a camada de muco/bicarbonato e alterando a qualidade aderente deste muco/gel, resultando numa gastrite aguda ou crônica e ulcerações¹³³.

2.5 TERAPÊUTICA ATUAL E PERSPECTIVAS

As soluções terapêuticas, durante séculos, foram sempre a de neutralizar o conteúdo gástrico de ácido clorídrico utilizando antiácidos, dieta alimentar ou cirurgia. Tal panorama só foi modificado no início dos anos 70 onde os receptores de histamina H2 foram definidos através da utilização de antagonistas seletivos como a cimetidina e ranitidina^{146,147}. Esses fármacos causaram um grande impacto mundial, o que levou Kurata e colaboradores¹⁴² a escrever um artigo na Science intitulado “What in the world is happening to ulcers?”. O artigo

descreve essa modificação no panorama do tratamento de úlcera péptica, com uma diminuição expressiva no número de cirurgias.

Algum tempo depois, foram desenvolvidos fármacos citoprotetores, como o misoprostol, um análogo da PGE₂, e extensas revisões sobre elas têm sido feitas. A prostaglandina no estômago inibe a secreção ácida, enquanto estimula a secreção de muco e bicarbonato¹⁴⁸.

Outros fármacos gastroprotetores foram introduzidos como os inibidores da bomba protônica ou H⁺, K⁺ ATPase, responsável pela secreção ácida gástrica. A substância padrão foi o omeprazol, que é capaz de inibir a secreção ácida por inativação da bomba através da formação de ligações dissulfeto entre as moléculas reagentes do omeprazol com a enzima^{149,135,150}. Na mesma época foi descrita a ação da pirenzepina, um anticolinérgico muscarínico M1 seletivo, que também contribuiu para o tratamento da úlcera péptica nesta década¹⁵¹.

Assim, o tratamento das dispepsias até o final da década de 80 se limitou ao uso individual ou em associações de antiácidos, anticolinérgicos M1, anti-histamínicos H₂, citoprotetores e inibidores da bomba protônica. Além disso, novos usos para velhos fármacos foram encontrados; os compostos de bismuto^{152,153} e a carbenoxolona, obtida a partir de um extrato da *Glycyrriza glabra* o alcaçuz,^{154,155} fazem parte desse grupo.

Estamos hoje há 20 anos do início da “era da *H. pylori*”, e estagnamos numa espécie de platô do conhecimento, tratamento e diagnóstico das úlceras pépticas. Atualmente, a terapêutica mais empregada no tratamento de úlceras gástricas consiste no emprego de inibidores da bomba protônica (H⁺-K⁺-ATPase) concomitantemente a antibióticos para erradicação da *Helicobacter pylori*, quando detectadas nas biopsias. Entretanto, três questões ainda demandam soluções: a) a contínua diminuição na eficácia da erradicação da *H. pylori*; b) a ineficácia da atual terapêutica na prevenção e na reincidência de úlceras gástricas em pacientes usuários de drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs); c) a ineficácia da atual terapêutica em casos de úlceras gástricas não associadas à utilização de AINEs e à presença da *H. pylori*¹⁴⁷. Além disso, o uso de fármacos inibidores da secreção ácida (anti-histamínicos H₂ e inibidores da bomba protônica) em conjunto a AINEs, reduz a absorção destas últimas, reduzindo assim seus efeitos terapêuticos¹⁵⁶.

Existem, só no Brasil, centenas de milhares de casos envolvendo úlceras gástricas, o que significa um problema de saúde pública importante e nos leva a crer que estudar substâncias com potencial atividade antiulcerogênica seja não só pertinente, como bastante importante.

III OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar a atividade antiulcerogênica de frações e do alcalóide cantinona e desvendar seu possível mecanismo de ação, utilizando modelos experimentais “*in vivo*” e “*in vitro*”.

3.2 Específicos

- Obter frações do rizoma de *Simaba ferruginea*;
- Isolar o alcalóide cantinona do rizoma de *Simaba ferruginea*;
- Determinar o potencial citotóxico de frações e do alcalóide cantinona em cultura de células.
- Avaliar a atividade antiulcerogênica de frações e do alcalóide cantinona no modelo agudo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos;
- Avaliar a atividade antiulcerogênica de frações e do alcalóide cantinona no modelo crônico de lesão gástrica induzida por indometacina em ratos;
- Avaliar a participação do óxido nítrico na resposta antiulcerogênica de frações e do alcalóide cantinona, em modelo de úlcera induzida por etanol;
- Avaliar a atividade antiulcerogênica de frações e do alcalóide cantinona contra lesões gastrintestinais induzidas por indometacina, analisando parâmetros de estresse oxidativo (líperoxidação lipídica (MDA) e mieloperoxidase (MPO));
- Avaliar a atividade antiulcerogênica de FASf e do alcalóide cantinona contra lesões gastrintestinais induzidas por indometacina, através dos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias, IL-8 e TNF- α ;
- Avaliar a participação da PGE₂ da mucosa gástrica na resposta antiulcerogênica das frações e do alcalóide cantinona;
- Avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori* de frações e do alcalóide cantinona em ensaio de difusão em disco;
- Avaliar a atividade anti-*Helicobacter pylori* de frações e do alcalóide cantinona em ensaio de microdiluição em caldo.

IV MATERIAIS

4.1 Material botânico

Simaba ferruginea St Hil. (Simarobaceae) foi coletada em julho de 2008, pela equipe do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), no Bairro Pedra 90, Cuiabá, Mato Grosso, coordenadas GPS E0614500 e N8271574.

Amostras testemunhas contendo material reprodutivo de *S. ferruginea* foram encaminhadas ao Herbário Central da UFMT e uma exsicata da planta encontra-se depositada no referido Herbário, sob o nº 21.883.

A coleta da planta foi feita após autorização do Sistema de Autorização de Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) / Ministério do Meio Ambiente (MMA) nº 23124-1 (Anexo1).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos albinos, *Rattus norvegicus*, variedade Wistar pesando de 150-200g e camundongos albinos, *Mus musculus*, variedade Swiss-Webster pesando de 25-35 g, provenientes do Biotério Central da UFMT. Todos os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, com água *ad libitum* e dieta apropriada com ração Purina® (Labina), mantidos em condições controladas de temperatura (25 ± 1 °C) e ciclos claro/escuro de 12 h e adaptados às condições laboratoriais por no mínimo 48 h.

De acordo com cada experimento, os animais foram submetidos ao jejum de ração de 12 a 24 h, mantidos em gaiolas especiais com grade na base para evitar coprofagia e água *ad libitum* até 1 hora antes de cada experimento. Utilizando-se de 7-10 animais por grupo experimental. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UFMT), nº 23108.020675/09-4, conforme Anexo 2.

4.3 Microorganismos

Para os bioensaios, foram utilizadas cepas de *Helicobacter pylori* (vacA e cagA positivos), American Type Culture Collection - ATCC 43504 doada pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ. As cepas foram congeladas a -20°C e mantidas em meio skinmilk.

4.4 Linhagem Celular

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas células do carcinoma hepatocelular (HEP G₂), doado pela Prof. Dr. Carmem Luci Bassi da Área de Histologia e Biologia do Departamento de Ciências Básicas em Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da UFMT. As células após descongeladas foram mantidas em meio Nutrient Mixture F-10 (HAM) + Dulbecco Modified Eagle's Medium Hepes Modification (DMEM) (Sigma Aldrich - USA) com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ e 90% umidade sendo a viabilidade celular avaliada pelo método de Azul de Tripán.

4.5 Drogas e reagentes

As drogas, reagentes e corantes utilizados durante a realização dos ensaios farmacológicos foram de pureza analítica, com exceção da claritromicina (claritromicina-genérico) e tiopental sódico (Tiopentax[®]) conforme Quadro 1.

Quadro 1. Drogas, reagentes e corantes utilizados nos ensaios farmacológicos.

PRODUTO	MARCA
Ácido Acético Glacial	SYNTH
Ácido Tiobarbitúrico ≥ 98% (TBA)	SIGMA
Álcool metílico P.A (metanol)	SYNTH
Álcool etílico P.A(etanol)	SYNTH
BHI caldo	NEWPROV
Bicarbonato de Sódio P.A	SYNTH
Carbenoxolona	SIGMA
Claritromicina	MEDLEY
Claritromicina (disco de 15µg)	NEWPROV
Cloreto de sódio P.A	SYNTH
Brometo de Difeniltetrazólio (MTT)	SIGMA
Di-cloridrato de o-dianasidina	SIGMA
Dimetilssulfóxido (DMSO)	VETEC
5,5 ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB)	SIGMA
Disco Claritromicina (15µg)	NEWPROV
Dulbecco Modified Eagle's Medium Hepes Modification (DMEM)	SIGMA

EDTA sal dissódico P.A	DINÂMICA
Éter etílico P.A	SYNTH
Fosfato de Sódio P.A	VETEC
Fosfato de Sódio Monobásico P.A	VETEC
Glutation reduzido	SIGMA
Hidrato de cloral	MERCK
Indometacina	SIGMA
Meio de Cultura Agar Sangue	NEWPROV
N ^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)	SIGMA
Lauril Sulfato de Sódio (LSS)	ISOFAR
L-Arginina	SPRINGVALLEY
Nutrient Mixture F-10 HAM	SIGMA
Sangue de Carneiro Desfibrinado 10%	NEWPROV
Soro Bovino Fetal (SBF)	CULTILAB
Tampão tris (Trizma [®])	SIGMA
Tiopental sódico (Tiopentax [®])	CRISTÁLIA
Tripsina	SIGMA
Tween 80	MERCK

4.6 Equipamentos

Os equipamentos utilizados durante a realização dos ensaios microbiológicos e farmacológicos estão relacionados conforme a Quadro 2, a seguir:

Quadro 2. Materiais permanentes e equipamentos utilizados nos ensaios biológicos.

Materiais Permanentes e Equipamentos	MARCA
Aparelho leitor de ELISA	BIO RAD
Balança eletrônica de precisão modelo WA205	CHYO
Centrifuga Excelsa 2	FANEM
Centrifuga refrigerada R-4239	ALC
Destilador Q341-25	QUIMIS
Estufa BOD EL141	ELETROLAB
Estufa de secagem MA-037	FANEM
Freezer -20°C CPS 10	INDREL
Freezer -86°C IULT 335 D	INDREL
Fluxo laminar EM 12469	IVECO
Gaiolas metabólicas	TECNIPLAST
Homogeneizador automático MA-102	MARCONI
Incubadora de CO ₂ TE-399	TECNAL
Lupa esterioscópica	CHYO
Microscópio invertido TS-100	NIKON
Homogeneizador automático MA-102	MARCONI
Moinho de facas TE-625	TECNAL
Paquímetro digital	DIGIMESS
Phmetro digital B-474	MICRONAL
Vortex	PHOENIX

V MÉTODOS

5.1 Extrato Metanólico de *Simaba ferruginea*

Os rizomas de *Simaba ferruginea* foram limpos, cortados em pequenos pedaços e secos à temperatura ambiente e triturados em moinho elétrico com tamis de malha nº 40, onde foi obtido um pó fino e de cor marrom-amarelado (3 Kg).

Este foi macerado (1:2 p/v) com metanol por 7 dias, à temperatura ambiente. Após este período, o macerado foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida de 600 mmHg e temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. O solvente residual foi evaporado em estufa a 40°C e o EMSf, assim obtido foi envasado em frasco âmbar e mantido em geladeira a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.2 Fração Alcaloídica de *Simaba ferruginea*

A fração alcaloídica de *Simaba ferruginea* (FASf), foi obtida a partir do EMSf onde foi macerado com metanol/água (5:2 v/v) e alcalinizada com hidróxido de amônia (10%) até pH 9 e extraída sucessivamente com clorofórmio através de um balão de separação, obtendo-se duas soluções: Clorofórmio e resíduo do extrato aquoso alcalino (este resíduo foi reservado para posterior extração). Em seguida a solução clorofórmica foi acidificada com uma solução de ácido clorídrico (0,1M) até pH 4 em um balão de separação a qual foi recolhida separadamente. Por fim, esta solução aquosa foi alcalinizada novamente com hidróxido de amônia e extraída três vezes com clorofórmio, obtendo-se a fração alcaloídica (FASf), onde a mesma foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida de 600 mmHg e temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. O solvente residual foi evaporado em estufa a 40°C . A FASf foi envasada em frasco âmbar e mantido em dessecador.(UGAZ, 1994; SIMÕES et al, 2002). (Figura 15).

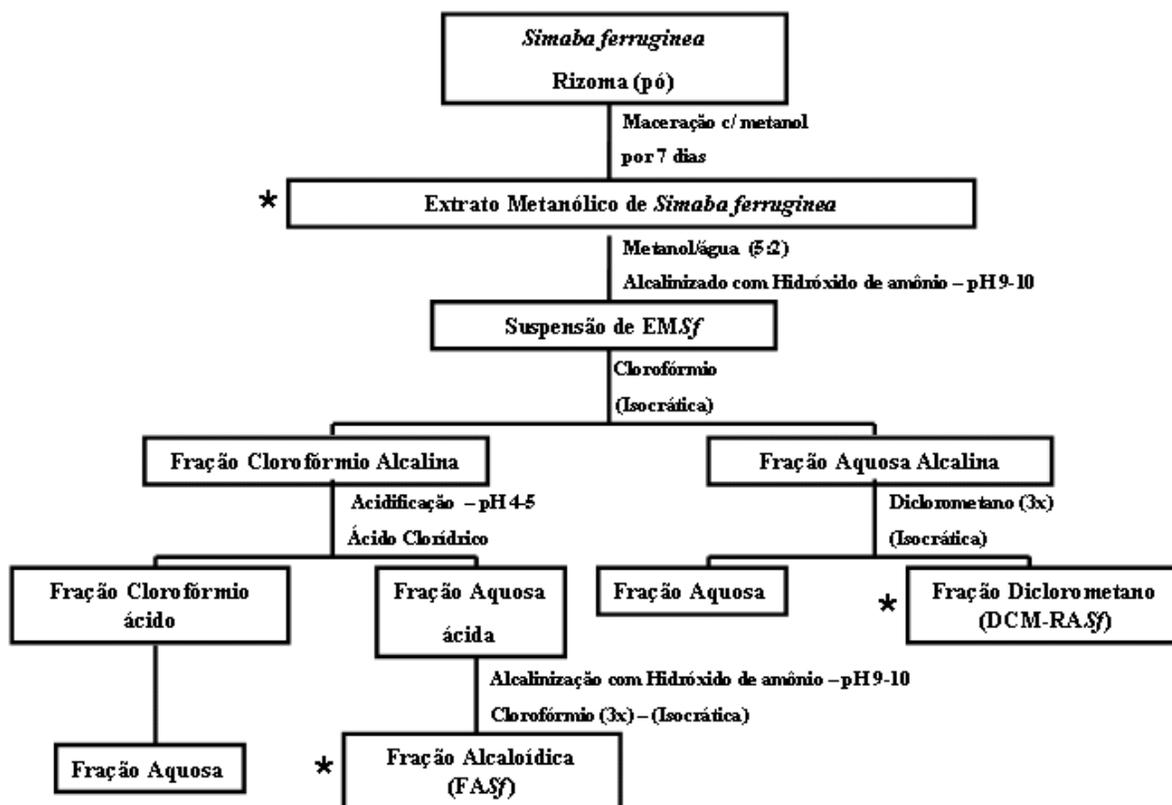


Figura 15. Esquema para obtenção do Extrato metanólico, Fração lcaloídica e Fração diclorometano-resíduo alcalino, a partir do rizoma de *Simaba ferruginea*
* Envolvidos em Bioensaios.

5.3 Fração diclorometano-resíduo alcalino de *Simaba ferruginea*

O resíduo do extrato aquoso alcalino obtido a partir da solução da fração alcaloídica da *Simaba ferruginea*, foi colocada em um balão de separação e lavada 3 vezes com diclorometano, obtendo-se assim a fração diclorometano – resíduo alcalino *Simaba ferruginea* (DCM-RA.Sf), a qual foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida de 600 mmHg e temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. O solvente residual foi eliminado em estufa a 40°C . A DCM-RA.Sf foi envasada em frasco âmbar e mantida em dessecador.

5.4 Isolamento do alcalóide cantinona

O EMSf (200 mg) foi particionado sucessivamente (3 x 250 ml) em um balão de separação com clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se assim duas soluções, as quais foram

recolhidas separadamente, sendo uma fase acetato de etila, que foi desprezada e outra fase clorofórmica, denominada fração clorofórmica de *Simaba ferruginea* (FCSf), a qual foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida de 600 mmHg e temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. O solvente residual foi eliminado em estufa a 40°C , e a FCSf, assim obtida, foi envasada em frasco âmbar e mantida em dessecador.

Após o preparo da FCSf foram feitas placas de cromatografia em camada delgada (CCD), eluída com hexano, acetato de etila e acetona (8:2:0,5 v/v/v) e a CCD foi revelada com Dragendorff.

A FCSf foi resuspensa em clorofórmio, para o preparo da pastilha, que foi adicionada a uma coluna de cromatografia de sílica gel, eluída com hexano/acetato de etila, em uma relação isocrática, e os eluatos foram coletados em frascos de 20-30 mL. Após evaporação do solvente, foram realizados testes em CCD, usando lâmpada de ultra violeta, ácido sulfúrico e etanol/aquecimento como reveladores universais e também alguns reveladores específicos como reativos de Dragendorff, anisaldeído sulfúrico e cloreto férrico(FeCl_3). Com base no perfil de CCD, foram reunidos os frascos com perfis similares. Desta forma, foram obtidas as subfrações: 122-145, 159-169 e 170-171 (Figura 16).

