

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Combretum duarceanum* CAMBESS.
(COMBRETACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

**João Pessoa - PB
2011**

GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Combretum duarleanum* CAMBESS.
(COMBRETACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros da Universidade Federal da Paraíba como parte do requisito para a obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

**João Pessoa - PB
2011**

L732a Lima, Gedson Rodrigues de Moraes.

Atividade gastroprotetora de *Combretum duar-teanum* Cambess. (Combretaceae) em modelos animais / Gedson Rodrigues de Moraes Lima.-- João Pessoa, 2011.

133f. : il.

Orientadora: Leônia Maria Batista

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. *Combretum duar-teanum* – atividade gastroprotetora. 3. Atividade cicatrizante. 4. Úlcera gástrica.

5. Farmacologia.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

GEDSON RODRIGUES DE MORAIS LIMA

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Combretum duartanum* Cambes
(COMBRETACEAE) EM MODELOS ANIMAIS**

BANCA EXAMINADORA:

**Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Orientadora - UFPB**

**Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Examinadora Externo – UFPE**

**Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Examinadora Interna - UFPB**

João Pessoa, 22 de fevereiro de 2011.

*A minha família, pelo amor, apoio, confiança, dedicação
e por todos os ensinamentos que contribuíram para formação do
meu carácter.*

Agradecimientos

A Deus por ter me proporcionado a vida, força e coragem. Por ter abençoado os meus caminhos e concedido momentos de conquistas, aprendizado e evolução.

À família, por ser meu exemplo. Muito obrigado a todos pelo apoio, por sempre ter acreditado em mim, contribuindo para o desenvolvimento das minhas potencialidades.

À Profa. Dra. Leônia Maria Batista pela oportunidade, credibilidade, orientação e ensinamentos diários, contribuindo não somente na formação científica, mas também na formação de caráter.

Ao Prof. Dr. Josean Fechine Tavares pela atenção e fornecimento das amostras vegetais.

Às Profas. Dra. Margareth de F. F. M. Diniz e Dra. Marianna V.S. Castello-Branco por terem cedido o ambiente físico tornando possível a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia do Trato gastrointestinal Jéssica Hanne, Géssica Teixeira e Paulo César, pelo apoio e ajuda que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos queridos do Laboratório de Farmacologia do Trato gastrointestinal Camila de Albuquerque, Cynthia Almeida, Igor Rafael, Neyres Taveira, Heloína Falcão e Thiago Leite pela ajuda, pelo ombro amigo nas horas mais difíceis, por estarem ao meu lado incentivando-me na busca por novas conquistas.

À Camila de Albuquerque, em especial, por ser uma amiga do peito, companheira, uma guerreira, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, dividindo alegrias e tristezas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas e amigos da turma de Mestrado 2009 do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por todos os momentos compartilhados.

Às alunas de pós-graduação Ana Lúcia Guedes e Isis Fernandes pela disponibilidade na preparação das amostras vegetais utilizadas neste trabalho.

Aos alunos pertencentes ao LABETOX João Carlos Pita, Aline Xavier, Déborah Pessoa e Madson Moreira pela amizade e cooperação nos experimentos de toxicidade.

Aos amigos “Legais” Alliny Muriel, Bruno Vinícius, Flávia Fonsêca, Hyale Cunha, Juliana Queiroga, Maria da Conceição (Mary), Paulo Roberto (Bahia), Rafael Travassos, amigos queridos desde a época da graduação, que compartilharam comigo vários momentos de conquistas e descontração.

À direção do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB) na pessoa da Profa. Silvana Jales.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela atenção concedida sempre que necessário.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, em especial às secretárias da Pós-graduação e à Mônica pelo apoio e ajuda nos momentos em que mais precisei.

Ao amigo José Crispim Duarte pela competência, disponibilidade e auxílio técnico, pelo constante incentivo e apoio.

Ao Luís Cordeiro e Adriano Silva, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindíveis na execução deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro na concessão da minha bolsa.

A todos que direta ou indiretamente participaram do desenvolvimento e da conclusão desta dissertação.

MUITO OBRIGADO!

Gedson Rodrigues de Morais Lima

RESUMO

Combretum duarleanum Cambess, popularmente conhecida como mofumbo, é uma espécie exclusiva da América Latina, geralmente associada a ambientes da caatinga, com uso popular para fins medicinais, dentre elas para o tratamento de inflamação e infecções. Tais efeitos geralmente estão associados aos seus principais constituintes, dentre eles os flavonóides, taninos e terpenos. O extrato etanólico bruto (EEtOH-Cd) e a fase hexânica (FaHex-Cd) obtidos das folhas de *C. duarleanum* Cambess, foram avaliados quanto a sua toxicidade e efeitos farmacológicos frente a atividade gastroprotetora e cicatrizante, assim como os prováveis mecanismos de ação relacionados. A administração oral (v.o.) de 2000 mg/Kg do EEtOH-Cd, não provocou alterações no comportamento, nos pesos corporais e nos órgãos, bem como não ocorreram alterações no consumo de água, entretanto, o consumo de ração, foi reduzido no grupo dos animais machos. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos, sem ocorrência de mortes, sendo portanto, impossível determinar a DL₅₀. O EEtOH-Cd e FaHex-Cd foram avaliados quanto à sua atividade gastroprotetora nos modelos de indução aguda de úlcera HCl/Etanol, etanol absoluto, estresse (imobilização e frio) e antiinflamatório não esteroidal (piroxicam) nas doses 62,5, 125, 250 e 500 mg/Kg (v.o.) e contensão do suco gástrico (250 mg/Kg v.o. e i.d.) em camundongos Swiss e ratos Wistar machos. No modelo HCl/etanol, o EEtOH-Cd (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) reduziu o índice de lesão ulcerativa (ILU) em 28, 36, 55 e 63 %, respectivamente. Também foi observado no modelo de etanol que o EEtOH-Cd e a FaHex-Cd (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) inibiram o ILU em 51, 48, 61, 45 e 37, 44, 79, 86 %, respectivamente. No modelo de estresse o EEtOH-Cd (125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) reduziu o ILU em cerca de 44, 54 e 69% e a FaHex-Cd (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) em cerca de 55, 56, 69 e 79 %. Na indução aguda de úlcera por AINE, as porcentagens de proteção para EEtOH-Cd (125, 250 e 500 mg/kg, v.o.) e FaHex-Cd (250 e 500 mg/kg, v.o.) foram 30, 42, 49 % e 43, 52 %, respectivamente. Nas úlceras induzidas por contensão do suco gástrico (ligadura de piloro) o EEtOH-Cd (250 mg/kg) e a FaHex-Cd (250 mg/kg) apresentaram proteção gástrica tanto por via oral (v.o.) (66 e 39 %) quanto por via intraduodenal (i.d.) (41 e 45 %), respectivamente. Tanto o EEtOH-Cd e FaHex-Cd não provocaram alterações no volume e pH do suco gástrico. Na perspectiva de elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos com a atividade gastroprotetora do EEtOH-Cd (250 mg/kg) e da FaHex-Cd (250 mg/kg), foram avaliadas as participações do muco aderido a mucosa, do óxido nítrico e dos grupamentos sulfidrílicos. De acordo com os resultados obtidos o efeito gastroprotetor não inclui a participação do muco, porém é dependente da participação do óxido nítrico e dos compostos sulfidrílicos. No modelo de úlcera induzida por ácido acético, o tratamento crônico com o EEtOH-Cd (250 mg/kg, v.o.) ou FaHex-Cd (250 mg/kg, v.o.) reduziu a área de lesão ulcerativa em 38 e 48 %, respectivamente. Neste modelo, durante os 14 dias de tratamento, foi observado que o EEtOH-Cd promoveu aumento na ingesta de água e ração. Portanto, estes dados indicam *C. duarleanum* apresenta atividade gastroprotetora podendo ter a participação dos grupamentos sulfidrilas e da via do óxido nítrico, bem como o envolvimento de fatores de crescimento no processo de cicatrização induzido pelos constituintes químicos presentes nas amostras vegetais testadas.