As subfrações 122-145 e 159-169 foram recromatografadas em cromatografia em coluna (CC) de sílica gel 60 F₂₈₄, usando continuamente, uma relação isocrática, (~2 litros) hexano:acetato de etila (8:2 v/v), o eluato foi coletado em frascos de 20-30 mL. Após evaporação do solvente, foram reunidos os frascos com perfil similar, de acordo com a CCD, revelado com reativo de Dragendorff, desta maneira foram reunidos os frascos 33-45 e 75-105 das subfrações 122-145 e 159-169 respectivamente.

As subfrações 170-171 foram recromatografadas em CC de sílica gel 60 F₂₈₄ continuamente com clorofórmio:methanol, em uma relação isocrática (~300 mL). Os eluatos dos frascos 3-7 foram reunidos e recromatografados em CC, eluída com hexano:acetone, em uma relação isocrática. Com base na cromatografia em camada delgada (CCD), foram reunidos os frascos com perfil similares, estes frascos foram os 26-41.

As amostras obtidas dos frascos com similaridades na CCD foram encaminhadas para análise e os perfis cromatográficos foram obtidos utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Produtos

Naturais da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, sob orientação do Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho.

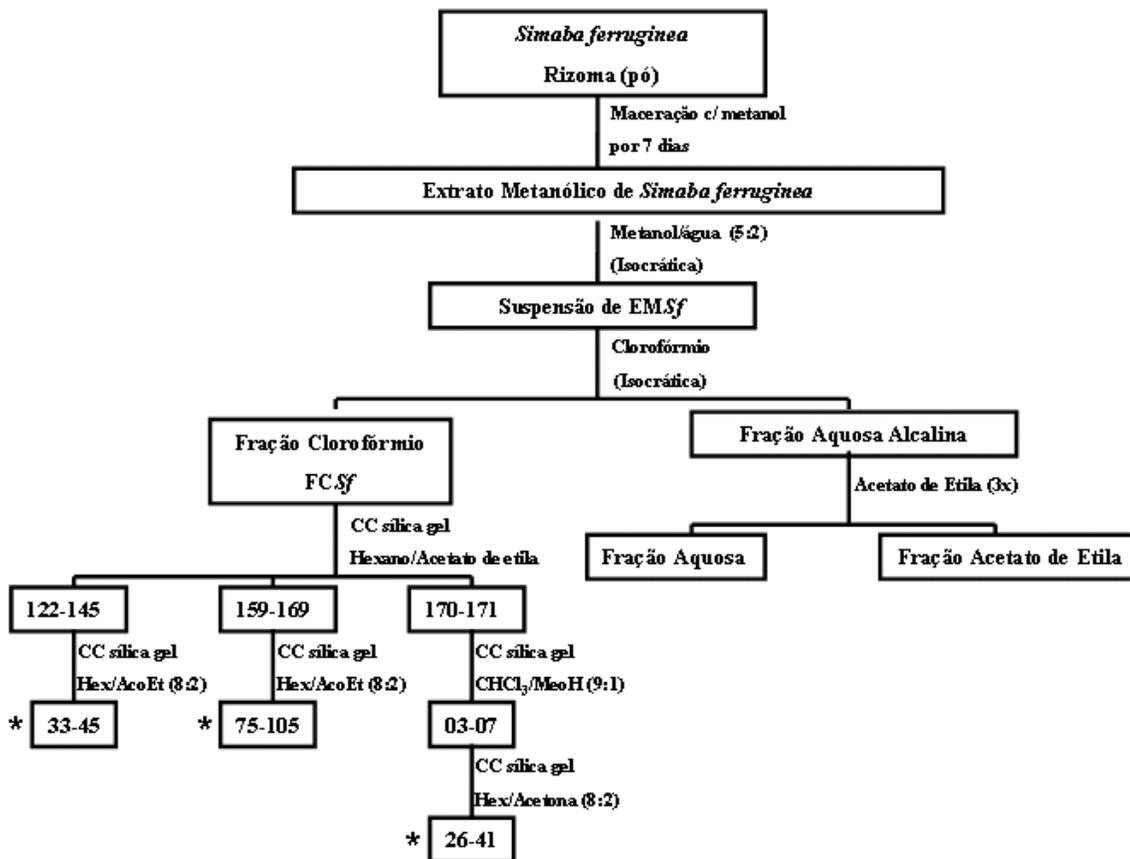


Figura 16. Esquema para obtenção do Alcalóide Cantinona a partir do rizoma de *Simaba ferruginea*. Clorofórmio (CHCl₃); Metanol (MeoH); Hexano (Hex); Acetato de etila (AcoEt). * Cantinona.

5.5 Análise cromatográfica

Para este procedimento foram utilizadas placas de cromatografia de sílica gel 60 F254 (Merck) como fase estacionária e os eluentes como fase móvel (clorofórmio, metanol, hexano, acetato de etila), variando o tipo e a proporção conforme o comportamento da fração analisada.

Para revelar as classes dos compostos foram utilizados reveladores universais como UV e ácido sulfúrico 10%, e reveladores específicos como: anisaldeído sulfúrico para

terpenóides e esteróides, cloreto férrico 3% para flavonóides e compostos fenólicos, Dragendorff para alcalóides¹⁵⁷.

5.6 Determinação dos peso secos do extrato metanólico e frações de *Simaba ferruginea*

Três alíquotas de 100 mg EMSf ou 50 mg das frações (FASf e DCM-RASf), foram retiradas e colocadas em frascos-ampola, previamente tarados, secas em estufa à 60°C, por 48 h e pesadas, sucessivamente, em balança analítica, até obtenção de peso constante. Os pesos secos expressos em miligrama por cento (mg %), foram obtidos pela média aritmética dos três últimos pesos.

5.7 Determinações dos rendimentos do extrato e frações

As determinações dos rendimentos (%) do EMSf e das frações (FASf e DCM-RASf), foram realizadas utilizando a equação:

$$r = \frac{p_s \times q_e}{q_p} \times 100, \text{ onde:}$$

r = rendimento (%)

p_s = peso seco (g/g)

q_e = quantidade de EMSf e frações (FASf e DCM-RASf), obtida (g)

q_p = quantidade de pó do rizoma utilizado (g).

5.8 Citotoxicidade através do método de Sal de Tetrazólio (MTT)

Utilizou-se método descrito por Mosmann¹⁵⁸, baseado na conversão do sal de tetrazólio (MTT) em formazan, cuja concentração pode ser determinada espectrofotometricamente.

Células de hepatoma humano (Hep G₂), numa densidade de 1x10⁵ células/100 µl, foram adicionadas em microplacas de 96 poços, contendo 100 µl de meio de cultura Dulbecco Modified Eagle's Medium Hepes Modification (DMEM) + Nutrient Mixture F-10 HAM

(HAM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e incubadas por 18 – 24 h, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, removeu-se o meio e adicionou-se 100 µl do veículo (DMSO 1%), EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e Cantinona (400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL), utilizando-se como padrão doxorrubicina (25 µg/100 µl) e como leitura branca apenas o meio de cultura com células. Estes foram incubadas por 24 h, o meio removido e substituído por 100 µl de solução estéril de MTT (5 mg/mL), deixando-o por 4 h, a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, para então proceder com a retirada do MTT e adição de 100 µl de DMSO e a leitura da absorbância em leitor de ELISA a 570 nm.

As drogas foram consideradas citotóxicas quando apresentaram valores de IC₅₀ < 100 µg/mL¹⁵⁹ (Figura 17).

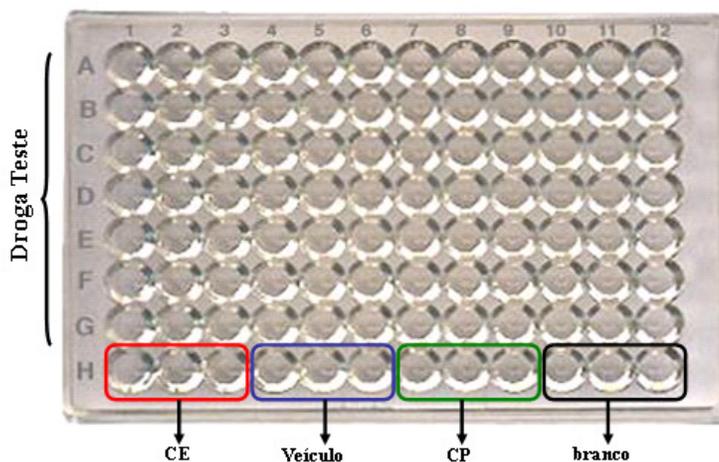


Figura 17. Preenchimento da microplaca para determinação da Citotoxicidade (MTT) do EMSf, frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona. CE: controle de esterilidade (meio); veículo (DMSO 1%), CP: controle positivo (doxorrubicina); branco: controle de crescimento (células).

5.9 Ensaios *in vivo*

5.9.1 Lesão gástrica induzida por etanol

A atividade antiulcerogênica do EMSf, frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona foi primeiramente avaliada no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, em camundongos⁸¹.

Camundongos, machos, pesando entre 20-25 g, privados de alimento por 18 h e com acesso livre à água até 1 h antes do experimento, foram distribuídos em grupos de 8-10 animais cada, tratados oralmente (v.o) com o veículo (Tween 80 à 2% em água destilada), EMSf (5, 20 e 100 mg/Kg), FASf (1, 5, 20 e 100 mg/Kg), DCM-RASf (1, 5, 20 mg/kg), cantinona (0,2; 1; 5 e 20 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg), num volume de 0,1 ml/10 g de peso corporal do animal (p.c.).

Uma hora após os tratamentos, os animais receberam, por gavagem, etanol 75% (0,1 mL para cada 10 g p.c.). Decorridos 30 min, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os estômagos removidos, abertos pela grande curvatura, lavados com salina 0,9% gelada e distendidos entre duas placas de vidro para melhor visualização. A área ulcerada foi desenhada em folha de transparência e expressa em termos de percentagem da área total do corpo gástrico (mm²), usando-se para a quantificação das lesões gástricas um programa de planimetria computadorizada (Image J)

5.9.2 Úlcera gástrica induzida por indometacina.

Para a produção de lesões gástricas nos animais, por indometacina, utilizou-se o método de Djahanguiri¹⁶⁰.

Ratos machos, pesando entre 160–180 g, privados de alimento por 18 h e com acesso livre à água até 1 h antes do experimento, foram distribuídos em grupos de 8-10 animais cada, tratados oralmente (v.o) com o veículo (Tween 80 à 2%), EMSf (5 e 20 mg/Kg), FASf (5 e 20 mg/kg), DCM-RASf (5 e 20 mg/kg), cantinona (20 mg/kg) e carbenoxolona (100 mg/kg), num volume de 0,1 ml/10 g p.c.

Uma hora após os tratamentos, foi administrado por via oral, (v.o), 50 mg/kg de indometacina, dissolvida em bicarbonato de sódio 2%. Decorridos 4 h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, removidos os estômagos e injetado 1 ml de solução de formol 5% para demarcação da área ulcerada; após 15 min, os estômagos foram abertos pela grande curvatura, desprezado o conteúdo gástrico e a mucosa foi lavada delicadamente com salina 0,9% gelada.

Para a determinação do índice de úlcera, foram atribuídos escores, seguindo-se a pontuação:

- a) Coloração da mucosa
 - Normal.....0 ponto
 - Hiperêmica.....1 ponto
 - Descorada.....1 ponto
- b) Perda de Pregas da mucosa.....1 ponto
- c) Petéquias
 - Leve.....1 ponto
 - Moderada.....2 pontos
 - Intensa.....3 pontos
- d) Edema
 - Leve.....1 ponto
 - Moderado.....2 pontos
 - Intenso.....3 pontos
- e) Hemorragia
 - Leve.....1 ponto
 - Moderada.....2 pontos
 - Intensa.....3 pontos
- f) Perda de muco
 - Leve.....1 ponto
 - Moderada.....2 pontos
 - Intensa.....3 pontos
- g) Lesões necro-hemorrágicas (Úlceras)
 - Até 1mm.....1 ponto cada
 - Maior que 1mm.....1,5 pontos x mm
 - Perfuradas.....5 pontos x mm

5.9.3 Determinação do óxido nítrico da mucosa gástrica.

Avaliação da participação do NO na atividade antiulcerogênica do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona foi feita utilizando-se o método de Matsuda et al.¹⁶¹.

Ratos machos, pesando entre 160–180 g, privados de alimento por 18 h e com acesso livre à água até 1 h antes do experimento, foram distribuídos em grupos de 8-10 animais cada, tratados oralmente (v.o) com o veículo (Tween 80 à 2%), EMSf (5 e 20 mg/Kg), FASf (1 e 20

mg/Kg), DCM-RASf (1 e 20 mg/kg), cantinona (20 mg/Kg) e carbenoxolona (100 mg/Kg), num volume de 0,1 ml/10 g p.c.

Camundongos machos, pesando entre 25 - 30 g, em jejum de sólidos por 24 h e com livre acesso à água até 1 h antes do experimento, foram distribuídos em grupos de 8 - 9 animais cada. Os animais foram pré-tratados com 70mg/kg ip.de L-name ou salina 0,9% ip., e após 30 min receberam, por via oral, veículo (Tween 80 à 2%), carbenoxolona (100 mg/kg), EMSf (20 mg/Kg), FASf (20 mg/Kg), DCM-RA (20 mg/Kg) ou cantinona (20 mg/Kg) e 200 mg/Kg ip de L-arginina. Decorridos 30 min, os animais receberam, via oral, 1 mL/10 g p.c. de etanol 75% para indução das úlceras gástricas. Após 30 min, os animais foram sacrificados, os estômagos removidos, abertos pela grande curvatura, lavados com salina 0,9% gelada e distendidos entre duas placas de vidro para melhor visualização das lesões gástricas. A área ulcerada foi quantificada conforme procedimento descrito em item 5.9.1.

5.9.4 Determinação da atividade antioxidantes

Para a avaliação da atividade antioxidante do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona foram utilizados animais submetidos a úlcera induzida por indometacina conforme metodologia descrita no item 5.9.2.

Os animais foram pré tratados com veículo (tween 80 a 2%), EMSf (5, 20 e 50 mg/mL), frações (FASf, DCM-RASf), cantinona nas doses de 20 mg/Kg e carbenoxolona na dose de 100 mg/Kg. Os estômagos foram pesados, fragmentados, acrescentado 5ml de solução tampão fosfato (PBS 0,1 mM), pH 7,4 (gelado), triturados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O homogenato obtido foi armazenados em biofreezer (-80°C), para posterior determinação de Mieloperoxidase (MPO) e Malonaldeído (MDA).

5.9.4.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar a participação da mieloperoxidase (MPO) na ação antiúlcero-gênica do EMSf, Frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona, utilizou-se o método de Krawisz et al.¹⁶².

A atividade da MPO foi medida adicionando-se a 10 µl da amostra, 290 µl de tampão fosfato de sódio a 50 mM (pH 7.4) contendo 0,167 g/l de diidrocloreto o-dianasidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. Após 1 a 10 min, realizou-se a medida da absorbância em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em U/g Tecido.

5.9.4.2 Determinação do malonaldeído (MDA)

A atividade antioxidante do EMSf, Frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona, foi medida pela dosagem das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico, indicador de peroxidação lipídica¹⁶³.

Ao homogenato foi adicionado KCl (0,15M) na proporção de 1:10, (v/v), deste retirou-se 500 µl e adicionou-se à 200 µl de lauril sulfato de sódio (LSS) (8,1%), 1,5 ml de ácido acético (20%, pH=3.5, ajustado com NaOH), 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (0,8%, p/v) e água destilada até se completar 4ml. As amostras foram colocadas em banho-maria, à 95°C, por 1 h. Após o resfriamento das amostras, adicionou-se 1 ml de água destilada + 5 ml da mistura de n-butanol + piridina (15:1, v/v), os tubos foram agitados por 1 min e centrifugados a 2.600 g, por 10 min. A absorbância da capa orgânica foi determinada em espectrofotômetro à 532 nm. Os valores foram expressos em µmol MDA/g tecido.

5.9.5 Determinação dos níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α

Para a determinação dos níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α , os ratos foram submetidos à úlcera gástrica induzida por indometacina, conforme metodologia descrita no item 5.9.2.

Os animais foram pré tratados com veículo (tween 80 a 2%), EMSf (20 mg/mL), FASf e cantinona nas doses de 20 mg/Kg e 100 mg/Kg de carbenoxolona. Após 4 h da indução da úlcera, os animais foram anestesiados com foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) e hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p.), a veia cava inferior puncionada e o sangue retirado, colocado em tubos de ensaio contendo EDTA 5%, centrifugados a 3.500 rpm por 10 min, a 4°C e o plasma obtido armazenado a -80°C. As amostras fortemente hemolisadas foram descartadas. Os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α foram determinados por kit de ELISA (eBioscience, USA e Immuno Biological Laboratories-IBL, Japan), de acordo com instruções do fabricante.

5.9.6 Determinação dos níveis de PGE₂ da mucosa gástrica

Para a determinação dos níveis de PGE₂, da mucosa gástrica, foram utilizados ratos submetidos à úlcera induzida por indometacina, conforme metodologia descrita no item 5.9.2.

Os animais foram pré tratados com veículo (tween 80 a 2%), EMSf (5, 20 e 50 mg/mKg), frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona nas doses de 20 mg/Kg e 100 mg/Kg de carbenoxolona. Os estômagos foram pesados, fragmentados, acrescentado 5 ml de PBS 0,1 mM, pH 7,4 (gelado), triturados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. O homogenato obtido foi armazenado à -80°C e os níveis de PGE₂ da mucosa gástrica, foram determinados utilizando-se kit de ELISA (Stressgen,[®] USA), de acordo com instruções do fabricante.

5.10 Ensaio *in vitro*

5.10.1 Atividade anti- *Helicobacter pylori* Difusão em disco

O ensaio da difusão em disco foi realizado segundo o método de McNulty¹⁶⁴.

Discos estéreis (6 mm - CECON[®]) foram impregnados com 20 µL de veículo (Tween 2%), EMSf, frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/disco), depositados na superfície da placa inoculada com o *H. pylori*, numa suspensão de 6x10⁸ unidade formadora de colônia/mL (UFC/mL - escala 2 de McFarland), utilizando claritromicina (15µg - NEWPROV[®]) e discos estéreis como branco. Estes foram incubados a 37°C sob condições de microaerofilia com atmosfera de 5 a 15% de O₂ e de 5 a 10% de CO₂ por 4 - 5 dias. Após esse período, foram realizadas as medidas dos halos de inibição de crescimento utilizando um paquímetro digital, sendo considerados ativos halos ≥ 10 mm (Figura 18). O ensaio foi feito em duplicata.

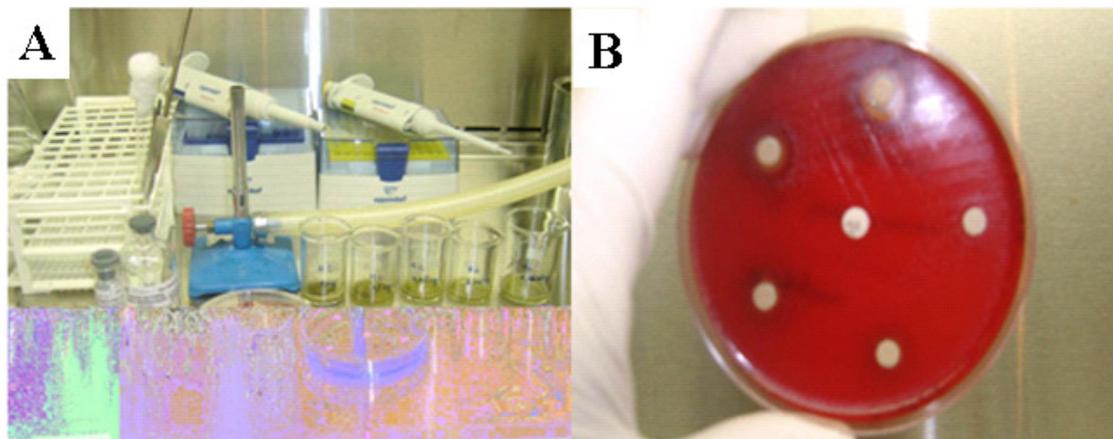


Figura 18. Ensaio de difusão em disco: (A) Bancada de ensaios com material utilizado e (B) placa de ágar sangue com halos de inibição de crescimento do *Helicobacter pylori* (Fonte: Souza,2008)¹⁶⁵.

5.10.2 Atividade anti- *Helicobacter pylori* pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Seguindo-se o método de Hachem¹⁶⁶ para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando-se o ensaio de microdiluição em caldo.

Foram adicionados a cada poço da microplaca (96 poços), 100 μL adicionou-se caldo Mueller-Hinton, suplementado com 10% de SFB. Após, adicionou-se 100 μL do veículo (Tween 2%), EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona (0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$), e inoculados 100 μl de *H. pylori* 6×10^8 UFC/mL (escala 2 de McFarland), como padrão utilizando-se claraitromicina (15 $\mu\text{g/mL}$) e poços contendo cepas de *H. pylori* como branco. Estes foram incubados a 37°C sob condições de microaerofilia com atmosfera de 5 a 15% de O_2 e de 5 a 10% de CO_2 , por 4 - 5 dias e a densidade óptica lida em aparelho de ELISA (BIO RAD), a 490 nm (Figura 19).

A CIM representa a menor concentração da droga teste capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano no meio. O critério utilizado para classificação dos da atividade dos extratos foi: a CIM menor que 100 $\mu\text{g/mL}$ considerado como boa atividade antimicrobiana; quando a CIM entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ foi considerado moderadamente ativo; a CIM acima de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ considerado pouco ativo e CIM maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$ inativo. Os testes foram realizados em duplicata^{167,168,169}.

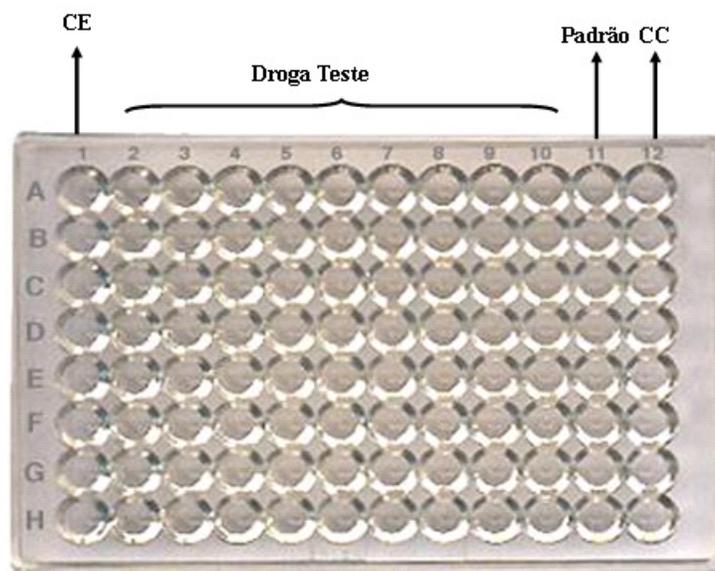


Figura 19. Preenchimento da microplaca para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EMSf, frações (FASf e DCM-RASf), cantinona e da claritromicina (droga padrão). CE: controle de esterilidade; CC: controle de crescimento.

VI ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos testes paramétricos foram expressos em termos de média \pm erro padrão da média ($\bar{X} \pm EPM$). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) uma via para comparações das médias e, em havendo significancia, procedeu-se com o teste de comparações multiplas Student Newman Keul.

Os dados não paramétricos foram expressos em termos de mediana (Q1, Q3), onde Q1 e Q3 referem-se ao 1º e 3º quartis, respectivamente. Para comparação das medianas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e, em havendo significancia, seguiu-se com o teste de Dunnett.

Considerou-se o nível crítico para rejeição de hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para a tabulação e análises dos dados será usado GraphPad InStat versão 2.01.

VII RESULTADOS

7.1 Determinação do peso seco e rendimento do extrato metanólico e frações de *Simaba ferruginea*

Os pesos secos do EMSf, FASf e DCM-RASf variaram de 93, 28 a 95,34%, tendo o EMSf rendimento de 9,38% e a DCM-RASf 3,2%, conforme visto na Tabela 1.

Tabela 1. Pesos secos e rendimentos do extrato e frações de *Simaba ferruginea*.

Extrato/Fração/Isolado	Farmacógeno	Peso seco (mg %)	Rendimento (%)
EMSf	Rizoma	95,34	9,38
FASf	Rizoma	93,28	4,5
DCM-RASf	Rizoma	93,42	3,2

7.2 Isolamento do Alcalóide Cantinona

A partir do EMSf, foram obtidos 87 mg de cantinona, representando um rendimento de 0,0435% (Figura 20).

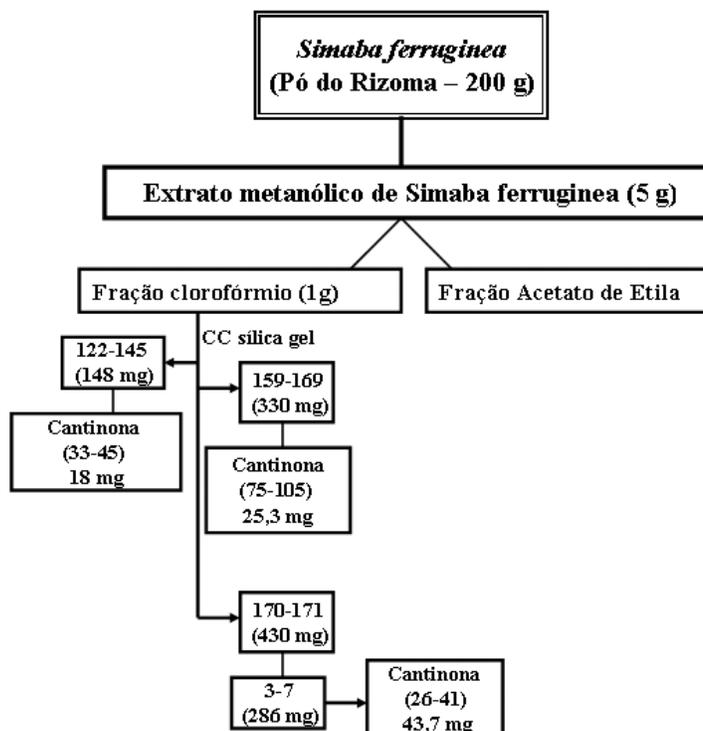


Figura 20. Esquema mostrando as quantidades de cantinona, obtidas a partir do extrato metanólico de *Simaba ferruginea*.

7.3 Determinação do Alcalóide Cantinona

Pode-se verificar na Figura 21 uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com reagente de dragendorff, onde verificamos a formação de duas manchas, sendo a mancha A, o do alcalóide cantinona padrão e a mancha B, o alcalóide cantinona isolado do rizoma de *S. ferruginea*, já na Figura 22 encontra-se dois cromatogramas, realizados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde o cromatograma A, pode-se observar vários tempo de retenção (RT), visto se tratar do EMSf, demonstrando o aparecimento de várias substâncias. O cromatograma B, pode ser observado apenas o alcalóide cantinona isolado do rizoma se *S. ferruginea*, sendo utilizando um alcalóide cantinona padrão, para confirmar o seu isolamento, apresentando RT=43,922.

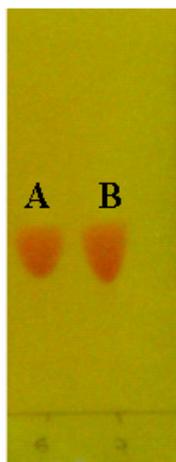


Figura 21 Cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com reagente de Dragendorff, com manchas de coloração laranja, representando os alcalóides cantinona, onde a mancha A é o alcalóide cantinona padrão e a mancha B o alcalóide cantinona isolado do rizoma de *S. ferruginea*.

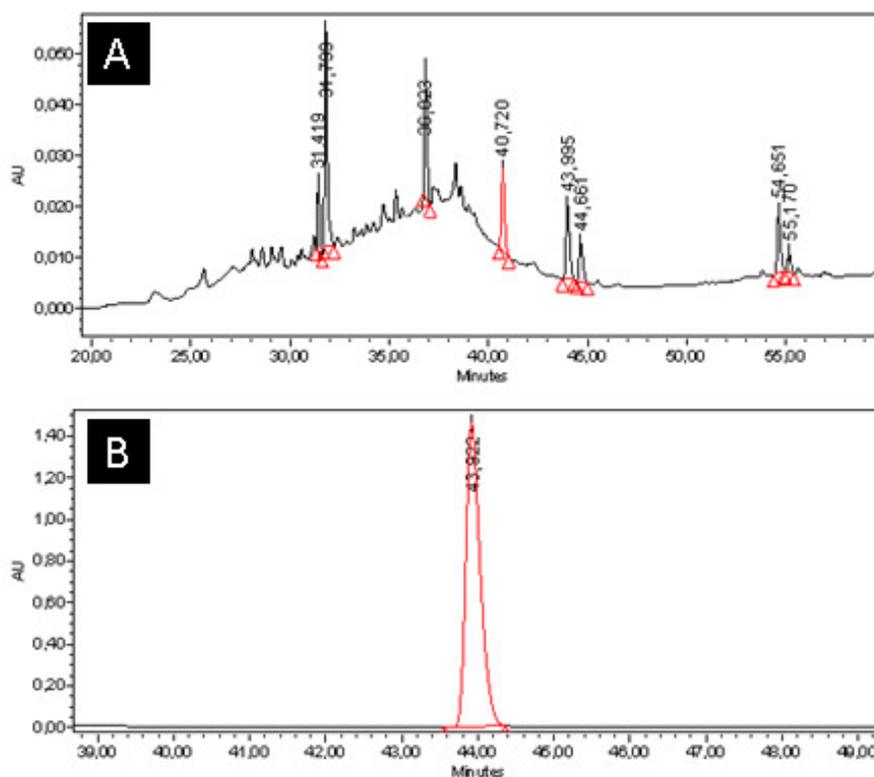


Figura 22 Perfil cromatográfico (HPLC), o cromatograma A, demonstra diferentes RT do EMSf, demonstrando ter diferentes compostos. O cromatograma B, confirma o isolamento do alcalóide cantinona, com RT=43,922 nm, utilizando um alcalóide cantinona padrão.

7.4 Citotoxicidade do extrato, frações e cantinona.

A Tabela 2 mostra a concentração dos diferentes preparados de *Simaba ferruginea* e padrão (doxorubicina) que inibe o crescimento de linhagens celular de Hep G2 (CI₅₀).

O EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona (400 à 6,25 µg/mL) foram desprovidos de efeitos citotóxicos (CI₅₀>100 µg/mL).

A doxorubicina (10, 25 e 50 µg/mL) foi a única droga que mostrou citotoxicidade relevante, com CI₅₀10,7±7,6.

Tabela 2 Resultado da citotoxicidade de diferentes concentrações de EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona sobre as células Hep G₂

Células Hep G ₂	DROGAS				
	EMSf	FASf	DCM-RASf	Cantinona	Doxorubicina
^{la} IC ₅₀ ±SEM (µg/mL)	217,5±5,7	339,9±5,7	257,2±5,8	202±7,4	10,7±7,6

^a IC₅₀- 3 ensaios independentes, realizados em triplicata

7.5 Ensaios *in vivo*

7.5.1 Avaliação da atividade antiúlcera do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona– Úlcera gástrica por etonal.

Na Figura 23 podem ser vistos os efeitos do EMSf sobre a úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

A administração oral de etanol 75% ao grupo veículo (Tween 2% em água destilada), produziram extensas lesões na forma de erosões hemorrágicas, na porção glandular da mucosa gástrica (9,4±0,4). O tratamento com EMSf (5; 20 e 100 mg/Kg, v.o) promoveu redução significativa e dose-dependente (††p<0,01), da resposta ulcerogênica em todos as doses, atingindo a resposta máxima (79%) com 100 mg/kg (1,97±0,2%, p<0,001). Com 100 mg/Kg de carbenoxolona, a inibição da lesão gástrica foi de 62%±0,6% (p<0,001).

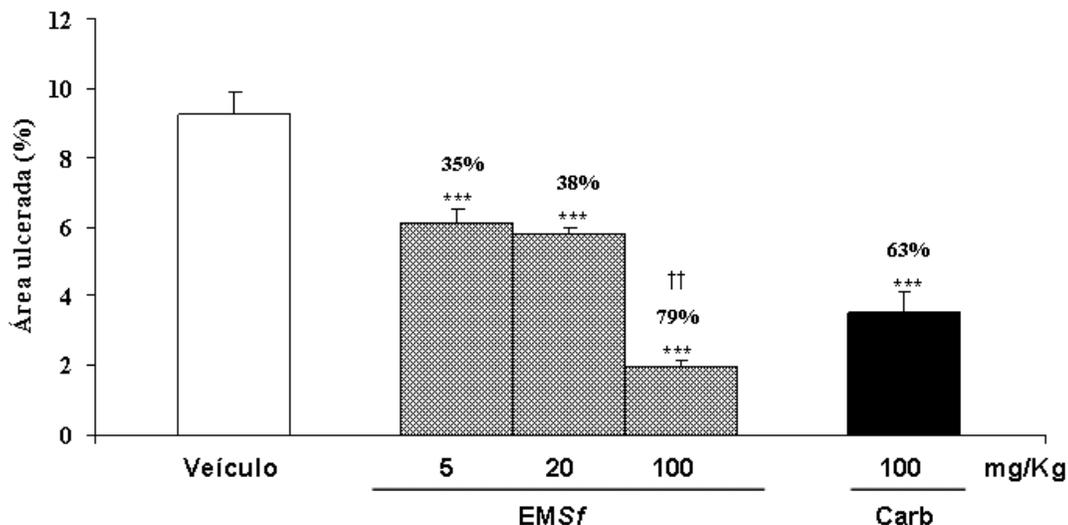


Figura 23 Efeito da administração orogástrica do veículo, do EMSf (5, 20 e 100 mg/Kg) e Carbenoxolona (Carb - 100 mg/Kg), com administração de etanol 75% (0,1 mL/10 g) em camundongos machos. A área ulcerada (%) foi expressa como Média ± E.P.M. para 8-10 animais. ANOVA uma via,

Os efeitos da FASf sobre as lesões gástricas provocadas por etanol, podem ser vistas na Figura 24. No grupo veículo (tween 2%), o etanol produziu extensas lesões na forma de erosões hemorrágicas na porção glandular da mucosa gástrica (9,4±0,4%). O pré-tratamento com a FASf (1, 5; 20 e 100 mg/Kg, v.o) inibiu significativamente e de forma dose-dependente (††<0,01). O aparecimento das lesões gástricas, atingindo sua maior atividade (66%) na dose de 20 mg/Kg (3,2±0,8%, p<0,001) e a dose de 1 mg/Kg apresentou a menor (24%) atividade (7,1±0,6%, p<0,05). A carbenoxolona (100 mg/Kg) mostrou uma inibição da lesão gástrica de 62% (3,5±0,56%, p<0,001).