Palavras-chave: úlcera gástrica, *Combretum duarleanum*, atividade gastroprotetora e atividade cicatrizante.

ABSTRACT

Combretum duarteanum Cambess is popularly known as mofumbo, a unique species from Latin America, usually associated with arid environments. This species belongs to Combretaceae family, known in various continents of the world for its popular use in treatment of inflammation and infections, its effects are usually associated with its major constituents, flavonoids, tannins and terpenes. The crude ethanol extract (Cd-EtOHE) and the hexane phase (Cd-HexP) obtained from the leaves of *C. duarteanum* Cambess were evaluated for toxicity and pharmacological effects against gastroprotective activity and healing, as well as the likely mechanisms of related actions. Oral administration (p.o.) 2000 mg/Kg of Cd-EtOHE, in mice did not show behavioral changes. Regarding water intake, was observed that the extract did not cause significant changes in both the groups, both in males and in females. However the feed intake was observed to decrease significantly in the group of males treated. No animal died and no significant macroscopic changes in daily body or organ weight were observed, making it impossible to determine the LD₅₀. The Cd-EtOHE and Cd-HexP were assessed for their gastroprotective activity in models of acute ulcer induced by HCl/ ethanol, absolute ethanol, stress (immobilization and cold), nonsteroidal anti-inflammatory drug (piroxicam) at doses with 62.5, 125, 250 and 500 mg / kg (p.o.) and pylorus ligation (250 mg/kg v.o. and i.d.) in Swiss mice and male Wistar rats. In the model HCl / ethanol, Cd-EtOHE (62.5 125, 250 and 500 mg / kg, p.o.) significantly reduced the ULI the ulcerative lesion index in 28, 36, 55 and 63% respectively. It was also observed in the ethanol model Cd-EtOHE and Cd-HexP (62.5 125, 250 and 500 mg/kg, p.o.) significantly inhibited the ULI in 51, 48, 61, 45 and 37, 44, 79, 86 %, respectively. In the stress model Cd-EtOHE (125, 250 and 500 mg / kg, po) reduced the ULI in 44, 54 and 69% and Cd-HexP (62.5, 125, 250 and 500 mg / kg po) was about 55, 56, 69 and 79%. In the NSAID-induced ulcers, the percentages of protection for Cd-EtOHE (125, 250 and 500 mg / kg, po) and Cd-HexP (250 and 500 mg / kg, po) were 30, 42, 49 and 43%, 52% , respectively. The results obtained front of the restraint of gastric secretion (pylorus ligation) have shown that Cd-EtOHE (250 mg/kg) or Cd-HexP (250 mg/kg), showed protection both given orally (p.o.) (66 and 39%) or by intraduodenal route (i.d.) (41 and 45%), respectively. The data showed that the Cd-EtOHE and Cd-HexP, did not promote changes in pH and the volume of gastric juice. To evaluate the gastroprotective activity and the likely mechanisms of related actions of the Cd-EtOHE (250 mg / kg) and Cd-HexP (250 mg / kg) were carried out experimental protocols to assess the contribution of mucus, nitric oxide and sulfhydryl groups. According to the obtained results, it is possible to suggest that the gastroprotective effect does not include the mucus participation, but is dependent on the nitric oxide and sulfhydryl compounds participation. In the model of acetic acid induced ulcer, chronic treatment with Cd-EtOHE (250 mg / kg, po) and Cd-HexP (250 mg / kg, p.o.) significantly reduced the ulcerative area in 38 and 48%, respectively. During the 14 days of treatment, we observed that the Cd-EtOHE increased the water and food intake, but for Cd-HexP this effect was not observed. These results suggest that the Cd-EtOHE and Cd-HexP displays gastroprotective activity, which are related the participation of NO, an increase in endogenous SH compounds, as well as the growth factors involvement in the healing process induced by the chemical constituents present in the vegetable samples tested.

Key words: gastric ulcer, *Combretum duarteanum*, gastroprotective activity and healing activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida.	5
Figura 2. Representação esquemática dos fatores agressores e mecanismos de defesa da mucosa gástrica.	8
Figura 3 Sistema antioxidante enzimático e não enzimático.	16
Figura 4. Úlcera péptica	17
Figura 5. Terapêutica da úlcera péptica	23
Figura 6. Fotos de <i>Combretum duarceanum</i> Cambess.....	28
Figura 7. Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e da FaHex obtidos das folhas de <i>Combretum duarceanum</i>	33
Figura 8. Animais utilizados: (A) camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>) e (B) rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	34
Figura 9. (A) lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e (B) estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (→), para determinação do ILU.....	37
Figura 10. (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System); (B) Analisador hematológico celular automático <i>Animal Blood Counter</i> (Vet)	44
Figura 11 Estômagos de ratos pré-tratados v.o. com solução tween 80 12 % (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EEtOH-Cd (62,5 mg/kg) (C), EEtOH-Cd (125 mg/kg) (D), EEtOH-Cd (250 mg/kg) (E), EEtOH-Cd (500 mg/kg) (F).	49
Figura 12 . Estômagos de ratos pré-tratados v.o. com solução tween 80 12 % (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), FaHex -Cd (62,5 mg/kg) (C), FaHex-Cd (125 mg/kg) (D), FaHex -Cd (250 mg/kg) (E), FaHex -Cd (500 mg/kg) (F)	50
Figura 13. Estômagos de ratos ulcerados e tratados com tween/tween (A) tween/carbenoxolona (B), tween/EEtOH (C), tween/FaHex (D), L-NAME/tween (E), L-NAME/carbenoxolona (F), L-NAME/EEtOH (G), L-NAME/FaHex (H).	58
Figura 14. Estômagos de ratos ulcerados e tratados com tween/tween (A) tween/carbenoxolona (B), tween/EEtOH (C), tween/FaHex (D), NEM/tween (E), NEM/carbenoxolona (F), NEM/EEtOH (G), NEM/FaHex (H).....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da administração oral da FaHex-Cd e carbenoxolona na produção de muco.	57
Gráfico 2. Efeito da administração oral do EEtOH obtidos das partes aéreas de <i>C. duar-teanum</i> e da carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME.....	58
Gráfico 3. Efeito da administração oral da FaHex obtidos das partes aéreas de <i>C. duar-teanum</i> e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME.....	59
Gráfico 4. Efeito da administração oral do EEtOH obtido das folhas de <i>C. duar-teanum</i> e da carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM	60
Gráfico 5. Efeito da administração oral da FaHex obtido das folhas de <i>C. duar-teanum</i> e da carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM	61
Gráfico 6. Efeito cicatrizante do EEtOH e da FaHex obtidos de <i>Combretum duar-teanum</i> no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da administração oral do EEtOH obtido das folhas de <i>Combretum duarteanum</i> na evolução ponderal, peso dos órgãos, consumo de água e ração em camundongos machos e fêmeas	47
Tabela 2. Efeito da administração oral do EEtOH obtido de <i>C. duarteanum</i> e carbenoxolona nas lesões gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos	48
Tabela 3. Efeito da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos das partes aéreas de <i>C. duarteanum</i> e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos	49
Tabela 4. Efeitos da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos das partes aéreas de <i>C. duarteanum</i> e da cimetidina nas lesões gástricas induzidas por estresse por imobilização e frio em camundongos	51
Tabela 5. Efeito da administração oral do EEtOH, da FaHex obtido das folhas de <i>C. duarteanum</i> e da cimetidina em úlceras gástricas induzidas por antiinflamatório não esteroideal (piroxicam 30 mg/kg) em camundongos	52
Tabela 6. Efeitos da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos das folhas de <i>C. duarteanum</i> e da cimetidina nas lesões gástricas induzidas induzidas por contensão da secreção gástrica através da ligadura de piloro em ratos.....	53
Tabela 7. Efeitos da administração intraduodenal do EEtOH, da FaHex e da cimetidina, nas lesões gástricas induzidas induzidas por contensão da secreção gástrica através da ligadura de piloro em ratos.....	54
Tabela 8. Efeito da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos de <i>C. duarteanum</i> e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura de piloro em ratos	55
Tabela 9. Efeito da administração intraduodenal do EEtOH, da FaHex obtidos das partes de <i>C. duarteanum</i> e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura de piloro em ratos.....	56
Tabela 10. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de <i>Combretum duarteanum</i> durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	63