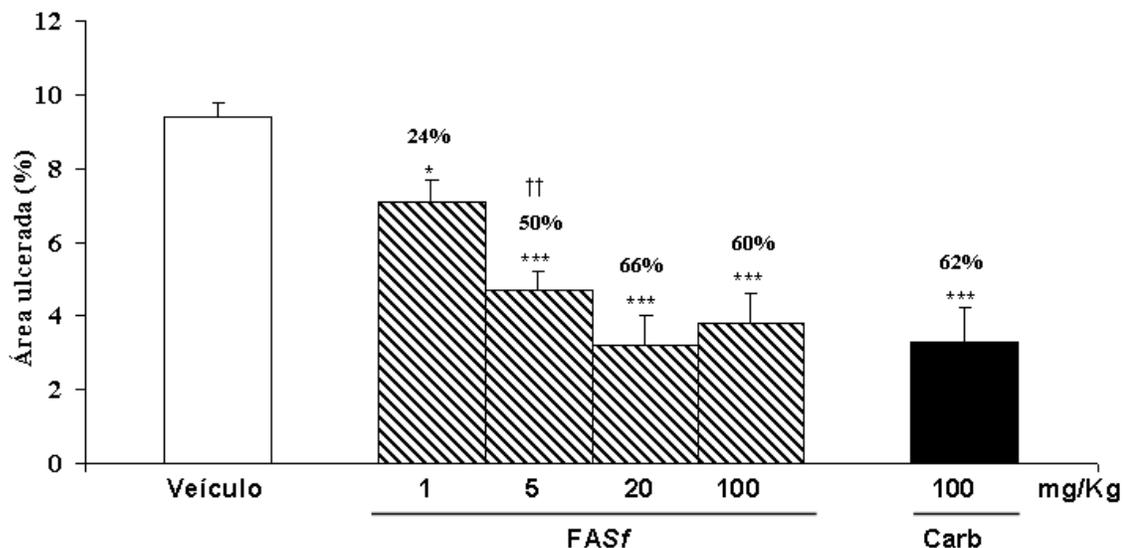


Figura 24 – Efeito da administração orogástrica do veículo, da FASf (1, 5, 20 100 mg/Kg) e Carbenoxolona (Carb) na dose de 100 mg/Kg, com administração de etanol 75% (0,1 mL/10 g) em camundongos machos. A área ulcerada (%) foi expressa como Média ± E.P.M. para 8-10 animais. ANOVA uma via, seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. veículo. †† $< 0,01$ vs FASf

A administração por gavagem do etanol ao grupo veículo produziu extensas lesões na mucosa gástrica ($9,4 \pm 0,6$). (Figura 25)

O tratamento realizado com a DCMSf (1; 5; 20 e 100 mg/Kg v.o) inibiu o aparecimento das lesões gástricas ($p < 0,01$) em todas as doses, atingindo seu maior efeito gastroprotetor (79%) na dose de 100 mg/Kg ($2 \pm 0,5\%$). A carbenoxolona (100 mg/Kg v.o) reduziu a área lesionada em 62% ($3,5 \pm 0,56\%$).

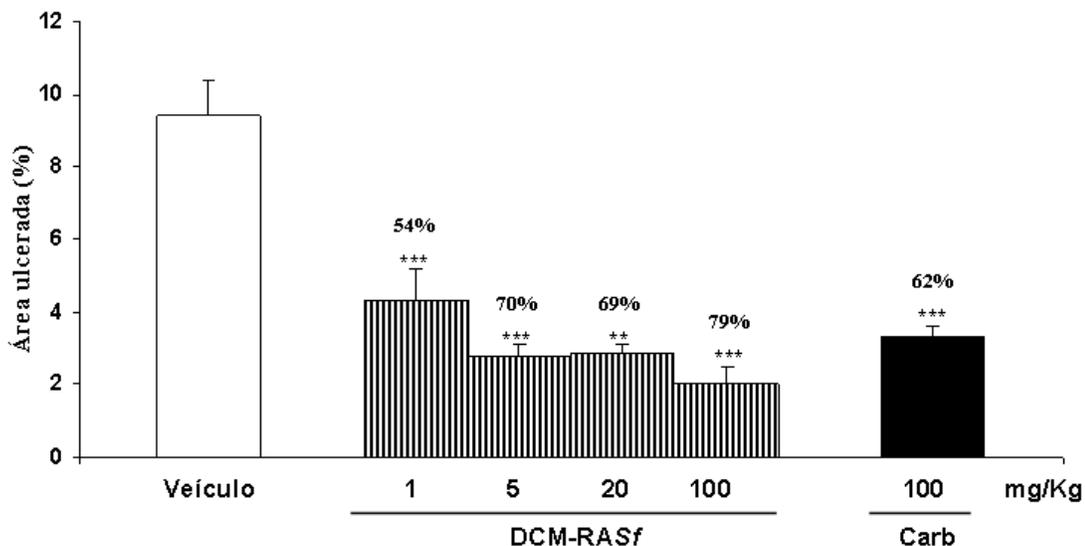


Figura 25 – Efeito da administração orogástrica do veículo, da fração diclorometano de *Simaba ferruginea* St. Hill (DCMSf) nas doses de 1, 5, 20 100 mg/K e Carbenoxolona (Carb) na dose de 100 mg/Kg, com administração de etanol 75% (1 mL/100g) em camundongos machos. A área ulcerada (%) foi expressa como Média \pm E.P.M. para 8-10 animais. ANOVA uma via, seguida do teste de Student-Newman-Keuls. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. veículo)

Os resultados que avaliam a contribuição do alcalóide cantinona no efeito antiulcerogênico, do EMSf e FASf na úlcera induzida por etanol, estão apresentados na Figura 26 A administração por gavagem do etanol ao grupo veículo produziu extensas lesões na mucosa gástrica ($15 \pm 0,6\%$).

Os grupos tratados com cantinona (0,2; 1; 5; 20 mg/Kg v.o), EMSf (20 mg/Kg), FASf (20 mg/Kg) e DCM-RA (20 mg/Kg) apresentaram redução significativa da resposta ulcerogênica em todas as doses, atingindo o efeito máximo (80%) com cantinona e DCM-RASf na dose de 20 mg/Kg de ($3 \pm 0,2\%$ e $3,2 \pm 0,6$, $p < 0,001$, respectivamente), a menor atividade (20%) ocorreu na dose de 0,2 mg/Kg de cantinona ($12 \pm 1,1\%$ $p < 0,01$). Com 100 mg/Kg de Carbenoxolona, a inibição da úlcera gástrica foi de 71% ($3,5 \pm 0,6$, $p < 0,001$).

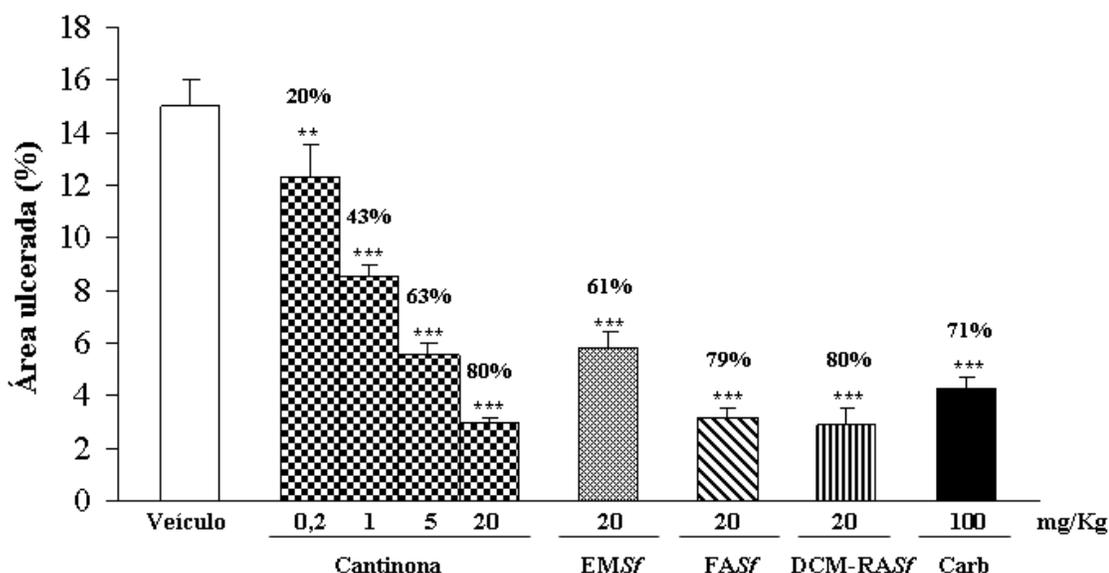


Figura 26 – Efeito da administração orogástrica do veículo, da cantinona (0,2; 1; 5 e 20 mg/Kg), EMSf (20 mg/Kg), FASf (20 mg/Kg), DCM-RASf (20 mg/Kg) e carbenoxolona (Carb) (100 mg/Kg v.o), 1 h antes da administração de etanol 75% (0,1 mL/10 g) em camundongos machos. A área ulcerada (%) foi expressa como Média \pm E.P.M. para 8-10 animais. ANOVA uma via, seguida do teste de Student-Newman-Keuls. (***) $p < 0,001$ vs. veículo).

7.5.2 Avaliação da Atividade Antiúlcera do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e Cantinona - Úlcera Induzida por Indometacina.

Podem ser vistos na Figura 27 os índices antiulcerogênicos, produzidos pelo pré-tratamento com EMSf, FASf, DCM-RASf, cantinona e carbenoxolona, após administração de indometacina.

O índice de úlcera produzido pela administração oral de indometacina (50 mg/kg) ao grupo veículo foi de 19,15 (18,4;20,9). Os tratamentos com EMSf (5, 20 e 50 mg/Kg, v.o), FASf, DCM-RASf (5 e 20 mg/Kg, v.o) e cantinona (20 mg/Kg, v.o) diminuíram significativamente somente na dose de 20 mg/Kg, atingindo o efeito máximo (94,8%) para o grupo DCM-RASf (1;2,2; $p < 0,001$). O extrato e FASf apresentaram atividade dose-dependente ($\dagger p < 0,05$ e $\ddagger p < 0,05$, respectivamente).

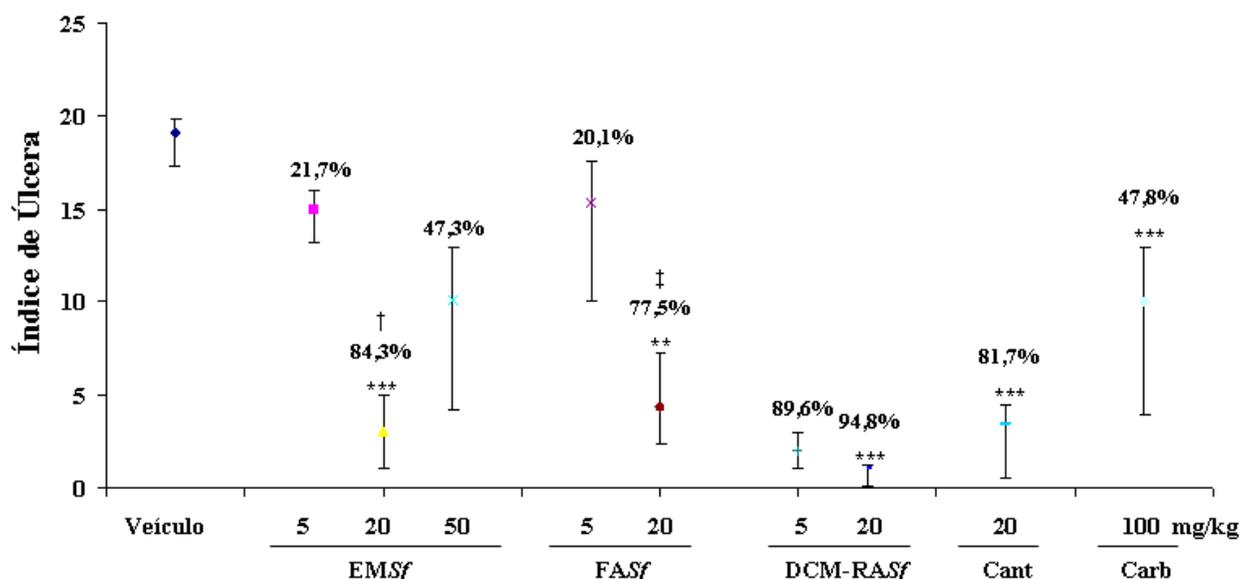


Figura 27 – Efeito da administração orogástrica do veículo, do EMSf (5 e 20 mg/Kg), FASf (5 e 20 mg/Kg), DCM-RASf (5 e 20 mg/Kg), cantinona (Cant) na dose de 20 mg/Kg, e a Carbenoxolona (Carb) (100 mg/Kg), sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (50 mg/Kg v.o) por 4 h em ratos. Cada ponto representa a mediana do índice de úlcera de grupos de 9-10 animais e as linhas verticais representam os quartis (1º e 3º). Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. **p<0,05, ***P<0,01 vs veículo; †p<0,05 vs EMSf; ‡p<0,05 vs FASf.

7.5.3 Úlcera Induzida por Etanol em Animais Pré-tratados com L-NAME

Na Figura 28 podem ser vistos os efeitos do pré-tratamento com L-NAME na resposta antiulcerogênica do EMSf, FASf, DCM-RASf, cantinona e carbenoxolona na úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos.

Os animais que receberam apenas veículo (tween 2%) apresentaram lesões gástricas com área de $9,5 \pm 1,3$ %.

Nos animais que receberam 20 mg/Kg de FASf, DCM-RASf e cantinona, as áreas ulceradas foram significativamente menores ($4,3 \pm 0,9$ %; $3,2 \pm 0,5$ % e $3,6 \pm 0,4$ %, respectivamente, $p < 0,05$) comparados com o grupo controle. A carbenoxolona (100 mg/Kg, vo) não reduziu de modo significativo a área ulcerada ($5,8 \pm 0,5$ %, $p > 0,05$) em relação ao controle.

A injeção intraperitoneal de 200 mg/Kg de L-arginina não causou alterações significativas da área ulcerada ($6,9 \pm 0,8\%$, $p > 0,05$), em relação ao controle.

O pré-tratamento com L-arginina também não alterou significativamente ($p \neq > 0,05$) a resposta antiulcerogênica do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona.

A injeção de 70 mg/Kg de L-NAME agravou significadamente as lesões gástricas induzidas por etanol embervada para $22,9 \pm 2\%$, $p < 0,001$, em relação ao grupo controle. Por outro lado, o pré-tratamento com L-NAME reverteu significativamente a gastroproteção observada para o EMSf, FASf, cantinona e carbenoxolona, passando os valores de área para ($5,8 \pm 1,5\%$, $\dagger\dagger p < 0,01$; $4,4 \pm 0,9\%$, $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$; $3,6 \pm 0,4$, $\dagger\dagger\dagger p < 0,001$ e $5,8 \pm 0,5\%$, $\dagger p < 0,05$, respectivamente) aos níveis do grupo veículo. A DCM-RASf não reverteu a úlceração provocada pelo L-NAME.

O tratamento com 200 mg/Kg L-arginina reverteu completamente o efeito deletério do L-NAME sobre a mucosa gástrica, passando a área lesada de $12,3 \pm 1,8\%$, $### p < 0,001$ para $22,9 \pm 2\%$, respectivamente, porém não reverteu significativamente ($\# p > 0,05$) a gastroproteção em animais pré-tratados com L-NAME, resultando em áreas úlceras de $13,1 \pm 1,8$; $11,3 \pm 1$; $8,7 \pm 1,3$; $11,7 \pm 0,8$ e $12,7 \pm 0,7$.

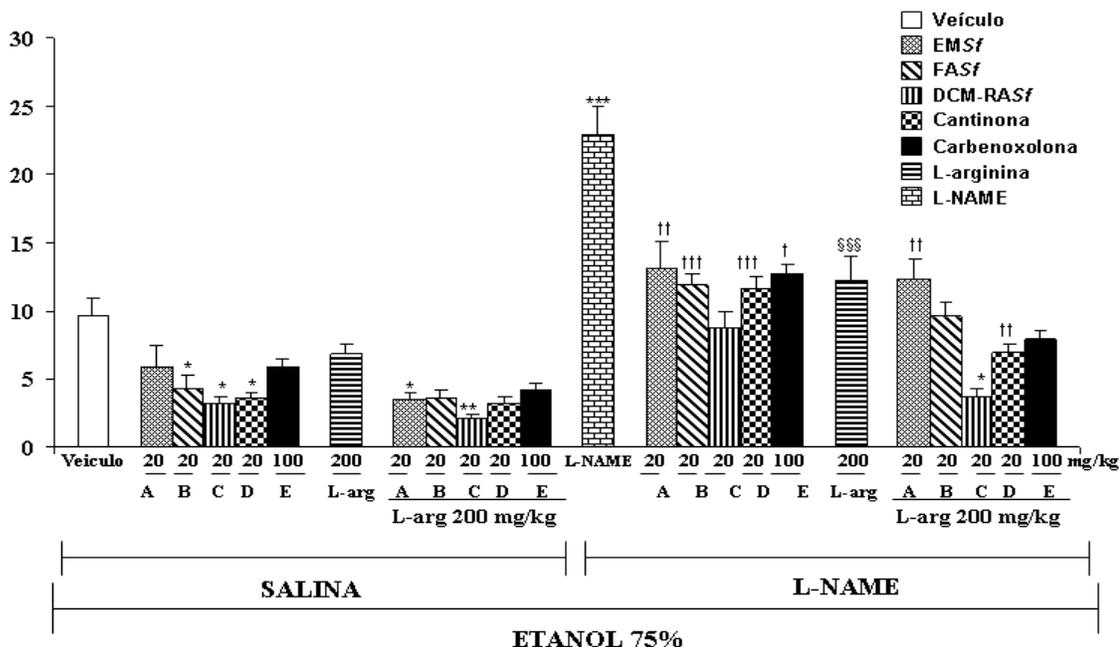


Figura 28. Efeito do EMSf, FASf, DCM-RASf, cantinona e carbenoxolona em lesões gástricas induzidas por etanol 75% em camundongos pré-tratados com L-NAME (70 mg/Kg, ip) e/ou salina. Cada coluna representa a Média \pm E.P.M de 7-9 animais, ANOVA uma via, seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. Veículo (salina); † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, ††† $p < 0,001$ vs. L-NAME; §§§ $p < 0,001$ L-arginina vs L-NAME; ‡ $p > 0,05$ L-arginina vs Sem L-arginina (Salina); # $p > 0,05$ L-arginina vs sem L-arginina (L-NAME).