Tabela 11. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de <i>Combretum duarleanum</i> durante 14 dias sobre o peso dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	63
Tabela 12. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de <i>Combretum duarleanum</i> durante 14 dias sobre o peso dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	64
Tabela 13. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de <i>C. duarleanum</i> durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	65
Tabela 14. Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de <i>C. duarleanum</i> durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
ALU	Área de Lesão Ulcerativa
AMP_c	3',5'- Monofosfato cíclico de adenosina
Ca²⁺	Íon cálcio
CAT	Catalase
CCK	Receptor de colecistocinina B
CCK-2	Receptor de colecistocinina 2
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
Cl⁻	Íon cloreto
COX	Enzima ciclooxigenase
CRF	Fator liberador de corticotropina
ECL	Células enterocromafins "like"
EEtOH	Extrato etanólico bruto
EGR	Fator de crescimento epidermal
EGR-F	Receptor do fator de crescimento epidermal
eNOs	Sintase do óxido nítrico endotelial
FaHex	Fase hexânica
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GCs	Ciclase g uanilil solúvel
GMP_c	Monofosfato cíclico de guanosina
GSH	Glutationa
GPx	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GSSG	Glutationa oxidada
HCl	Ácido clorídrico
HCO₃⁻	Íon bicarbonato
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H⁺	Próton
H⁺,K⁺-ATPase	Bomba de prótons
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
i.d.	Intraduodenal
ILU	Índice de Lesão Ulcerativa
IL-1β	Interleucina 1 beta
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzida
i.p.	Intraperitoneal
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
K⁺	Íon potássio
LABETOX	Laboratório de Ensaio Toxicológicos
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-ester

LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NADP⁺	Fosfato de dinucleotídeo adenina nicotinamida
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
O₂⁻	Ânion superóxido
-OH	Radical hidroxil
PAF	Fator de ativação plaquetária
PGE₂	Prostaglandina da série E
PGs	Prostaglandinas
PGI₂	Prostaciclina 2
pH	Potencial hidrogeniônico
PLC	Fosfolipase C
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutânea
SHs	Grupamentos sulfidrilas
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervos Entérico
SOD	Superóxido dismutase
SSTR	Receptor de somatostatina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRH	Hormônio liberador da tirotropina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
v.o.	Via oral

Sumário

ABSTRACT	VIII
Lista de Figuras	IX
Lista de gráficos	X
Lista de Tabelas	XI
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Considerações Gerais.....	2
1.2 Fisiologia Gastrintestinal.....	3
1.2.1 Secreção gástrica	3
1.2.2 Controle da secreção gástrica	4
1.2.3 Mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal	7
1.2.3.1 Defesa pré - epitelial: barreira de muco-bicarbonato-fosfolipídeos ...	8
1.2.3.2 Defesa epitelial.....	9
1.2.3.3 Defesa sub-epitelial.....	10
1.2.3.3.1 Fluxo sanguíneo mucoso.....	10
1.2.3.3.2 Renovação celular	11
1.2.3.3.3 Inervação sensorial.....	11
1.2.3.4 Fatores moduladores da barreira gástrica	12
1.2.3.4.1 Prostaglandinas (PGs).....	12
1.2.3.4.2 Óxido Nítrico (NO)	13
1.2.3.4.3 Grupamentos sulfidrilas (SHs)	14
1.2.3.4.4 Sistema antioxidante.....	15
1.3 Fisiopatologia da úlcera péptica.....	17
1.3.1 Etiologia.....	17
1.4 Epidemiologia da úlcera péptica	20
1.5 Terapêutica da úlcera péptica.....	21
1.6 Plantas como uma nova alternativa terapêutica	24
1.6.1 Plantas medicinais.....	24
1.7 Considerações sobre a família Combretaceae e sobre a espécie <i>Combretum duarteanum</i>	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivos Gerais.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Material	32
3.1.1 Local da pesquisa.....	32
3.1.2 Material botânico	32
3.1.3 Obtenção do extrato etanólico bruto e da fase hexânica de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess.....	32
3.1.4 Animais.....	33

3.1.5	Drogas utilizadas	34
3.2	Métodos	35
3.2.1	Ensaio toxicológico de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	35
3.2.1.1	Estudo comportamental e determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀)	35
3.2.2	Investigação da atividade gastroprotetora de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	36
3.2.2.1	Modelos de indução aguda de úlcera gástrica	37
3.2.2.1.1	Indução da úlcera gástrica por HCl/Etanol (Triagem farmacológica)	37
3.2.2.1.2	Indução da úlcera gástrica por etanol absoluto	37
3.2.2.1.3	Indução da úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio)	38
3.2.2.1.4	Indução da úlcera gástrica por Antiinflamatório-não-esteroidal (Piroxicam)	38
3.2.2.1.5	Indução da úlcera gástrica por contensão do suco gástrico	38
3.2.2.1.6	Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (v.o. e i.d.)	39
3.2.2.2	Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	40
3.2.2.2.1	Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	40
3.2.2.2.2	Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção	40
3.2.2.2.3	Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas (SH) na gastroproteção	41
3.2.2.3	Avaliação da atividade cicatrizante de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	41
3.2.2.3.1	Úlcera gástrica induzida por ácido acético	41
3.2.2.4	Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FaHex de <i>Combretum duarteanum</i> por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético	42
3.2.2.4.1	Avaliação do consumo de água e ração	42
3.2.2.4.2	Avaliação ponderal	43
3.2.2.4.3	Avaliação do peso dos órgãos	43
3.2.2.4.4	Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	43
3.3	Análise Estatística	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Ensaio Toxicológico de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	46
4.1.1	Estudo comportamental e determinação da Dose Letal 50% (DL ₅₀)	46
4.2	Investigação da Atividade Gastroprotetora de <i>Combretum duarteanum</i> Cambess	47
4.2.1	Indução da úlcera gástrica por HCl/Etanol (Triagem farmacológica)	48

4.2.2	Indução da úlcera gástrica por etanol absoluto.....	48
4.2.3	Indução da úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio)	51
4.2.4	Indução da úlcera gástrica por Antiinflamatório-não-esteroidal (Piroxicam).....	52
4.2.5	Indução da úlcera gástrica por contensão do suco gástrico.....	53
4.2.6	Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro v. o.	54
4.2.7	Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro i.d.....	55
4.3	Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos na Atividade Gastroprotetora de <i>Combretum duar-teanum</i> Cambess	56
4.3.1	Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica	56
4.3.2	Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção.....	57
4.3.3	Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas (SH) na gastroproteção	59
4.4	Avaliação da Atividade Cicatrizante de <i>Combretum duar-teanum</i> Cambess.....	61
4.4.1	Úlcera gástrica induzida por ácido acético	62
4.4.1.1	Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FaHex <i>Combretum duar-teanum</i> por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético	62
4.4.1.1.1	Avaliação do consumo de água e ração	62
4.4.1.1.2	Avaliação ponderal	63
4.4.1.1.3	Avaliação do peso dos órgãos	63
4.4.1.1.4	Avaliação dos parâmetros bioquímicos	64
4.4.1.1.5	Avaliação dos parâmetros hematológicos	64
5	Discussão.....	68
6	Conclusões	83
7	Perspectivas.....	85
	Referências	87
	Anexos.....	113

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Historicamente vem sendo demonstrado, ao longo do tempo, a busca do homem pela superação de seus males. Essa busca se passa pelo entendimento do processo saúde-doença, relação causa-efeito, conhecimento do agente etiológico e pela contextualização do indivíduo dentro de um quadro sócio-econômico e cultural. Isso tem possibilitado o avanço da pesquisa e descoberta de novos fármacos, bem como para o entendimento da fisiopatologia das doenças que representam agravo à saúde pública (BATISTA, 2004).

As plantas medicinais se destacam como fontes de novos recursos terapêuticos e é a partir destas que a indústria farmacêutica desenvolve boa parte dos medicamentos. Até o início do século XIX a maioria dos medicamentos utilizados pelo homem era basicamente de origem natural (BARROS, 2006). Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foi desenvolvido a partir de produtos naturais. Devido a esse processo de desenvolvimento, cientistas puderam compreender fenômenos complexos permitindo que enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas fossem identificados, isolados e clonados (CALIXTO, 2003).

As plantas constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Além disto, elas fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas arquiteturas moleculares (BRAZ-FILHO, 2010).

A importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos fica evidente quando se observa que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais (25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais) (CALIXTO, 2003).

A relativa facilidade de coleta, a condição ambiental favorável para desenvolvimento sustentável, a biodiversidade estrutural de substâncias orgânicas naturais e a possibilidade de descoberta de princípios ativos entre tais constituintes químicos permitem destacar as plantas brasileiras como a principal fonte renovável

para o surgimento e desenvolvimento de novos fármacos. Diversas plantas tropicais têm utilização na medicina popular caseira e encontram-se documentadas por dados etnobotânicos (BRAZ-FILHO, 2010).

O Brasil poderia se sobressair no cenário mundial na produção de fitomedicamentos, por possuir a maior biodiversidade do mundo (cerca de 20% do número total de espécies do planeta). Calcula-se que em alguns continentes como a África até 80% da população faz uso de medicamentos de origem vegetal. Na Alemanha e França são 75%, no Canadá 70% e nos EUA 42% (GREGÓRIO, 2006).

O uso de plantas tem sido uma prática comum na população brasileira onde os produtos naturais destacam-se como uma alternativa para o tratamento da úlcera péptica (ALMEIDA et al., 2002). Seguindo esse princípio, este trabalho teve como objetivo contribuir para o uso seguro de plantas medicinais, colaborar com a pesquisa científica por meio de metodologias padronizadas, no intuito de validar esses produtos com atividade farmacológica sobre o trato gastrintestinal.

1.2 Fisiologia Gastrintestinal

1.2.1 Secreção gástrica

O suco gástrico, um líquido encontrado no estômago, possui na sua constituição muco fluido, eletrólitos, HCO_3^- , HCl, pepsinogênio, fator intrínseco e peptídeos, sendo o HCl o seu principal constituinte (KONTUREK; KONTUREK; OCHMANSKI, 2004).

A secreção gástrica compreende três fases distintas: a fase cefálica, controlada em parte pelo hipotálamo e mediada pelo nervo vago, a qual é estimulada por fatores como, pensamento, visão, cheiro e sabor dos alimentos; a fase gástrica, induzida pela exposição luminal dos nutrientes e distensão do estômago, ocasionando a ativação de receptores sensoriais do corpo e do antro gástrico, ativando reflexos vagais e assim aumentando a secreção gástrica; e a fase intestinal, estimulada pela distensão mecânica e pela presença de aminoácidos e peptídeos provenientes do quimo (GOO; AKIBA; KAUNITZ, 2010; FRY, 2009).

Quando os níveis de ácido e pepsina suprimem os mecanismos de defesa da mucosa, ocorrem os danos gástricos. Para evitar esses transtornos, o ácido gástrico

deve ser regulado por mecanismos neurais e hormonais (SCHUBERT; PEURA, 2008).

1.2.2 Controle da secreção gástrica

O controle da secreção de ácido gástrico pelas células parietais ocorre por meio de uma interação harmônica da sinalização neuronal, hormonal e parácrina que agem diretamente nas células parietais e indiretamente, pela modulação da secreção do hormônio gastrina e os agentes parácrinos, histamina e somatostatina no estômago (HOU.; SCHUBERT, 2006; GOO.; AKIBA.; KAUNITZ, 2010). Essas vias podem ser ativadas por estímulos originários diretamente no sistema nervoso central ou reflexamente por estímulos originários do estômago, tais como distensão, proteína e ácido (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Os principais estimulantes da secreção ácida são (1) a histamina, liberada a partir de células enterocromafins “like” (ECL) (parácrinos), (2) gastrina, liberado a partir de células G (hormonal) e acetilcolina (ACh) (3), liberada de neurônios entéricos pós-ganglionares (neurócrinos) (Figura 1). Estes agentes interagem com receptores acoplados a duas importantes vias de transdução de sinal: adenilato ciclase (AC) no caso de histamina e de cálcio intracelular no caso de gastrina e acetilcolina (Figura 1). O principal inibidor da secreção de ácido é a somatostatina, liberada das células D oxíntica e pilórica (parácrinos). Cada um desses agentes atua diretamente na célula parietal, assim como indiretamente por meio da modulação da secreção de células neuroendócrinas (SCHUBERT; PEURA, 2008).