7.5.4 Determinação da atividade antioxidantes

7.5.4.1 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Na Figura 29, podem ser vistos os valores da MPO em animais pré-tratados com EMSf, frações (FASf, DCM-RASf), cantinona e carbenoxolona, que recebem indometacina como agente ulcerogênico.

O nível de MPO no grupo veículo foi de $35,2 \pm 1,27$ U/g tecido.

Com 50 mg/Kg do EMSf e 20 mg/Kg de FASf, DCM-RASf e cantinona verificou-se redução significativa ($p < 0,001$) dos níveis de MPO ($23,2 \pm 0,7$; $22,6 \pm 1,2$; $19,9 \pm 1$ e $23,2 \pm 0,3$ U/g tecido, respectivamente) em relação ao controle; além do mais a FASf (20 mg/Kg, vo), DCM-RASf (20 mg/Kg, vo) e cantinona (20 mg/Kg, vo) mostraram-se mais potentes ($\dagger\dagger\dagger p < 0,001$) que o EMSf (20 mg/Kg, vo) em reduzir os níveis de MPO.

A carbenoxolona (100 mg/Kg) não reduziu de modo significativo os níveis de MPO quando comparados ao controle ($30,8 \pm 0,81$ U/g tecido - $p < 0,05$).

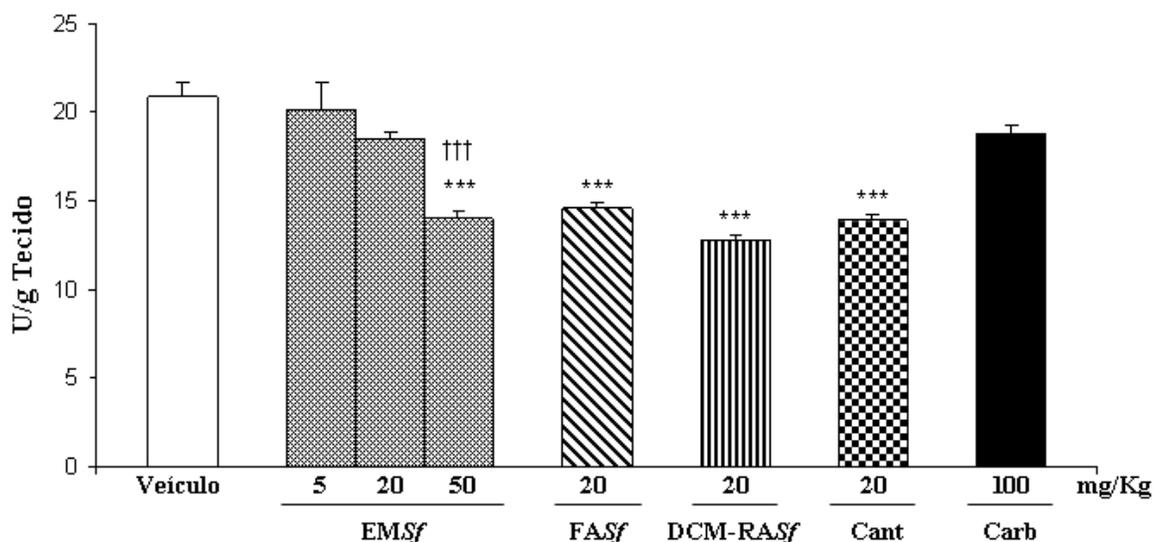


Figura 29. Efeito do extrato metanólico de *Simaba ferruginea* (EMSf – 5, 20 e 50 mg/Kg, vo), fração alcaloídica de *Simaba ferruginea* (FASf – 20 mg/Kg, vo), fração diclorometano-resíduo alcalino de *Simaba ferruginea* (DCM-RASf – 20 mg/Kg, vo), cantinona (Cant – 20 mg/Kg, vo) e Carbenoxolona (Carb – 100 mg/Kg, vo) sobre os níveis de mieloperoxidase nas lesões gástricas induzidas por indometacina (50 mg/kg, v.o) em ratos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 7-8 animais, *** $p < 0,001$, vs veículo; ††† $p < 0,001$ vs EMSf.(ANOVA seguido do teste de Student Newman Keul).

7.5.4.2 Determinação do Malonaldeído (MDA)

Na Figura 30 podem ser vistos os valores da MDA em animais pré-tratados com EMSf, frações (FASf, DCM-RASf), cantinona e carbenoxolona, que recebem indometacina como agente ulcerogênico.

O grupo que recebeu o veículo mostrou aumento no nível de MDA ($30,7 \pm 3,8$ nmol/g de tecido) após úlcera induzida por indometacina (50 mg/Kg, v.o).

O EMSf (5, 20 e 50 mg/kg, vo) e FASf (20 mg/kg, vo), foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,001$) os níveis de MDA ($15,7 \pm 2,6$; $12,4 \pm 2,3$; $6,13 \pm 1,2$ e $10,1 \pm 2,7$ $\mu\text{mol/g}$ tecido respectivamente) em relação ao controle. Na dose de 20 mg/Kg de cantinona e DCM-RASf foram capazes de atenuar a produção de MDA em $20,1 \pm 1,4$ ($p < 0,01$) e $23,7 \pm 2,9$ ($p < 0,05$) $\mu\text{mol/g}$ tecido, respectivamente em relação ao grupo controle.

A carbenoxolona (100 mg/Kg) reduziu de modo significativo os níveis de MDA quando comparados ao controle (10 ± 1 U/g tecido - $p < 0,001$).

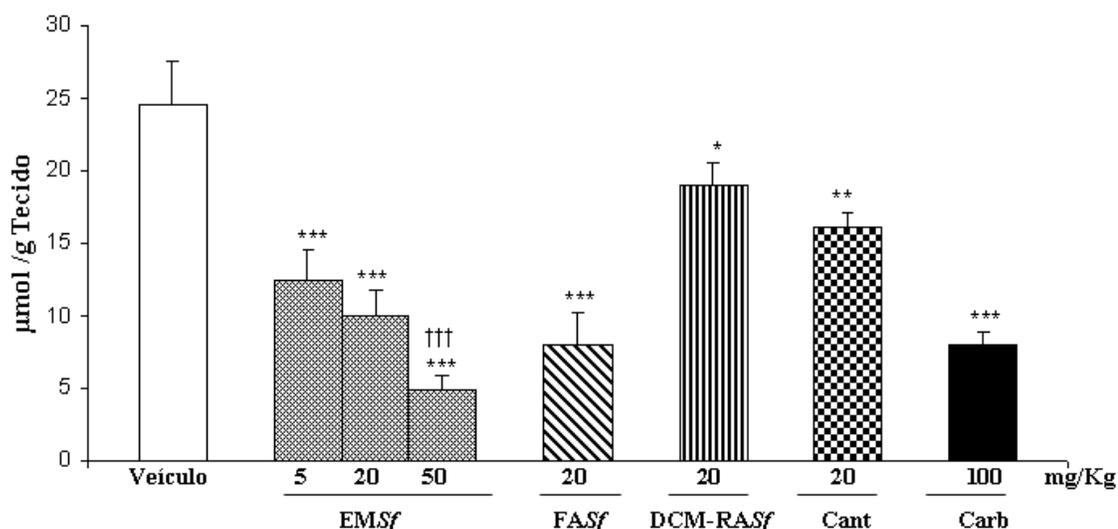


Figura 30. Efeito do extrato metanólico de *Simaba ferruginea* (EMSf), fração alcaloídica de *Simaba ferruginea* (FASf), fração diclorometano-resíduo alcalino de *Simaba ferruginea* (DCM-RASf), cantinona (Cant) e Carbenoxolona (Carb) sobre os níveis de malonaldeído nas lesões gástricas induzidas por indometacina (50 mg/kg, v.o) em ratos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 7-8 animais, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs veículo; ††† $p < 0,001$ vs EMSf (ANOVA seguido do teste de Student Newman Keul).

7.5.5 Determinação dos níveis de IL-8, TNF- α e PGE₂

Na Tabela 3 podem ser vistos os efeitos do EMSf, frações (FASf e DCM-RASf), cantinona e carbenoxolona, sobre os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α e sobre os níveis de PGE₂ da mucosa gástrica de ratos ulcerados com indometacina.

No grupo veículo, tratado com 50 mg/Kg de indometacina, os níveis de IL-8 foram de 37,3 \pm 8,2 pg/mL, enquanto os níveis de TNF- α foram abaixo dos limites de detecção (<5 pg/mL).

Nos animais tratados com EMSf e FASf na dose de 20 mg/Kg, os níveis de IL-8 foram de 30,3 \pm 5,6 e 21,08 \pm 4,1 pg/mL, respectivamente, não diferindo estatisticamente ($p>0,05$) do grupo controle. Ao contrário, os ratos que receberam 20 mg/Kg de cantinona apresentaram níveis de IL-8 (13,4 \pm 3,8 pg/mL) significativamente menores ($p<0,05$) do que no grupo controle, resultado semelhante ao observado no grupo tratado com 100 mg/Kg de carbenoxolona (13,1 \pm 3,6 pg/mL, $p<0,05$).

A administração oral de 50 mg/Kg de indometacina ao grupo veículo, apresentou níveis de PGE₂ da mucosa gástrica de 8,9 \pm 1,4 ng/g de tecido.

O tratamento com o EMSf (5, 20 e 50 mg/kg), frações (FASf e DCM-RASf), cantinona e carbenoxolona, não alteraram os níveis de PGE₂ nos animais submetidos a úlcera por indometacina (6,5 \pm 0,6; 6,9 \pm 0,6; 6 \pm 0,2; 5,6 \pm 0,6; 8,4 \pm 1,2; 7 \pm 0,7; 7,4 \pm 0,7 ng/g de tecido, respectivamente), mantendo o conteúdo de PGE₂ nos mesmos níveis que o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 Efeito de EMSf, FASf, DCM-RASf, cantinona e carbenoxolona, sobre os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α e de PGE₂, da mucosa gástrica, de ratos ulcerados com indometacina.

Grupos	Dose (mg/Kg)	IL-8 (pg/mL)	^a TNF- α (pg/mL)	PGE ₂ (ng/g tecido)
Veículo		37,3±8,2	0	8,9±1,4
EMSf	5	-	-	6,51±0,6
EMSf	20	30,31±5,6	0	6,9±0,6
EMSf	50	-	-	6±0,2
FASf	20	21,08±4,1	0	5,6±0,6
DCM-RASf	20	-	-	8,4±1,2
Cantinona	20	13,46±3,8*	0	7,0±0,7
Carbenoxolona	100	13,17±3,6*	0	7,4±0,7

Os valores representam a média \pm E.P.M. de 7-9 animais/grupo. ANOVA uma via, seguido do teste de Student Newman Keul. * $p < 0,05$. ^a Indica que os valores ficaram abaixo da linearidade da curva de detecção, com base na curva de calibração para cada citocina. - grupos não utilizados no experimento.

7.6 Ensaios *in vitro*

7.6.1 Avaliação da atividade anti- *Helicobacter pylori* do EMSf, FASf, DCM-RASf e Cantinona, pelo método de difusão em disco.

Na tabela 4, o EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona nas doses de 25 a 400 μ g/disco não inibiram o crescimento do *H. pylori*.

A claritromicina (15 μ g/disco), padrão para este teste, inibiu o crescimento do *H. pylori*, apresentando halos de inibição, variando de 15 a 16 mm.

Tabela 4. Avaliação da atividade anti- *Helicobacter pylori* do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, pelo método de difusão em disco.

Planta	Droga	Diâmetro dos halos de inibição (mm) ^a					Claritromicin
		Dose (μ g/disco)					
<i>Simaba ferruginea</i>		25	50	100	200	400	
	EMSf	-	-	-	-	-	16
	FASf	-	-	-	-	-	14
	DCM-RASf	-	-	-	-	-	16
	Cantinona	-	-	-	-	-	15

^aConsiderados ativos halos de inibição ≥ 10 mm (Carvalho, 2003).

- Sem formação de halo de inibição.

7.6.2 Atividade anti- *Helicobacter pylori* do EMSf, FASf, DCM-RASf e Cantinona pelo método concentração inibitória mínima (CIM).

Na Tabela 5 demonstra a atividade anti *H. pylori* do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona.

Após um período de 72 h de incubação das placas de 96 poços inoculadas com *H. pylori*, e tratadas com o EMSf, DCM-RASf e cantinona apresentaram CIM >400 µg/mL, enquanto a FASf a CIM foi de 200 µg/mL.

Tabela 5 Avaliação da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* do EMSf, FASf, DCM-RASf e Cantinona, pelo método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

<i>Simaba ferruginea</i> St Hil				
CIM em µg/mL	EMSf	FASf	DCM-RASf	Cantinona
	> 400	200	> 400	> 400

VIII DISCUSSÃO

Historicamente, a maioria das plantas medicinais foram introduzidas nas primeiras farmacopéias por sua utilização terapêutica, sendo muitas delas utilizadas no tratamento dos distúrbios gastrintestinais¹⁷⁰. No Brasil, diversos extratos vegetais são utilizados na medicina popular para o tratamento de desordens digestivas, incluindo úlceras gástricas^{171,172,173}.

Dentre as principais classes de constituintes químicos bioativos capazes de oferecer gastroproteção, encontram-se os alcalóides, xantonas, saponinas e taninos^{174,175,176,177,178}. A *Simaba ferruginea* St Hil é um subarbusto, do cerrado matogrossense, pertencente a família Simaroubacea, para a qual já foram descritas atividades farmacológicas tais como, antiulcerogênica e analséica^{33,34}, interferência no desenvolvimento embrionário³⁵ e antilipidêmica³⁶, apresentam em seu rizoma o predomínio de compostos alcaloídicos, como a cantinona e a 4 metoxi-6-cantinona da classe dos alcalóides indólicos, para as quais também já foram demonstradas atividades antiulcerogênica e analgésica periférica³⁴. Esta classe de metabólitos secundários (alcalóides) apresenta grande importância econômica e farmacológica, tendo como exemplos a vincristina e vimblastina, alcalóides com atividade antineoplásica isolados da *Catharanthus roseus*; ergotamina que é utilizada para tratamento da enxaqueca devida atividade adrenérgica sobre receptores α -2, isolada da *Claviceps purpurea*; ajmalicina (*Rauwolfia serpentina*) e ioimbina (*Pausinystalia yohimbe*) agentes simpatolíticos utilizados para hipertensão e impotência masculina respectivamente; entre vários outros alcalóides indólicos com significativa atividade terapêutica^{179,180,181}.

A busca de novos fármacos antiulcerogênicos, mais eficazes e menos tóxicos do que os medicamentos atuais no mercado, como os antiácidos, inibidores da bomba de prótons, anticolinérgicos e antagonistas histaminicos H₂, que produzem diversos efeitos adversos, tais como ginecomastia, alterações hematopoiéticas, nefrite intersticial aguda¹⁸², trombocitopenia¹⁸³, reações de anafilaxia¹⁸⁴ nefrotoxicidade e hepatotoxicidade¹⁸⁵, motivou a essa investigação voltada a elucidação do(s) possível (is) mecanismo(s) farmacológico(s) envolvido(s) nas ações de frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona, obtidos do EMSf, por sua vez preparado do rizoma de *Simaba ferruginea*.

No entanto antes da realização dos testes experimentais em animais, para verificar a possível atividade e mecanismo(s) de ação antiúlcera dos preparados do rizoma de *Simaba ferruginea*, avaliou-se seus potenciais citotóxicos *in vitro*, utilizando o método do MTT.

Os programas de desenvolvimento de fármacos envolvem, além da pesquisa das atividades farmacológicas, o estudo da citotoxicidade dos mesmos. Ambos são importantes para indicar seu potencial terapêutico e sua segurança¹⁸⁶.

A citotoxicidade foi definida por NARDONE¹⁸⁷ como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos¹⁸⁸, pois os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um composto é um requisito importante, quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico¹⁸⁹.

No ensaio de citotoxicidade, utilizando-se linhagem celular Hep G₂, o EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona apresentaram CI₅₀ >100 µg/mL, indicando que estes preparados não apresentaram citotoxicidade relevante¹⁵⁹.

A formação de lesões ulcerativas em modelos experimentais utilizando animais (ratos e camundongos), assim como as decorrentes em humanos, envolve a explicação clássica, de que elas são provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa gástrica⁸⁵. Assim, os modelos experimentais utilizado neste trabalho, foram selecionados por envolverem diferentes mecanismos, conhecidos na indução de lesões gástricas.