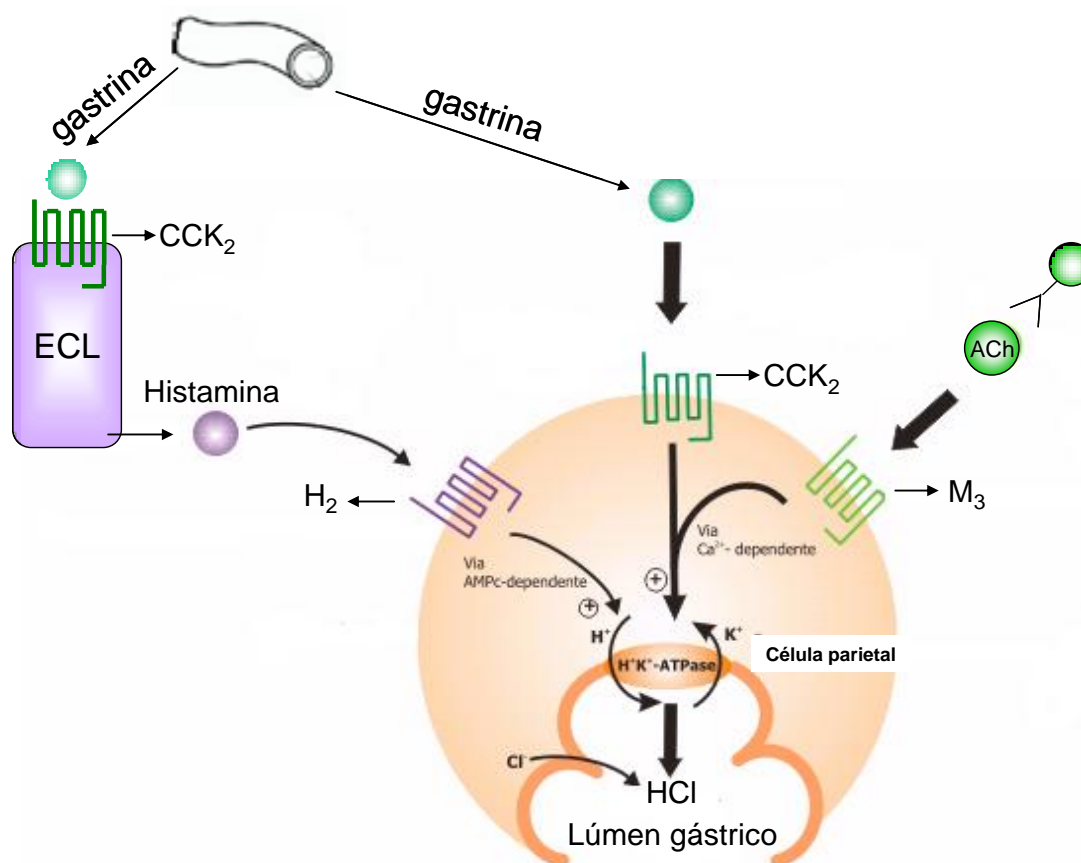


Figura 1. Vias de sinalização dos principais mediadores da secreção ácida (Adaptado de OLBE, CARLSSON; LINDBERG, 2003).

A ACh liberada do sistema nervoso entérico, estimula diretamente a secreção ácida ativando receptores M_3 contidos nas células parietais, (YAMAJI et al., 2007) acoplados à proteína trimérica $G_{q/11}$, promovendo, por meio da via fosfolipase C (PLC), a hidrólise de fosfolípidios presentes na membrana, o que leva a formação de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Por conseguinte, o IP_3 , promove aumento da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) o que acarreta a ativação de proteínas cinases, as quais regulam a fusão das vesículas contendo a H^+,K^+ -ATPase com a membrana apical destas células (ATHMANN et al., 2000; AIHARA et al., 2005; ANDERSON; CARLSSON, 2005) (Figura 1).

A ACh também pode aumentar a secreção de ácido gástrico indiretamente, por estímulo das células ECL, secretoras de histamina. Isto se explica pelo fato dos receptores muscarínicos do tipo M_1 presentes nas células ECL, ao serem bloqueados por antagonistas específicos, provocarem inibição da liberação de histamina e por conseqüência redução da secreção gástrica (YAMAJI et al., 2007).

Além disso, a ativação dos receptores muscarínicos do tipo M₂ e M₄ presentes nas células D (ATHMANN et al., 2000; AIHARA et al., 2005; CHEN et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008) levam a inibição da secreção de somatostatina, removendo a regulação deste peptídeo sobre as células G, ECL e parietais (GOWER et al., 2003a e b; HOU; SCHUBERT, 2006).

A gastrina, por sua vez, pode atuar estimulando a secreção de ácido diretamente (FRIIS-HANSEN, 2006) ao atuarem nos receptores de colecistocinina 2 (CCK-2), que estão presentes nas células parietais (KULAKSIZ et al., 2000; BAROCELLI; BALLABENI, 2003) e são acoplados a proteína G_q, que uma vez ativada induz aumento de [Ca²⁺]_i via PLC, (SCHUBERT, 2004.; ATHMANN et al., 2000) promovendo a fusão das vesículas contendo a H⁺,K⁺-ATPase com a membrana apical das células parietais (ANDERSON; CARLSSON, 2005; SCHUBERT; PEURA, 2008). A gastrina pode atuar ainda indiretamente, por meio da liberação de histamina pelas células ECL (FRIIS-HANSEN, 2006) pela ativação dos receptores CCK₂, via cascata de sinalização do Ca²⁺ (Figura 1) (KULAKSIZ et al., 2000; ATHMANN et al., 2000).

A histamina estimula a secreção de ácido diretamente pela ligação a receptores H₂ (VUYYURU et al., 1995; VUYYURU.; SCHUBERT, 1997; ROULEAU et al., 2004) que estão acoplados a ambas as vias de sinalização das proteínas triméricas G_q e G_s (ATHMANN et al., 2000). A principal via de transdução envolvida na secreção ácida é a G_s, que quando ativada culmina no estímulo da adenilato ciclase (AC), acarretando o aumento dos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) intracelular (ATHMANN et al., 2000; CHEN et al., 2006; SCHUBERT; PEURA, 2008). Isto promove o estímulo da proteína cinase dependente de AMP_c (PKA), iniciando a cascata de eventos fosforilativos, o que culmina com a fusão das vesículas contendo a H⁺,K⁺-ATPase com a membrana apical das células parietais, com ativação dessa bomba (Figura 1) (YAO; FORTE, 2003; SCHUBERT; PEURA, 2008). A histamina também pode atuar indiretamente pela ativação de receptores H₃ inibindo a secreção de somatostatina e, portanto, o estímulo da secreção de histamina e gastrina (VUYYURU et al., 1995; VUYYURU.; SCHUBERT, 1997; ROULEAU et al., 2004).

A inibição da secreção ácida gástrica é o principal efeito fisiológico da somatostatina no sistema digestório. A somatostatina, presente nas células D, atua

diretamente nas células parietais inibindo a enzima H^+ , K^+ -ATPase e indiretamente por inibir a secreção de histamina pelas células ECL e secreção de gastrina pelas células G (SCHUBERT, 2004).

As prostaglandinas (PGs) exercem efeitos inibitórios sobre a célula parietal (WALLACE, 2001) ao ligar-se ao receptor de PGE_2 na célula parietal ativando a proteína G inibitória (G_i), a qual inibe a enzima adenilato ciclase. As PGs endógenas modulam a secreção ácida pelo bloqueio do aumento de AMPc estimulado por histamina dentro da célula parietal (ATAY et al., 2000).

1.2.3 Mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal

A mucosa gástrica é continuamente exposta a várias substâncias endógenas e exógenas irritantes, entre as quais o ácido clorídrico (HCl), refluxo de sais biliares, álcool, medicamentos e bactérias capazes de causar reações inflamatórias (WALLACE, 2008) acarretando em injúrias na mucosa gástrica. Estas podem ocorrer quando fatores nocivos “sobrecarregam” os mecanismos de defesa da mucosa gástrica ou quando os mesmos estão danificados (WALLACE; GRANGER, 1996).

Em condições normais, a integridade da mucosa é mantida por mecanismos de defesa, que incluem fatores pré-epiteliais, epiteliais e subepiteliais (figura 2). Pode-se destacar como fatores defensivos: a maré alcalina, sensores submucosos de ácido, capacidade de renovação celular realizada pela proliferação de células progenitoras, fluxo sanguíneo pelos microvasos da mucosa, barreira endotelial, inervação sensorial e pela ação dos moduladores da barreira gástrica (figura 2) (ZHU; KAUNITZ, 2008; LAINE.; TAKEUCHI.; TARNAWSKI, 2008).