Nos ensaios antiúlcera foram utilizadas doses de no máximo 100 mg/Kg, via oral, para o EMSf, FASf, DCM-RASf e de 20 mg/Kg para cantinona. MARCELLO³³, em experimentos anteriores, demonstrou baixa toxicidade aguda (DL₅₀ = 1.800 mg/Kg) e subcrônica orais (doses de até 100 mg/Kg), em camundongos e ratos, respectivamente, para o extrato etanólico de *S. ferruginea*.

Após os testes de citotoxicidade, procedeu-se com os testes *in vivo* com o EMSf, FASf, DCM-RASf e a cantinona, utilizando modelos experimentais de lesões gástricas que mimetizam as úlceras gástricas em humanos, como as lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina, possibilitando também as dosagens de óxido nítrico, mieloperoxidase e malonaldeído.

A úlcera gástrica induzida por etanol é um modelo clássico de avaliação de drogas com atividade antiulcerogênica/citoprotetora⁷⁴. Este modelo de úlcera é importante pois, o etanol é um dos principais agressores da mucosa gástrica. O etanol é conhecido como toxina entérica, afetando a estrutura e função de vários elementos do trato gastrointestinal, além de causar efeitos no sistema nervoso central humano. Entre as complicações mais graves do trato gastrointestinal, que podem ser provocadas pelo consumo indiscriminado e de forma crônica de etanol, estão a gastrite e as úlceras gástricas (caracterizadas por edema na mucosa, hemorragia, infiltrado inflamatório e aumento da permeabilidade vascular), refluxo gastro-esofágico, diarreia (efeito sobre a absorção de nutrientes no intestino) e pancreatite crônica^{190,191,192,108}.

Desta maneira, o mecanismo da lesão induzida por etanol é considerado multifatorial e pesquisas implicam o envolvimento neste modelo de mediadores pró-inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos, óxido nítrico e neuropeptídeos), tióis intracelulares e cálcio, fatores hormonais (colecistocinina, gastrina, leptina e grelina), e fatores de crescimento (EGF e TGF), além da estimulação simpática¹⁹³, incluindo ainda a redução da secreção de bicarbonato e da produção de muco¹⁹⁴, danos ao fluxo sanguíneo gástrico e lesão de células da mucosa¹⁹⁵. Estas lesões gástricas estão também associadas à produção excessiva de radicais livres, que atacam constituintes celulares essenciais como ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos¹⁹⁶. O aumento do conteúdo de peróxidos lipídicos e radicais livres derivados de oxigênio resulta em alterações significativas em nível celular e causa danos às membranas, morte celular, esfoliação e erosão epitelial¹⁹⁵.

No modelo de indução de úlcera gástrica por etanol 75%, o EMSf, Frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona, administrados via oral, preveniram as lesões gástricas induzidas por etanol em todas as doses testadas, indicando possível atividade citoprotetora destes e confirmando os resultados preliminares de NOLDIN et al.³⁴ para o EMSf, FASf e cantinona.

Neste modelo, a cantinona mostrou-se mais ativa que os demais preparados de *Simaba ferruginea*, indicando que a mesma responde, pelo menos em parte, pelo efeito antiúlcerosa

verificado para o EMSf e FASf. A fração DM-RASf apresentou 80 % de inibição na úlcera por etanol e 94,8 % de área de inibição na úlcera por indometacina, indicando que na ação antiúlcera do EMSf estão envolvidos outros compostos que não só os de natureza alcaloídica.

As injúrias gástricas provocadas pelo etanol, também reduzem efetivamente os níveis de NO na mucosa gástrica¹⁹⁷. O NO, considerado um dos maiores agentes endógenos defensivos da mucosa gástrica, é sintetizado pela enzima NOS, a partir da L-arginina^{121,122}, participando da regulação da secreção do ácido gástrico e modulação da integridade da mucosa gástrica, juntamente com as prostaglandinas^{198,130,131}.

O papel do óxido nítrico no trato gastrointestinal ainda é controverso, porém estudos demonstram que no estômago, a inibição da síntese de NO torna a mucosa gástrica mais susceptível a injúria, enquanto a administração de doadores de NO protege o estômago⁷⁸. Desta maneira, 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 como etanol¹⁹⁷.

Sabendo-se da participação do NO na proteção gástrica, foi verificada se esta pequena molécula está envolvida, de alguma forma, na possível citoproteção gástrica do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona. O tratamento dos animais com FASf, DCM-RASf e cantinona, reduziu as lesões ulcerativas induzidas pelo etanol, sendo este efeito prontamente revertido pelo tratamento prévio com L-NAME, indicando possível participação do NO no efeito gastroprotetor destes.

Além do NO, outro importante sistema de defesa do trato gastrointestinal é a prostaglandinas. As prostaglandinas E₂ e I₂ atuam aumentando a produção do muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo e diminui a secreção ácida gástrica^{199,200}.

O uso crônica de AINEs é freqüentemente associado com o desenvolvimento de efeitos adversos gastrintestinais, tais como úlceras gástricas e duodenais e complicações graves, como hemorragia gastrointestinal ou perfuração, constituindo um dos maiores responsáveis pela incidência das lesões gástricas em humanos²⁰¹.

As úlceras gástricas causadas por AINEs, envolvem basicamente, mecanismos de inibição das ciclooxigenases I e II, de maneira a promover redução da produção de prostaglandinas gastroprotetoras. Ao inibirem a ciclooxigenase, os AINES reduzem a

capacidade da mucosa gástrica de resistir a lesões induzidas por agressores endógenos e exógenos. A indometacina, um representante da família dos AINEs, causa úlceras gástricas através de vários processos, incluindo inibição da síntese de PGs, geração de EROs, o início da peroxidação lipídica, infiltração de leucócitos, além da indução de apoptose.¹²⁶

As PGs modulam muitos dos componentes de defesa da mucosa: elas estimulam a secreção de muco e bicarbonato, eleva o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, aumenta a resistência das células epiteliais contra as lesões induzidas por citotoxinas²⁰² e suprimir o recrutamento de leucócitos para a mucosa^{203,204}. As PGs também podem regular o lançamento de um número de outros mediadores inflamatórios que possam contribuir para a geração de lesão da mucosa em certas circunstâncias. Por exemplo, a PGE₂, tem se mostrado um potente inibidor do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) liberados pelos macrófagos^{205,206} e do leucotrieno B4 e liberação de IL-8 liberados por neutrófilos^{207,208}.

No experimento de úlceras gástricas induzidas por indometacina em ratos, foi evidenciada a capacidade gastroprotetora do EMSf, Frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona, sendo suas atividades antiulcerogênicas significativamente maiores do que a carbenoxolona. Neste modelo, a fração DCM-RASf mostrou-se mais ativa que os demais preparados de *S. ferruginea*, indicando a participação de outros compostos, possivelmente pertencente a outras classes de metabólitos, que não os alcalóides, na ação antiúlcera do EMSf.

Para avaliar a participação da PGE₂ na ação antiulcerogênica do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, a PGE₂ foi determinada na mucosa gástrica de ratos através da úlcera induzida por indometacina. Nesse ensaio, apesar de apresentarem uma tendência de aumento dos níveis de PGE₂, o EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, mostraram-se inativos, assim como a carbenoxolona. Esses resultados sugerem que o efeito antiúlcera dos preparados de *S. ferruginea* independe do aumento da síntese/ação da PGE₂.

As EROs mediadas pela peroxidação lipídica são uma das principais causas de lesões gastrintestinais induzidas por indometacina²⁰⁹. O comprometimento estrutural e funcional das mitocôndrias (patologia mitocondrial) induzido por indometacina leva ao estresse oxidativo mitocondrial associado com a geração de EROs intramitocondrial. A perda estrutural e funcional das mitocôndrias é comum em danos celulares por estresse oxidativo¹⁹⁸. Muitos agentes antioxidantes, como vitamina C, óleos vegetais, alfatocoferol, etc, têm sido relatados como protetor da gástrica mucosa contra ulcera gástrica provocada por indometacina²¹⁰.

Pequenas quantidades de radicais livres de oxigênio são normalmente produzidas endogenamente como subprodutos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e outras reações metanólicas no corpo. Células têm os seus sistemas de limpeza para neutralizar os radicais livres produzidos. Alterações no equilíbrio entre a produção de radicais livres e habilidade de limpeza são responsáveis por causar injúrias celulares²¹¹. Os radicais livres e, em particular, o radical hidroxila iniciam a peroxidação das membranas celulares, liberando ácido araquidônico e radicais livres lipídios peroxil²¹². O ácido araquidônico é metabolizado pela cicloxigenase em tromboxano, prostaglandinas do tipo E₁ e I₂, ou pela lipoxigenase, em leucotrienos do tipo LTB₄, C₄, D₄ e E₄. O radical peroxil promove lipoperoxidação adicional, retirando um hidrogênio do ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia, cujo produto final é o malonaldeído -MDA²¹³.

Os radicais livres podem, também, atuar de forma indireta, atraindo e ativando neutrófilos nos tecidos envolvidos. Os neutrófilos são a maior fonte endógena de radicais livres na mucosa gástrica de humanos ou animais²¹⁴. A enzima MPO é considerada um marcador enzimático de neutrófilos e é fonte de radicais livres. O aumento na atividade dessa enzima indica aumento na geração de radicais livres²¹¹. Uma vez nos tecidos, após estímulos pró-inflamatórios, os neutrófilos sofrem um processo de degranulação com a liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (armazenada nos grânulos azurófilos). A enzima MPO atua na presença do ânion superóxido e do ânion cloreto (Cl⁻) para formar o ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso apresenta intensa ação tóxica sobre as bactérias, sendo também lesivo para as células do tecido²¹⁵.

A fim de avaliar-se a possível ação antioxidante do EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona em tecido gástrico de ratos lesados por indometacina, parâmetros de estresse oxidativo como MPO (indicador de enzima pró-oxidante) e MDA (peroxidação lipídica), foram determinados.

O pré-tratamento dos animais ulcerados com indometacina com EMSf, frações (FASf, DCM-RASf) e cantinona reduziu significativamente os níveis de MDA, sugerindo a capacidade destes preparados em prevenir a formação de EROs e subsequente peroxidação lipídica da mucosa gástrica. Do mesmo modo, estes compostos reduziram os níveis de MPO, conferindo-lhes efeito protetor da mucosa gástrica e assim reduzindo o dano da mucosa gástrica pela liberação excessiva de radicais livres dos neutrófilos. Esses achados indicam que

a ação antioxidante destes preparados contribui com o efeito antiúlcera observado para os mesmos.

A queda na produção intrínseca de PGs na mucosa gástrica e outros fatores, tais como o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, TNF- α , IL-1 β) na mucosa gástrica^{216,217} e no plasma²¹⁸, o aumento da produção de EROs, aumento da peroxidação lipídica bem como o aumento da infiltração da mucosa de neutrófilos, estão intimamente associados com a lesão gástrica induzida por AINES^{216,217}.

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa que medeiam muitas das funções dessas células, produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos²¹⁹.

A citocina pró-inflamatória IL-8 é uma potente ativadora de neutrófilos (quimiocina) e monócitos e tem seu nível de expressão gênica relacionado à intensidade da úlcera gástrica²²⁰. A IL-8 é produzida pelas células epiteliais gástricas durante processos patológicos^{221,222}. O TNF- α parece ser um factor-chave para muitas formas de lesão da mucosa gástrica, incluindo os associados a utilização de AINES⁷⁸ e etanol⁷⁹. Os níveis plasmáticos de TNF- α , ficam marcadamente aumentados após a administração de AINEs, desta maneira a inibição da síntese de TNF- α , resulta em redução dos efeitos lesivos desses agentes⁷⁸.

A cantinona reduziu significativamente os níveis plasmáticos da IL-8, enquanto o EMSf e FASf foram inativos, indicando que a redução da citocina pró-inflamatória (IL-8) pela cantinona, contribui para o efeito protetor deste alcalóide sobre a mucosa gástrica. Desse modo, pode-se afirmar que o efeito antiúlcera do EMSf e FASf independe de suas ações sobre a IL-8. Por outro lado não foi possível avaliar o efeito gastroprotetor do EMSf, FASf e cantinona, sobre os níveis de TNF- α , visto que nesse ensaio esta citocina encontra-se abaixo do limite de detecção.

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa espiral que coloniza o estômago e o duodeno humano e está associada com várias doenças gastroduodenais, incluindo gastrite, úlcera péptica e linfoma de mucosa gástrica²²³. Para estabelecer e manter a infecção, o *H. pylori* expressa uma variedade de diferentes tipos de fatores de manutenção, que permitem que a bactéria colonize e permaneça dentro do hospedeiro, bem como fatores de virulência,

que contribuem para os efeitos patogênicos da bactéria, com destaque para inflamação gástrica, rompimento da barreira da mucosa gástrica e alterações da fisiologia gástrica²²⁴.

Numerosos estudos têm se concentrado na erradicação da infecção pelo *H. pylori* usando plantas medicinais²²⁵, visto que as drogas utilizadas na prática médica atual no tratamento da úlcera gastroduodenal e/ou adenocarcinoma gástrico vêm apresentando resistência e têm levado a uma taxa de cura incompleta, além de apresentarem efeitos colaterais e alto custo no tratamento, em geral por múltiplos medicamentos^{226,227}.

Nesse estudo foi realizada a avaliação da atividade anti *H. pylori in vitro* do EMSf, frações (FASf e DCM-RASf) e cantinona pelos métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, considerados os testes mais comumente utilizados para triagem de compostos com potencial antibacteriano²²⁸.

O método da difusão em disco é recomendado para o estudo de substâncias polares, permitindo a avaliação de diferentes compostos contra um microorganismo e assim o estabelecimento de seu espectro antibacteriano. Para extratos não-polares, o uso da técnica de difusão parece ser inadequado, em virtude da dificuldade de difusão no ágar, embora muitos trabalhos com este tipo de técnica tenham sido publicados²²⁹.

Os resultados frente ao *H. pylori* pelo método de difusão em disco demonstram que o extrato (polar), frações (apolares) e cantinona (apolar) não apresentaram nenhuma atividade anti-*H. pylori in vitro*.

No método de microdiluição em caldo, os compostos são misturados ao meio líquido apropriado, previamente inoculado com o microorganismo, permitindo determinar se um composto é bacteriostático (mínima concentração bacteriostática) ou bactericida (mínima concentração bactericida – CIM). Apresenta maior sensibilidade às drogas do que o método de difusão em disco, por permitir o contato direto entre a droga e o microorganismo, sendo, portanto, apropriado para ensaios de substâncias polares e não-polares²²⁹.

Nos dois modelos experimentais, difusão em disco e microdiluição em caldo, o EMSf, DCM-RASf e cantinona não apresentaram atividade anti-*H. pylori in vitro*, indicando que estes preparados podem ser úteis em úlceras que não têm como agente etiológico o *H. pylori* ou mesmo serem utilizados como co-adjuvantes terapêuticos no tratamento de úlceras

gástricas provocadas por este microorganismo. Neste bioensaio, a FASf também mostrou-se inativa.

Por outro lado, a FASf apresentou moderada atividade anti-*Helicobacter pylori* no ensaio de microdiluição em caldo, indicando que a atividade contra esta bactéria deve-se à presença de outros alcalóides na FASf, que não a cantinona. Desse modo, faz-se necessário isolar outros alcalóides da FASf e avaliar seus potenciais em ensaios *in vivo*, de úlceras gástricas, tendo como agente indutor o *H. pylori*.

Os resultados obtidos nesse estudo com o EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, não apenas confirmam o uso popular do rizoma de *Simaba ferruginea* para o tratamento de lesões ulcerosas do trato gastrintestinal, como também ampliam o conhecimento farmacológico sobre o mecanismo envolvido nesta ação, fazendo desta planta uma promissora droga antiulcerogênica, inclusive apontando a cantinona como um dos compostos responsáveis por tais efeitos.

No entanto, fazem-se necessários a implementação de mais estudos utilizando outros modelos experimentais farmacológicos, tais como dosagem do muco gástrico, estudos anti-secretórios, dosagem da H^+ , K^+ - ATPase, outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) e antiinflamatórias (IL 4, IL 10), bem como de agentes sequestradores de radicais livres (antioxidantes) como a glutatona, catalase e superóxido desmutase, com o intuito de melhor compreender o mecanismo de ação dos preparados de *Simaba ferruginea*. Além do mais, é preciso continuar com as análises fitoquímicas do rizoma da planta, visando o isolamento e a identificação de outros compostos presentes nas frações (FASf e DCM-RASf) e assim poder avaliar o grau de contribuição destes no efeito antiúlceras do EMSf.

IX CONCLUSÕES

Com base na análise dos resultados obtidos e fundamentação teórica podemos concluir que:

- A FASf, DCM-RASf e o alcalóide cantinona foram obtidos do rizoma de *Simaba ferruginea*
- O EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona não apresentaram citotoxicidades *in vitro* relevantes, sugerindo baixa toxicidade para estes preparados;
- O EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona, apresentaram atividade antiulcerogênica nos modelos de úlcera gástrica induzido por etanol e indometacina, confirmando o uso popular e ampliando o conhecimento químico-farmacológico sobre *Simaba ferruginea*;
- A ação gastroprotetora do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona depende de suas inibições sobre o óxido nítrico e de seus efeitos antioxidantes;
- A inibição da IL-8 contribui para o efeito gastroprotetor da cantinona;
- O efeito gastroprotetor do EMSf e FASf independe da inibição dos níveis de IL-8;
- A ação gastroprotetora do EMSf, FASf, DCM-RASf e cantinona independe de suas ações sobre a PGE₂;
- O EMSf, DCM-RASf e cantinona não apresentaram atividade anti-*Helicobacter pylori* no ensaio de difusão em disco;
- No ensaio de microdiluição em caldo a FASf foi a única que inibiu o crescimento do *Helicobacter pylori*, indicando a presença de outros alcalóides ativos nesta fração;
- A cantinona é um dos princípios ativos presentes no rizoma de *Simaba ferruginea* e responde, pelo menos, em parte, pela ação antiúlcera do EMSf e FASf;
- O fracionamento do EMSf levou à potenciação do efeito antiúlcera;
- A presença de atividade antiúlcera na fração DCM-RASf indica que outros metabólitos secundários, de natureza não alcaloídica, estão presentes no rizoma de *Simaba ferruginea* e que também contribuem para o efeito antiúlcera do EMSf;

- Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*, somados aos achados descritos na literatura para *S. ferruginea*, indicam que para sua atividade antiúlcera estão envolvidos diferentes mecanismos de ação e grupos metabólitos.

X REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Firenzuoli F, Gori I, Neri D. Clinical phytotherapy: opportunities and problematics. Ann Ist.Super Sanita. 2005;41(1):27-33.
- 2 Li Y, Ohizumi Y. Search for constituents with neutrophilic factor potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. Yakugaku Zasshi. 2004;124 (7):417-424
- 3 Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences. 2005;78:431-441, 2005.
- 4 Kirkpatrick P. Stitching together naturally. Nature. 2002;1:748
- 5 Newmam DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as source of new drugs over period 1981-2002. J Nat Prod. 2003;66:1022-1037.
- 6 Downton C, Clark I. Statins-the heart of the matter. Nat Ver Drug Discov. 2003;2(5):343-344.
- 7 Maia MBS. Estudo da atividade antiinflamatória e outros efeitos farmacológicos relacionados de *Orbignia phalerata* MART [Dissertação – Mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.1987.
- 8 WHO. Traditional Medicine. 2003: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134>
- 9 Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 mai. 2006. Seção 1, p 20. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf> Acessado em 10/05/2010
- 10 Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.311, de 29 de setembro de 2006. Institui grupo de trabalho para elaborar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 out. 2006. Seção 2, p. 42.
- 11 Who - World health organization. who policy perspectives on medicines : medicina tradicional – necesidades crecientes y potencial. Geneva 2002: 6
- 12 Brasil. Ministério da Saúde. Site oficial. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780. Acesso em: 29 abr 2009
- 13 ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº- 10, de 9 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de

- Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 2010. Seção 1, p. 52.
- 14 Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 mai. 2006. Seção 1, p 20. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf> Acessado em 10/05/2010
- 15 Souza Brito AR.M. Manual de ensaios toxicológicos .in vivo. Campinas (SP): Editora da Unicamp, 1994.
- 16 Amorozzo MCM. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da UNESP, 1996:46-68.
- 17 Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the brazilian medicine for treatment of infectious disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (RJ), 2002;97 (7):1027-1031.
- 18 Vieira RF, Martins MVM. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: VIII Simpósio sobre o Cerrado. Brasília. Anais Brasília, EMBRAPA-CPAC, 1996:169-171.
- 19 Guarim Neto G, Morais RG. Medical plants resources in the cerrado of Mato Grosso state Brazil a review. Acta Bot. Bras. 2003;17(4):561-584
- 20 IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. <http://www.ibama.gov.br> acesso em 16/07/2009
- 21 Pereira G, Aguiar JLP, Moreira L, Bezerra HS. Área e população do Cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 1997;32(7):759-763
- 22 Cronquist A. An integrated System of Classification of the Flowering Plants. New York, Columbia University. 1981
- 23 *Flora brasiliensis* revisitada. <http://flora.cria.org.br>. Acesso em 20 de abril de 2010
- 24 Toma W, Gracioso JS, Andrade FDP, Hiruma-Lima CA, Vilegas W, Souza Brito AR. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). Biol. Pharm. Bull. 2002;25(9):1151-1155.
- 25 Tamura S, Fukamiya N, Okano M, Koyama J, Koike K. Three new quassinoids, ailantinol E, F, and G, from *Ailanthus altissima*. Chem Pharm Bull. 2003;51(4):385-389.
- 26 Muhammad I.; Bedir, E.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Khan, I. A.; Takamatsu, S.; Pelletier, J.; Walker, L. A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. J Nat Prod. 2004;67(5):772-777.

- 27 Saraiva RCG, Pinto AC, Nunomura SM, Pohlit AM. Triterpenos e alcalóide tipo cantinona dos galhos de *Simaba polyphylla* (CAVALCANTE) W.W. THOMAS (Simaroubaceae). Quim. Nova 2006; 29(2):264-8.
- 28 Lorenzi H, Matos AFJ. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo (SP): Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA;2002.
- 29 Joly AB. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo (SP): ed. Nacional, 5, 1979.
- 30 De La Cruz MGF. Plantas Medicinais Utilizadas por Raizeiros: Uma Abordagem Etnobotânica no Contexto da Saúde e Doença [Dissertação - Mestrado]. Cuiabá (MT): Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, 1997
- 31 Somavilla NS. Utilização de Plantas Medicinais por uma Comunidade Garimpeira do Sudeste Mato-Grossense, Alto Coité – Poxoréo/MT [Dissertação - Mestrado]. Cuiabá (MT): Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, 1998.
- 32 Souza LF. Estudo Etnobotânico na Comunidade de Baús: O Uso de Plantas Medicinais (Município de Acorizal, Mato Grosso). [Dissertação - Mestrado]. Cuiabá (MT): Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, 1998.
- 33 Marcello CM. Triagem antiúlcera de plantas medicinais usadas popularmente em Mato Grosso para afecções gastrointestinais e validação pré-clínica de *Simaba ferruginea* St. Hil. (calunga) como antiúlcera. [Dissertação - Mestrado]. Cuiabá (MT): Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, 2001
- 34 Noldin VF, De Oliveira Martins DT, Marcello CM, Da Silva Lima JC, Delle Monache F, Cechinel Filho, V. . Phytochemical and antiulcerogenic properties of rhizomes from *Simaba Ferruginea* St. Hill. (Simaroubaceae). Z Naturforsch C. 2005;60(9-10):701-6.
- 35 Barros WM. Efeito do extrato hidroetanólico dos rizomas da *Simaba ferruginea* St Hil. (Simaroubaceae), sobre o comportamento e reprodução de ratas da Linhagem Wistar [Tese – Doutorado]. São Paulo (SP): Santa Casa de São Paulo – Faculdade de Ciências Médicas; 2007.
- 36 Silva MAB. Levantamento etnobotânico e triagem hipolipidêmica de plantas medicinais do Cerrado Matogrossense: Avaliação da atividade hipolipidêmica da *Simaba ferruginea* St. Hil. e *Vochysia rufa* Mart [Dissertação - Mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso; 2009
- 37 Guyton AG, Hall JE. Fisiologia Humana e Mecanismos de Doenças. Rio de Janeiro. 6ª edição Ed. Guanabara Koogan; 1998.
- 38 Hogben CAM, Kent TH, Woodward PA, Sill AJ. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog cat, guinea pig, and frog. Gastroenterology. 1974;67:1143-54.
- 39 *Presente para o homem*. <http://www.presenteparahomem.com.br/o-corpo-humano-anatomia-e-funcoes-do-estomago>. Acessado em 20 de abril 2010.

- 40 Kutchai HC. O Sistema Gastrintestinal. In: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM. Fisiologia. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier: Rio de Janeiro, 2004:573-660.
- 41 Lucey MR, Yamada T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. *Dig Dis Sci.* 1989;34:5-13.
- 42 Chuang CN, Chen MC, Soll AH. Gastrin-histamine interactions: direct and paracrine elements. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1991;180:95-103.
- 43 Soybel DI. Anatomy and physiology of the stomach. *Surg Clin N Am.* 2005;85:875-894.
- 44 Schauf CL, Moffett DF, Moffett SB. O Trato Gastrintestinal. In: Fisiologia Humana. Rio de Janeiro. Ed Guanabara Koogan, 1993.
- 45 Boron WF, Waisbren SJ, Modlin IM, Geibel JP. Unique permeability barrier of the apical surface of parietal and chief cells in isolated perfused gastric glands. *J Exp Biol.* 1994;196: 347-360.
- 46 Fisiologia Animal Comparada. Funcionamento dos Sistemas Circulatório, Respiratório, Digestório e Excretor nos Diferentes Grupos Animais. [http://ava.ead.ftc.br/conteudo/circuito1/biologia/periodo5/01-fisiologia animal e comparada/bloco1/ tema2/ pagi na05 .html](http://ava.ead.ftc.br/conteudo/circuito1/biologia/periodo5/01-fisiologia%20animal%20e%20comparada/bloco1/tema2/pagi%20na05.html). Acessado em 20 abril de 2010.
- 47 Chen D, Aihara T, Zhao Chun-Mei, Håkanson R, Okabe S. Differentiation of the Gastric Mucosa. Role of histamine in control of function and integrity of oxyntic mucosa: understanding gastric physiology through disruption of targeted genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: 539-544.
- 48 Jain RN, Samuelson LC. Differentiation of the Gastric Mucosa. II. Role of gastrin in gastric epithelial cell proliferation and maturation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: 762-765.
- 49 Ganog WF. Review of medicinal physiology. San Francisco: Lange Medical Books, 21 ed., 2003.
- 50 Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcer, and Gastroesophageal Reflux Disease. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Laurence Bruton, John Lazo and Keith Parker, McGraw-Hill, United States, 11^a ed. 2006;869-882.
- 51 Cui G, Waldum HL. Physiological and clinical significance of enterochromaffin-like cell activation in the regulation of gastric acid secretion. *World J Gastroenterol.* 2007;13: 493-496.
- 52 SCHAUF CL, MOFFETT DF, MOFFETT SB. O Trato Gastrintestinal. In: **Fisiologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993
- 53 Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Ann Rev Physiol.* 2003;65:103-131.

- 54 Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55:137-54.
- 55 Soybel DI. Anatomy and physiology of the stomach. *Surg Clin N AM*. 2005;85:875-894.
- 56 Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Farmacologia Integrativa da Inflamação. In: Princípios em Farmacologia – A base Fisiopatológica da Farmacoterapia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª Ed, 2009.
- 57 Peckenpaugh NJ. Nutrição: Essência e Dietoterapia. 7.ed. São Paulo: editora Roca. 1997.
- 58 Abbas AK, Kumar V, Fausto N. ROBBINS & COTRAN Patologia bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª Ed, 2005.
- 59 Abitol RA. Doença ulcerosa péptica. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 24 abr 2009.
- 60 Kushima H. Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davila elliptica* St. e *Davila nitida* (Vahl) Kuitzki (Dilleniaceae). [Dissetação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 61 Zapata-Colindres JC, Zepeda-Gomez S, Montano-Loza A, Vazquez-Ballesteros E, Jesus-Villalobos J, Valdovinos-Andraca F. The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Can J Gastroenterol*. 2006;20:277-280.
- 62 Ramakrishnan K, Salinas RC. Peptic Ulcer Disease. *Am. Fam. Physician*. 2007;76:1005-1012.
- 63 Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001;39: 603-613.
- 64 Dong Mamie H, Kaunitz Jonathan D. Gastroduodenal mucosal defense. *Current opinion in gastroenterology*. 2006;22(6):599-606
- 65 Flemström G, Hällgren A, Nylander O, Engstrand L, Wilander E, Allen A. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 1999;277:375-382.
- 66 Mojzis J, Hegedusova R, Mirossay L. Role of muçus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosa injury in rats. *Physiol. Res*. 2000;49:441-46.
- 67 Mia Phillipson M, Atuma C, Henriksnäs J, Holm L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(2):211-219.
- 68 Takeuchi K, Aihara E, Sasaki Y, Nomura Y, Ise F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(4):661-76.

- 69 Kagawa S, Aoi M, Kubo Y, Kotani T, Takeuchi K. Stimulation by Capsaicin of Duodenal HCO₃ Secretion via Afferent Neurons and Vanilloid Receptors in Rats Comparison with Acid-Induced HCO₃ Response. *Dig Dis Sci.* 2003;48(9):1850–1856.
- 70 Szabo S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. *J Clin Gastroenterol.* 1991;13:21-34.
- 71 Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *Faseb J.* 1996;10:731-740.
- 72 Wu WKK, Cho CH. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci.* 2004;94:348-358.
- 73 Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Clarendon Press, 1989.
- 74 Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2002;35:523-534.
- 75 Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology e Medicine* 1997;23(1): 8-18.
- 76 Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am. J. Physiol.* 1988;254:768-74.
- 77 Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-mediated mucosal injury role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci.* 1988;33(3):6-15.
- 78 Martin GR, Wallace JL. Gastrointestinal Inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med.* 2006;231: 130-137.
- 79 Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(1):39-50.
- 80 Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology.* 1979;77:433-443.
- 81 Szelenyl, I.; Brune, K. Possible role of sulfhydryls in mucosal protection induced by aluminum hydroxide. *Dig Dis Sci* 31: 1207-1210, 1986.
- 82 Dey I, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol.* 2006;149:611-623.
- 83 Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(1):39-50.

- 84 Wallace JL, MA L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense e injury. *Exp Biol Med.* 2001; 226: 1003-1115.
- 85 Maity, P.; Biswas, K.; Roy, S.; Banerjee, R.K.; Bandyopadhyay, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanism update. *Mol Cell Biochem.* 2003;253:329-338.
- 86 Holzer P. Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol.* 2000;16:469–478.
- 87 Elliott SN, Wallace JL. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol.* 1998;33:792-803.
- 88 Kurtel H, Ghandour S. Endothelins and inflammation: the gastrointestinal system. *Pathophysiology.* 1999;6:77–89.
- 89 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-42.
- 90 Lehninger A. *Princípios da bioquímica.* 3ª ed. Editora Sarvier. São Paulo(SP); 2002.
- 91 Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expression nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991;351:714-8.
- 92 Moncada S. Nitric Oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *An New York Acad Sci.* 1997; 811: 60-7.
- 93 Tibiriça E. *Fisiopatologia em medicina cardiovascular.* 1º ed. Editora Revinter. Rio de Janeiro(RJ), 2001.
- 94 Moncada S. Physiological effects of nitric oxide. *J Hypertens.* 1994;12:35-9.
- 95 Takeuchi K, Kato S, Tanaka A. Gastrointestinal protective action of prostaglandin E2 and EP receptor subtypes. In: *Frontiers of Gastrointestinal Research* (Edited by Cho CH, Wang JY). 2002;25:227-242.
- 96 Natale G, Lazzeri G, Lubrano V, Colucci R, Vassalle C, Fornai M, Blandizzi C, Taccab MD. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195:62– 2.
- 97 Nishio H, Hayashi Y, Terashima S, Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. *Life Sciences.* 2006;79:1523–1530.
- 98 Bayir Y, Odabasoglu F, Cakir A, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine.* 2006;13:584–590.

- 99 Sugamoto S, Kawauch S, Furukawa O, Mimaki H, Takeuchi K. Role of Endogenous Nitric Oxide and Prostaglandin in Duodenal Bicarbonate Response Induced by Mucosal Acidification in Rats. *Dig Dis Sci*. 2001;46(6):1208–1216.
- 100 Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Tsujii 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*. 1995;108:58-64.
- 101 Kunkel SL. Th1 and Th2-type cytokines regulate chemokine expression. *Biological Signals*. 1996;5:197-202.
- 102 Mózsik G, Jávör T: A biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease. I. A model study of ethanol-induced injury to gastric mucosa in rats. *Dig Dis Sci*. 1988;33:92-105.
- 103 Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS: *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut*. 1994;35:179-185.
- 104 Ding SZ, Lam SK, Yuen ST, Wong BC, Hui WM, Ho J, Guo X, Cho CH: Prostaglandin, tumor necrosis factor alpha and neutrophils: causative relationship in indomethacin-induced stomach injuries. *Eur J Pharmacol*. 1998; 348:257-163.
- 105 Hooderwerf WA, Pasricha PJ: Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers, and gastroesophageal reflux disease. In Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics Edited by: Brunton L. New-York: Mc Graw-Hill; 2006:967-981.
- 106 Gerke P, Hapke U, Rumpf HJ & John U. Alcohol-related diseases in general hospital patients *Alcohol and Alcoholism*. 1997;32:179–184.
- 107 Guslandi M. Effect of ethanol on the gastric mucosa. *Dig. Disg*. 1987;5:21-32.
- 108 Siegmund S, Teyssen S, Singer MV. Alkoholassozierte Organschäden. Gesundheitliche Folgen durch moderaten Alkoholkonsum. *Internist*. 2002;43:287–293.
- 109 Davenport HW. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acid, aspirin, and alcohol. *Gastroenterology*. 1969;56:439–449.
- 110 Macmath TL. Alcohol and gastrointestinal bleeding. *Emerg Med Clin North Am*. 1990;8(4):859-872.
- 111 Bode C, Bode JC. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. *Alcohol Health Res World*. 1997;21(1):76-83.
- 112 Santos FA, Rao VS. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Dig Dis Sci*. 2001;46:331-337.
- 113 Bou-Abboud, C.F, Wayland H, Paulsen G, Guth PH. Microcirculatory stasis preceds tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat. *Dig Dis Sci*. 1988;33:872–877.