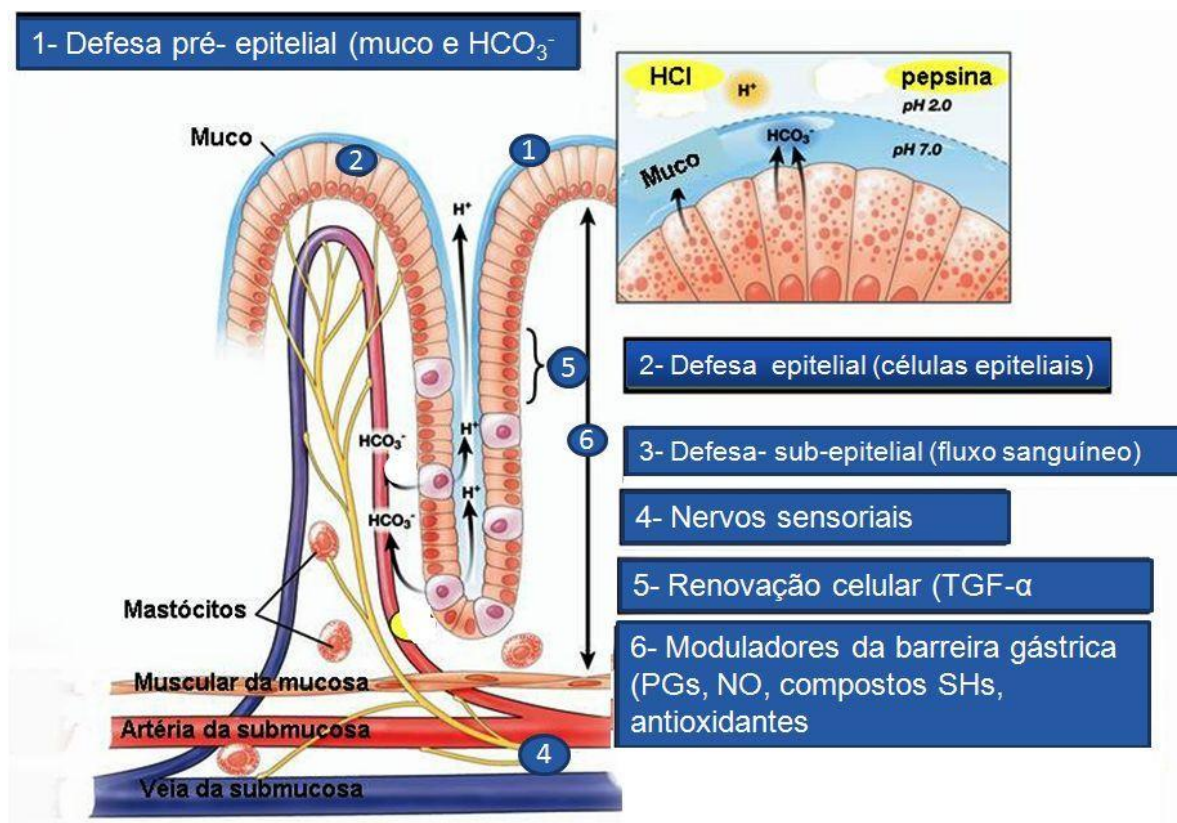


Figura 2. Representação esquemática dos fatores agressores e mecanismos de defesa da mucosa gástrica. (Adaptado Laine; Takeuchi; Tarnawski, 2008)

1.2.3.1 Defesa pré - epitelial: barreira de muco-bicarbonato-fosfolípidos

A barreira de muco-bicarbonato-fosfolípidos é considerada a primeira linha de defesa da mucosa contra agentes agressores endógenos (ácido e pepsina) e exógenos (etanol, AINEs e bactérias). Esta barreira recobre a superfície da mucosa e retém o bicarbonato secretado pelas células epiteliais, o que auxilia na manutenção de um pH neutro, atuando como uma barreira física contra a pepsina luminal e, portanto, evitando a digestão proteolítica do epitélio superficial (ALLEN; FLEMSTROM, 2005).

O muco gástrico é um importante fator protetor aderido à mucosa e consiste em um gel viscoso, elástico e transparente, formado por água (95%) e glicoproteínas (mucinas, 5%) que abrange toda a mucosa gástrica (REPETTO.; LLESUY, 2002). Fica armazenado em grânulos citoplasmáticos na região apical das células epiteliais superficiais até que ocorra exocitose. A sua secreção é estimulada por hormônios

gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, assim como PGE₂ e agentes colinérgicos (MONTROSE et al., 2006).

A secreção de HCO₃⁻ cria um gradiente de pH na superfície epitelial do estômago e do duodeno, importante para proteção da mucosa contra os efeitos de várias substâncias nocivas, entre as quais, o ácido gástrico (ALLEN; FLEMSTROM, 2005). Dentre os mediadores da secreção de HCO₃⁻ inclui-se as PGs, óxido nítrico (NO), fator liberador de corticotrofina (CRF), melatonina, uroguanilina e orexina A (MONTROSE et al., 2006.; KONTUREK et al., 2004).

1.2.3.2 Defesa epitelial

Outra linha de defesa da mucosa gástrica é constituída por uma camada contínua de células epiteliais que formam uma barreira que impede a retrodifusão de ácido gástrico e pepsina, secretam muco, bicarbonato e produz PGs, proteínas de choque térmico (HSPs), fator trefoil (TFFs), e catelicidinas (ROKUTAN, 2000; MIZUSHIMA, 2007; HIARATA et al., 2009).

As HSPs são fundamentais para a manutenção da homeostase celular durante o crescimento normal das células e para a sobrevivência durante vários eventos celulares de estresse. Elas são geradas por células epiteliais gástricas em resposta ao estresse oxidativo, agentes citotóxicos, aumento de temperatura, evitando a desnaturação de proteínas e lesão celular (ROKUTAN, 2000; MIZUSHIMA, 2007; HIARATA et al., 2009). A HSP70, por exemplo, atua prevenindo a desnaturação de proteínas protegendo a célula contra a injúria, em resposta as ações nocivas. O aumento na expressão dessas proteínas pode estar implicado como um fator adicional no mecanismo de defesa da mucosa gastrointestinal (REPETTO; LLESUY, 2002), além de acelerar o processo de cicatrização de úlceras gástricas (OKABE; AGAMASE, 2005).

Os TFFs gástrico medeiam a reparação da mucosa, estimulando a migração celular, apoptose, inibem a inflamação e aumentam a função da barreira de muco (GIARAUD et al., 2007; HERNÁNDEZ et al., 2009).

As catelicidinas e as β-defensinas são importantes peptídeos catiônicos expressos pelo epitélio gastrointestinal que desempenham funções no sistema imune inato na superfície mucosa impedindo a colonização bacteriana e acelerando a

cicatrização da úlcera (YANG et al., 2006; WEHKAMP; SCHAUBER; STANGE, 2007).

1.2.3.3 Defesa sub-epitelial

1.2.3.3.1 Fluxo sanguíneo mucoso

Com a adequada perfusão vascular, os danos epiteliais não progridem para as camadas mais profundas da mucosa (WALLACE, 2008). A microcirculação da mucosa é essencial para o transporte de oxigênio e nutrientes, remoção de substâncias tóxicas (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008), secreção de bicarbonato e participação da cicatrização da úlcera péptica (KAWANO; TSUJI, 2000).

A mucosa gástrica pode ser exposta a altas concentrações de ácido sem que ocorram lesões significativas no epitélio (WALACE, 2008). A exposição da mucosa gástrica a agentes irritantes ou a ocorrência de retrodifusão de ácido leva a um acentuado aumento no fluxo sanguíneo. Isto parece ser essencial para a defesa da mucosa, visto que a sua abolição por meio da restrição mecânica do fluxo sangüíneo ocasiona necrose hemorrágica. Os nervos sensoriais medeiam a resposta hiperêmica (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

O sistema nervoso central (SNC) e entérico controlam o fluxo sanguíneo mucoso via regulação autócrina e parácrina de hormônios, fatores de crescimento, produção local de eicosanoides e prostaglandinas (BI; KAUNITZ, 2003.; MONTROSE et al., 2006). As terminações nervosas sensoriais aferentes podem detectar a presença do ácido e responder liberando nas proximidades das arteríolas mucosas o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), resultando no relaxamento da musculatura lisa das arteríolas, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa (WALLACE, 2008).

Lesões na mucosa gástrica são frequentemente associadas aos distúrbios na microcirculação. Os danos promovidos pelo etanol envolvem a degranulação de mastócitos, que liberam mediadores vasoconstritores. A degranulação de mastócitos e a liberação de fator ativador de plaquetas (PAF) provocadas pelo *Helicobacter pylori* também levam a *redução* do fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, em ratos (HOLZER, 2000). 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) (HOLZER, 2000).

1.2.3.3.2 Renovação celular

A renovação celular da mucosa gástrica mantém a integridade estrutural da mucosa. O epitélio é continuamente renovado por um processo bem coordenado e controlado da proliferação das células pró-genitoras, que permite a substituição da superfície epitelial danificada ou envelhecida (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). O epitélio gástrico é completamente renovado de 3-7 dias, entretanto, para células glandulares são necessários meses (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A proliferação das células pró-genitoras é controlada via receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), estimulados principalmente pelo fator de crescimento transformador α (TGF- α) e PGE₂. O peptídeo EGF não se encontra na mucosa normal, entretanto, está presente no lúmen gástrico, derivado de glândulas salivares e esofágicas e podem estimular as células pró-genitoras em caso de dano (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

A expressão de proteínas anti-apoptóticas do tipo survivina em células progenitoras gástricas evitam a apoptose e promove a mitose (CHIOU et al., 2005; JONES et al., 2008). A gastrina e prostaglandina E₂ (PGE₂) também exercem uma ação trófica sobre a mucosa gástrica por transativarem EGF-R indutor de uma proteína quinase ativada por mitógeno, estimulando a proliferação celular (PAI et al., 2002).

1.2.3.3.3 Inervação sensorial

O trato gastrintestinal apresenta riqueza em sistemas neuronais. A mucosa gástrica e os vasos submucosos são inervados por neurônios primários sensoriais aferentes os quais constituem um sistema de emergência que é posto em funcionamento quando a mucosa gástrica é ameaçada pelo ácido gástrico e outros agentes químicos nocivos (HOLZER, 1998; EVANGELISTA, 2006.; OHNO et al., 2008).

A ativação desses sistemas de emergência afeta diretamente o tônus das arteríolas submucosas, que regulam o fluxo sanguíneo mucoso. Terminações sensoriais dos nervos aferentes na superfície da mucosa podem detectar a presença de ácido gástrico, liberando neurotransmissores como a substância P e o CGRP resultando no relaxamento da musculatura lisa em torno das arteríolas, o que acarreta elevação do fluxo sanguíneo da mucosa. O efeito relaxante do CGRP no músculo liso vascular é largamente mediado por NO, mas também há indícios de participação de PGs vasodilatadoras nessa resposta (HOLZER, 1998.; EVANGELISTA, 2006.; OHNO et al., 2008).

1.2.3.4 Fatores moduladores da barreira gástrica

1.2.3.4.1 Prostaglandinas (PGs)

As prostaglandinas são substâncias produzidas em quase todas as células (exceto as hemácias), derivadas do metabolismo do ácido araquidônico, pela ação da enzima cicloxigenase (COX) (EBERHART; DUBOIS, 1995, BOTTING, 2006). Existem três isoformas desta enzima: COX-1 (constitutiva) que produz PGs envolvidas na manutenção das funções fisiológicas, como a proteção da mucosa gastrintestinal, a COX-2 induzível em muitas das células em resposta a injúria do tecido por agentes pró-inflamatórios e mitogênicos (HALTER et al., 2001), e a mais recente isoforma, a COX-3, expressa no córtex cerebral de cães e em baixas quantidades em outros tecidos. Em humanos, essa enzima é expressa no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

As PGs podem estimular e facilitar quase todos os mecanismos de defesa da mucosa. A geração contínua de PGI₂ e PGE₂ na mucosa gástrica é essencial para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes necrosantes e ulcerogênicos. As PGs inibem a secreção gástrica, aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa, melhoram a barreira muco-bicarbonato-fosfolipídios, aceleram o reparo epitelial e participam da restituição e cura da mucosa (TAKEDA et al., 2004; PESKAR, 2005; KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005; STARODUB et al., 2008).

As prostaglandinas formadas sob ação da COX-1 estão envolvidas com a citoproteção gástrica a qual é constituída de regulações da acidez gástrica, fluxo

sanguíneo e motilidade, além das produções de muco e bicarbonato, enquanto que as provenientes de COX-2 são responsáveis pelo processo inflamatório, regulação da aderência leucocitária nos vasos, angiogênese e reparo celular pelos fatores de crescimento (KONTUREK; KONTUREK; BRZOZOWSKI, 2005).

O efeito biológico das PGs é mediado por receptores de membranas específicos, denominados receptores EP (EP1, EP2, EP3 e EP4), que são acoplados as proteínas G de membrana e responsáveis por diferentes vias de transdução de sinal intracelular (SUGIMOTO; NARUMIYA; ICHIKAWA, 2000).

A ação protetora da mucosa pelas PGs é principalmente mediada pela via de receptores EP-1, que também aumentam a secreção de bicarbonato e do fluxo sanguíneo na mucosa danificada e diminui a motilidade gástrica (TAKEUCHI et al., 1999; ARAKI et al., 2000.; TAKEUCHI et al., 2002). E receptores EP-3 e EP-4 afetam a secreção de ácido e de muco, respectivamente (TAKAHASHI et al., 2002; KATO et al., 2005).

1.2.3.4.2 Óxido Nítrico (NO)

Outro importante fator de proteção para a mucosa gástrica é o óxido nítrico, um mediador endógeno gasoso, incolor altamente lipossolúvel que produz vários efeitos semelhantes aos das PGs no trato gastrintestinal (TGI) (WALLACE, 2008).

O NO é originado de reações que convertem o aminoácido arginina em citrulina pela ação da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). No organismo humano, são conhecidas pelo menos três isoformas dessa enzima: duas constitutivas, nNOS (neuronal), expresso no SNC e periférico e eNOS (endotelial), localizado nas células endoteliais e uma induzida, iNOS localizada nos macrófagos, neutrófilos, células da musculatura vascular e endotelial, sendo responsável pela produção de grande quantidade de NO, por uma via independente da Ca^{2+} -calmodulina (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; BEGNAMI et al., 2004; BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005; MONCADA; HIGGS, 2006).

No músculo liso gastrintestinal, o NO promove relaxamento pela ativação direta da enzima ciclase de guanilil solúvel que produz o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e indiretamente por causar hiperpolarização da membrana (TODA; HERMAN, 2005).

Na mucosa gástrica normal, o NO também é responsável por inibir a secreção ácida, estimular a síntese de PGs, resultando nos efeitos citoprotetores (MARTIN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001) como: a produção de muco e bicarbonato, aumento do fluxo sanguíneo por vasodilatação, inibição do acúmulo de neutrófilos inflamatórios por regular a expressão de moléculas de adesão no vaso e participação no processo de cicatrização de úlceras (BROZOZOWSKI et al., 1997; KATO et al., 1998; TATEMICHII et al., 2003).