- 114 Oates PJ, Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology*. 1988;94:10-21.
- 115 Peskar BM, Ehrlich K, Peskar BA. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301:969-974.
- 116 Samonina GE, Kopylova GN, Lukjanzeva GV, Zhuykova SE, Smirnova EA, German SV, Guseva AA. Antiulcer effects of amylin: a review. *Pathophysiology*. 2004;11:1-6.
- 117 Cho CH, Hua MF, Chou CK, Ho LT. Protection of zinc sulphate against necrosis induced by ethanol in rats. *Proc Natl Sci Counc*. 1983;7:261-267.
- 118 Ishihara K, Kuwara H, Ohara S, Ohkawa H, Okabe H, Hotta K. Mucus glycoprotein and mucosal protection. *J Clin Gastroenterol*. 1988;10:24-27.
- 119 Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem*. 2007;50:1425-1441.
- 120 Okazaki M, Shimizu I, Ishikawa M, Fujiwara S, Yamamoto H, Shiraishi T, Horie T, Iuchi A, Ito S. Gastric mucosal levels of prostaglandins and leukotrienes in patients with gastric ulcer after treatment with rabeprazole in comparison to treatment with ranitidine. *J Med Invest*. 2007;54: 83-90.
- 121 Wallace J L, Bak A, Mcknight W, Asfaha S, Sharkey KA, Macnaughton WK. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology*. 1998;115:101-109.
- 122 Takahashi S, Shigeta JI, Inoue H, Tanabe T, Okabe S. Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats. *Am J Physiol*. 1998;275:1137-1145.
- 123 Savoye G, Miralles-Barrachina O, Déchelotte P, Belmonte-Zalar L, Brung-Lefebvre M, Zalar A, Hochain P, Hervé S, Colin R, Lerebours E, Ducrotté P. Low levels of gastric mucosal glutathione during upper gastric bleeding associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13:1309-1313.
- 124 Brzozowski T, Konturek PS, Śliwowski Z, Kwiecień S, Drozdowicz D, Pawlik M, Mach K, Konturek SJ, Pawlik WW. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) with *Helicobacter pylori* in the stomach of humans and experimental animals. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57:67-79.
- 125 Okazaki M, Shimizu I, Ishikawa M, Fujiwara S, Yamamoto H, Shiraishi T, Horie T, Iuchi A, Ito S. Gastric mucosal levels of prostaglandins and leukotrienes in patients with gastric ulcer after treatment with rabeprazole in comparison to treatment with ranitidine. *J Med Invest*. 2007;54: 83-90.
- 126 Bech PL, Xavier R, Lu N, Nanda NN, Dinuer M, Podolsky DK, Seed B. Mechanism of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. *Gastroenterology*. 2000;119:699-705.

- 127 Miller TA. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am. J. Physiol.* 1983;245:601-623.
- 128 Khattab MM, Gad MZ, Abdallah D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol. Res.* 2001;43:463-467.
- 129 Wang L, Zhou Y, Peng J, Zhang Z, Jiang DJ, Li YJ. Role of endogenous nitric oxide synthase inhibitor in gastric mucosal injury. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2008;86:97-104.
- 130 Tanaka J, Yuda Y, Inouye S, Yamakawa T. The role of nitric oxide in the gastric acid secretion induced by ischemia-reperfusion in the pylorus-ligated rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;424:69-74.
- 131 Khalifa MA, Hassan MKA, Ashour OM, Heeba G. Evaluation of the anti-ulcer activity of pibutidine hydrochloride (IT-066); the new histamine H₂-receptor antagonist, in cold-restraint stress- and ethanol-induced ulcer models in rats. *Al- Azhar Med J.* 2002;31, 33-47.
- 132 Konturek S, Brzozowski T, Majka J, Pytko-Polonczyk J, Stachura J. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;239:215-217.
- 133 Konturek SJ, Konturek PC, Konturek JW, Plonka M, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Bielanski W. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(3):29-50.
- 134 Hill M. The microbiology of *Helicobacter pylori*. *Biomed Pharmacother.* 1991;51:161-163.
- 135 Sachs G, Carlsson E, Lindberg P, Wallmark B. Gastric H,K-ATPase As Therapeutic Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988;28:269-284.
- 136 Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Guzik TJ, Loster B, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications in gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56(6):77-89.
- 137 Ladeira MSP, Savadori DMF, Rodrigues MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* Rio de Janeiro. 2003;.39(4):p335-342.
- 138 Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, and Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 1999;284:1328-1333.
- 139 Westblom TU, Czinn SJ, and Nedrud JG. Current topics in microbiology and immunology, vol. 241. *Gastrointestinal disease and Helicobacter pylori: pathophysiology, diagnosis and treatment.* Springer Verlag, Berlin, Germany. 1999.

- 140 Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* toxin is a urea permease that promote urea diffusion across epithelia. *J. Clin. Invest.* 2001;108(6):929-37.
- 141 Fox Jg, Wang Tc. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. *Curr Op Gastroenterol.* 2002;18:15-25.
- 142 Algood HMS, Cover TL. *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune defenses. *Clin Microbiol Rev.*2006:597-613.
- 143 Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek JW, Pawlik WW. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; nobel prize for achievements in gastrology during last century. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56 (4):507-530.
- 144 Jung H K, Lee KE, Chu SH, Yi SY. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16:1336-1340.
- 145 Augusto AC, Miguel F, Mendonça S, Pedrazzoli JJ, Gurgueira SA. Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem.* 2007;40: 615-622.
- 146 Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature.* 1972;236(5347):385-390.
- 147 Yuan Y, Padol IT, Hunt RH. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol.Hepatol.* 2006;3(2):80-89.
- 148 Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology.* 2000;119(2):521-535.
- 149 Lindberg P, Brandstrom A, Wallmark B. Omeprazole, a new antiulcer drug with a unique mechanism of action. *Acta Pharm Suec.* 1987;24(6):329-332.
- 150 Olbe L, Carlsson E, Lindberg PA proton-pump inhibitor expedition: The case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):132-139.
- 151 Texter EC, Reilly PA. The Efficacy and Selectivity of Pirenzepine - Review and Commentary. *Scand J Gastroenterol.* 1982;17:237-246.
- 152 Baron JH, Barr J, Batten J, Sidebotham R, Spencer J. Acid, Pepsin, and Mucus Secretion in Patients with Gastric and Duodenal-Ulcer Before and After Colloidal Bismuth Subcitrate (De-Nol). *Gut.* 1986;27(5):486-490.
- 153 D'Souza RS, Dhume VG. Gastric cytoprotection. *Indian J.Physiol Pharmacol.* 1991;35(2):88-98.
- 154 Barrowman JA, Pfeiffer CJ. Carbenoxolone: a critical analysis of its clinical value in peptic ulcer. In: C. J. Pfeiffer. *Drugs and peptic ulcer.* Boca Raton, Fla: CRC Press. 1982:123-132 ISBN 0849362105 (set).

- 155 Sato S, Ikeda H, Furukawa H, Murata Y, Tomoda M. Effects of nutrient solution concentration on inorganic and glycyrrhizin contents of *Glycyrrhiza glabra* Linn. *Yakugaku Zasshi*. 2004;124(10):705-709.
- 156 Lichtenberger LM, Ulloa C, Romero JJ, Vanous AL, Illich PA, Dial EJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug and phospholipid prodrugs: combination therapy with antisecretory agents in rats. *Gastroenterology*. 1996;111(4):990-995.
- 157 Ugaz OL. *Investigación fitoquímica*. 2.ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú - fondo Editorial. 1994:300.
- 158 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 159 Singh N, Kumar A, Gupta P, Chand K, Samant M, Maurya R, Dube A. Evaluation of antileishmanial potential of *Tinospora sinensis* against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2008:65.
- 160 Djahanguri B. The production of acute ulceration by indomethacin in the rat. *Scand J Gastroent*. 1969;4:265-267.
- 161 Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci*. 1999;65(2):27-32.
- 162 Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984;87(6):1344-1350.
- 163 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-358.
- 164 McNulty C. and the PHLS *Helicobacter* Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002;49:601-609.
- 165 Souza MC. Triagem da atividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* de plantas medicinais do cerrado mato-grossense e atividade anti-*Helicobacter pylori in vivo* do extrato hidroetanólico e fração diclorometânica (DCM₂) de *Calophyllum brasiliense* Camb. [Dissertação - mestrado]- Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso Faculdade de Ciências Médicas; 2008.
- 166 Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 24: 37-41.
- 167 Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;9(7):1027-1031.

- 168 NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA, 2003.
- 169 Pretto JB, Chechinel Filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaisas EB, Bella Cruz A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense*. Zeitschrift Für Naturforsch. 2004;59:657-662.
- 170 Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro MAS, De Lima TCM. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Florianópolis: Lagoa, 2003.
- 171 Gonzalez FG, Di Stasi LC. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. Phytomedicine. 2002;9:125-134.
- 172 Mota KSL, Pita JCLR, Estevam EC, Medeiros VM, Tavares JF, Agra MF, Diniz MFFM, Silva MS, Batista LM. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. Rev Bras Farmacogn. 2008;18:441-446.
- 173 Silvério MS, Sousa OV, Del-Vechio-Vieira G, Miranda MA, Matheus FC, Kaplan MAC. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae). Ver Bras Farmacogn. 2008;18:430-435.
- 174 Rao VS, Santos FA, Sobreira TT, Souza MF, Melo CL, Silveira ER. Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. Planta Med. 1997;63:46-149.
- 175 Santos FA, Rao VS. 1, 8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. Dig Dis Sci. 2001;46:331-337.
- 176 Guedes MM, Cunha NA, Silveira ER, Rao VS. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa*. Planta Med. 2002;68: 1044-1046.
- 177 Baggio CH, De Martini OG, Souza WM, Santos CAM, Torres LM, Rieck L, Marques MCA, Mesia-Vela S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. Planta Med. 2005; 71:733-738.
- 178 Morikawa T, Li N, Nagatomo A, Matsuda H, Li X, Yoshikawa M. Triterpene saponins with gastroprotective effects from tea seed (the seeds of *Camellia sinensis*). J Nat Prod. 2006;69:185-190.
- 179 Dewick PM. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2 ed. Londres: British Library Cataloguing in Publication Data. 2002:347-350.
- 180 Simões, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS. 2002:833.

- 181 Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EdUFSCar, 2003:152.
- 182 Ra A, Tobe SW. Acute interstitial nephritis due to pantoprazole. *Ann Pharmacother.* 2004; 38:41-45.
- 183 Zlabek JA, Anderson CG. Lansoprazole-induced thrombocytopenia. *Ann Pharmacother.* 2002; 36:809-811.
- 184 Gonzalez P, Soriano V, Lopez P, Niveiro E. Anaphylaxis to proton pump inhibitors. *Allergol Immunopathol.* 2002;30:342-343.
- 185 Fisher AA, Le Couteur DG. Nephrotoxicity and hepatotoxicity of histamine H2 receptor antagonists. *Drug Safety.* 2001;24:39-57.
- 186 Wilson AP. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J.R.W. *Animal Cell Culture.* 3rd. ed. Oxford: University, 2000:175-219.
- 187 Nardone RM. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. (Ed.). *Growth, nutrition and metabolism of cells in culture.* New York: Academic, 1977:471-495
- 188 Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro.* 2002;16:599-607.
- 189 Melo OS, Maria SS, Vidal BC, Haun M, Duran N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36:639-543.
- 190 Beck IT, Morris GP, Buell MG. Ethanol-induced vascular permeability changes in the jejunal mucosa of the dog. *Gastroenterology.* 1986;90:1137-1145.
- 191 Dinda PK, Kossev P, Beck IT, Buell MG. Role of xanthine oxidase-derived oxidants and leukocytes in ethanol-induced jejunal mucosal injury. *Dig Dis Sci.* 1996;41:2461-2470.
- 192 Pitchumoni CS. Pathogenesis of alcohol-induced chronic pancreatitis: facts, perceptions, and misperceptions. *Surgical Clinics of North America.* 2001;81:379-390.
- 193 Lira SRS, Rao VS, Carvalho AC, Guedes MM, Morais TC, Souza AS, Trevisan MTS, Lima AF, Chaves MH, Santos FA. Gastroprotective effect of lupeol on ethanol-induced gastric damage and the underlying mechanism. *Inflammopharmacology.* 2009.
- 194 Marhuenda E, Martin MJ, Alarcon de la Lastra C. Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models. *Phytother Res.* 1993;7:13-16.
- 195 Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gülçin I, Büyükokuroglu ME. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2007;13:607-611.

- 196 La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol.* 2000;71:45-53.
- 197 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.* 1995;108:58–64.
- 198 Takeuchi K, Sugamoto S, Yamamoto H, Kawauchi S, Tashima K. Interactive roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in regulation of acid secretion by damaged stomachs. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;1:125–134.
- 199 Curtis GH, Mannaughtona WK, Gall DG.;Wallacea,J.L. Intraluminal pH modulates gastric protaglandin synthesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73:130-134.
- 200 Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, Peskar BM. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut.* 2001;49:443-53.
- 201 Watanabe T, Chiba T. Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly. *Nippon Rinsho.* 2002;60 (8):1515-1520.
- 202 Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology.* 1997;112:1000–1016.
- 203 Asako H, Kubes P, Wallace JL, Gaginella T, Wolf RE, Granger DN. Indomethacin induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am J Physiol.* 1992;262:903–908.
- 204 Asako H, Kubes P, Wallace JL, Wolf RE, Granger DN. Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. *Gastroenterology.* 1992;103:146–152.
- 205 Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;137:404–410.
- 206 Kunkel SL, Chensue SW, Phan SH. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J Immunol.* 1986;136:186–192.
- 207 Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:4349–4353.
- 208 Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA, Gilbert AR, Strieter RM. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol.* 1993;151:2166–2175.
- 209 Naito Y, Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M, *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 30-34.

- 210 Koc M, Imik H, Odabasoglu F. Gastroprotective and Anti-oxidative Properties of Ascorbic Acid on Indomethacin-induced Gastric Injuries in Rats *Biol Trace Elem Res*. 2008;126:222–236.
- 211 Sivalingam N, Basivireddy J, Balasubramanian KA, Jacob M. Curcumin attenuates indomethacin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch Toxicol*. 2008;82:471–481.
- 212 Eda S, Yoshikawa T, Naito Y, Takahashi S, Oymada H, Morita Y, Yo Neta T, Kondo M. Role of Oxygen-Derived Free Radicals in Gastric Mucosal Injury Induced by Ischemia or Ischemia-Reoerfusion in Rats. *Free Radic Res*. 1989b;7:285-291.
- 213 Ribeiro ME, Yoshidaw B. Reperfusion injury after intestinal ischemia: pathophysiology and experimental models. *Vascular Brazilian Newspaper*. 2005;4:183-194.
- 214 Sakurai K, Osaka T, Yamasaki K. Rebamipide reduces recurrence of experimental gastric ulcer: Role of free radicals and neutrophils. *Digestive Disease and Sciences* 2005; 50(1):90-96.
- 215 Halliwell B, Gutteridge JMC. Free redicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006. ISBN 019856869X.
- 216 Okada A, Kinoshita Y, Waki S, Fukui H, Maekawa T, Matsushima Y, Kawanami C, Kishi K, Nakata H, Wang HY, Hassan S, Chiba T. Rat gastric mucosal cells express ICAM-1 and proinflammatory cytokines during indomethacininduced mucosal injury. *J Lab Clin Med* 1998;131:538-547.
- 217 Kyoji T, Kitazawa S, Tajima K, Zhang X, Ukai Y. Phosphodiesterase type IV inhibitors prevent ischemiareperfusion-induced gastric injury in rats. *J Pharmacol Sci* 2004;95:321-328.
- 218 Akhiani AA. The role of type-specific antibodies in colonization and infection by *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Infect Dis*. 2005; 18: 223-227.
- 219 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Mollecular Immunology* 6th edition, Saunders Elsevier 2007; 12:267-301.
- 220 Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, Yasui W, Mukaida N, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br J Cancer* 1999; 81: 647-653
- 221 Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998; 42: 609-617
- 222 Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *Gut* 1999; 45: 804-811

- 223 Malfertheiner P, Megraud F, O`Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56(6):772-81.
- 224 Dunn BR, Cohen H, Blasé MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:720-41.
- 225 Wang Y-C, Huang T-L. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Plumbago zeylanica* L. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;43:407-412.
- 226 Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43 (7):1788-1791.
- 227 Ustün O, Özçelik B, Akyön Y, Abbasoglu U, Yesilada E. Flavanoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2006; 108: 457-461.
- 228 Alves EG, Vinholis HC, Casemiro LA, Jacometti NA, Furtado C, Silva MLA, et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim Nova* 2007; Nota técnica
- 229 Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100: 80-84.

ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 23124-1	Data da Emissão: 03/03/2010 10:54
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 4735198	Nome: Elisângela Saturnino de Souza Almeida	CPF: 876.527.731-72
----------------------------	---	---------------------

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização ou licença do Ibama não exige o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades de pesquisa forem realizadas em área de domínio privado; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva; V) da Fundação Palmares, quando as atividades de pesquisa forem executadas em áreas de Quilombolas; VI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, quando da entrada e saída de material biológico do País; VII) do Departamento Nacional da Produção Mineral.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.lombio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
ESPECIE	Simaba ferruginea



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 23108.020675/09-4, sobre "Estudo do mecanismo de ação antiúlcera do alcalóide cantinona isolado do rizoma de *Simaba (ferruginea St. Hil.)*", sob a responsabilidade de Dr. DOMINGOS TABAJARA DE OLIVEIRA MARTINS/ELISÂNGELA SATURNINO DE SOUZA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)-UFMT em reunião ordinária de 16/09/2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.020675/09-4, entitled "Study of the action antiulcer mechanism of alkaloids cantinone isolated of the rhizome of *Simaba ferruginea*", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **Sept 16, 2009**.

Cuiabá-MT, 21 de setembro de 2009.

Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso

Presidente

Profª M.Sc. Sandra Izilda S. de Figueiredo

Vice-Presidente

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](#)