O NO em baixas concentrações tem demonstrado ação antioxidante, protegendo as células dos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou peróxidos alquil, resultando na prevenção ou inibição da peroxidação lipídica (KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997; MARTIN; JIMÉNEZ; MOTILVA, 2001). Entretanto, o excesso na produção de NO está associado com estados inflamatórios na mucosa gástrica caracterizados pelo aumento na permeabilidade epitelial e perda da função da barreira de muco. Assim, os níveis de produção de NO, a isoforma geradora de NO e o estado redox das células epiteliais podem determinar os efeitos do NO sobre a permeabilidade da mucosa e conseqüentemente sobre sua proteção (SHAH et al., 2004).

1.2.3.4.3 Grupamentos sulfidrilas (SHs)

Os compostos SHs são substâncias que apresentam em sua composição grupamentos tióis (SHs), que estão presentes no muco gástrico e em diversas enzimas do sistema antioxidante, podendo ser classificados em não protéicos (tripeptídeo glutationa – GSH) e protéicos, a exemplo de compostos das proteínas de alto peso molecular, como a glutationa complexada a albumina (FAURE; LAFOND, 1995; JORDÃO-JÚNIOR et al., 1998).

A GSH é um tripeptídeo com alta capacidade doadora de elétrons (alto potencial redox negativo) devido ao grupamento tiol (-SH) na porção cisteína. Está presente em grande quantidade na mucosa gástrica (KONTUREK et al., 1987), onde desempenha um importante papel na manutenção da integridade gástrica, particularmente quando as espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas na fisiopatologia do tecido lesado (KIMURA et al., 2001),

Os compostos sulfidrílicos podem atuar direta ou indiretamente em diversos processos biológicos, como síntese de proteínas, manutenção do fluxo sanguíneo,

integridade da camada de muco-bicarbonato gástrico e metabolismo (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001). GSH pode estar envolvido na regulação da expressão de genes em resposta ao estresse. Além disso, é necessário para a conversão da prostaglandina H₂ em prostaglandina E₂ e D₂ (LU et al, 2000)

1.2.3.4.4 Sistema antioxidante

Do ponto de vista químico, os radicais livres são intermediários que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, localizados no átomo de hidrogênio, carbono, enxofre, nitrogênio ou oxigênio. Esta condição química causa um estado eletronicamente instável resultando em extrema reatividade dessas moléculas (HENKEL, 2011).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais livres, biologicamente importantes, em que o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006.; HENKEL, 2011). Tem-se como exemplo de ROSs: hidróxi-radicais (OH[•]) e ânion superóxido (O^{•-}) (HENKEL, 2011). A partir do O₂ também são geradas outras moléculas não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que participam da liberação de radicais livres. (CHEESEMAN, 1993; de ZWART et al., 1999; NAITO; YOSHIKAWA, 2002)

Quando a mucosa gástrica é atacada por fatores agressores, a exemplo do álcool, AINEs e *H. pylori*, são liberados inúmeros mediadores inflamatórios responsáveis pela infiltração de neutrófilos (PAN et al., 2008). Dentre eles estão a interleucina 1-beta (IL-1β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) que são as principais citocinas pró-inflamatórias, importantes na produção da inflamação aguda (KONTUREK et al., 2000). Estes neutrófilos produzem uma grande quantidade de ROS pela bomba respiratória (PAN et al., 2008).

Quando concentração de radicais livres excede à capacidade antioxidante da célula, ocorre o estresse oxidativo, que tem como consequência o ataque oxidativo a lipídios de membrana, a proteínas estruturais e funcionais e a ácidos nucleicos acarretando danos às células da mucosa gástrica (ARUOMA, 1995.; McCORD, 2000; ANDREOLI, 2000).

O organismo possui vários sistemas de defesa antioxidante que atuam na detoxificação das espécies reativas de oxigênio de formas diferenciadas (ZOPPI et

al., 2003). O sistema antioxidante pode ser classificado em enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é a primeira linha de defesa, sendo constituído por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GSH-Rd) (Figura 3) (CNUBBEN et al., 2001; POHLE et al., 2001)

O sistema não enzimático, segunda linha de defesa, é representado por captadores de radicais livres de baixo peso molecular como os tióis, glutathiona, vitamina E, vitamina C, carotenóides e metionina (CNUBBEN et al., 2001; POHLE et al., 2001).

Os radicais livres podem reagir com captadores de radicais, como por exemplo, superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que será oxidado pela glutathiona peroxidase (GPx) ou catalase a H_2O e CO_2 (PAN et al., 2008). A enzima SOD catalisa a dismutação do $\bullet O_2^-$ e tem como cofatores o cobre e o zinco, no caso das isoformas citoplasmáticas (CuZnSOD) e extracelular (ECSOD), ou manganês, no caso da enzima mitocondrial (MnSOD). CAT degrada o H_2O_2 , requerendo ferro como cofator (CONNER; GRISHAM, 1996; HALLIWELL, 1997; HAVSTEEN, 2002; IMAI; NAKAGAWA, 2003; BAKER, 2004; KOCH et al., 2004; RUKKUMANI et al., 2004)

A redução do H_2O_2 em água é acompanhada da conversão de glutathiona da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG), sendo essa reação mediada pela GPx (KWIECIEN, et al., 2002). A manutenção dos altos níveis de GSH e os baixos níveis de GSSG ajuda a prevenir os danos oxidativos as macromoléculas celulares (Figura 3) (BLAIR, 2010).

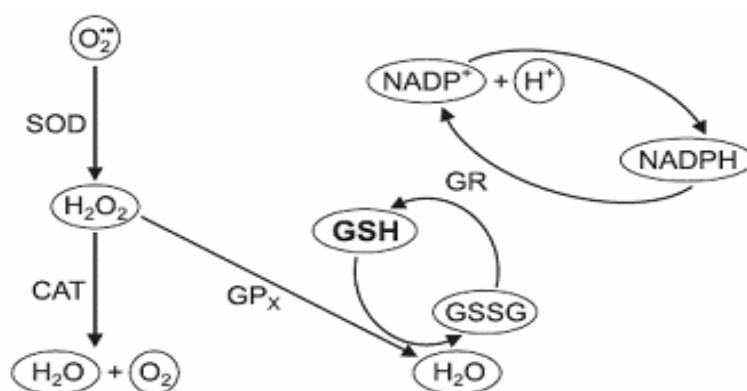


Figura 3 Sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Legenda: SOD= superóxido dismutase; CAT = catalase; GPx =Glutathiona peroxidase; GSH = glutathiona não protéica ou reduzida; GSSG = glutathiona oxidada; GSH-Rd=Glutathiona redutase; $NADP^+$ = fosfato de

dinucleotídeo adenina nictinamida; NADPH = fosfato de nicotinamida adenina reduzida (adaptado de KWIECIEN et al., 2002).

1.3 Fisiopatologia da úlcera péptica

1.3.1 Etiologia

A úlcera péptica é uma afecção do trato gastrointestinal caracterizada por inflamações severas, pontos hemorrágicos e lesões necrotizantes (CALAM; BARON, 2001). Pode acometer a parede esofágica, gástrica ou intestinal, envolvendo a camada da mucosa, podendo penetrar na muscular da mucosa e camadas da submucosa e muscular da parede do trato gastrointestinal (Figura 4) (TARNAWSKI, 2005).

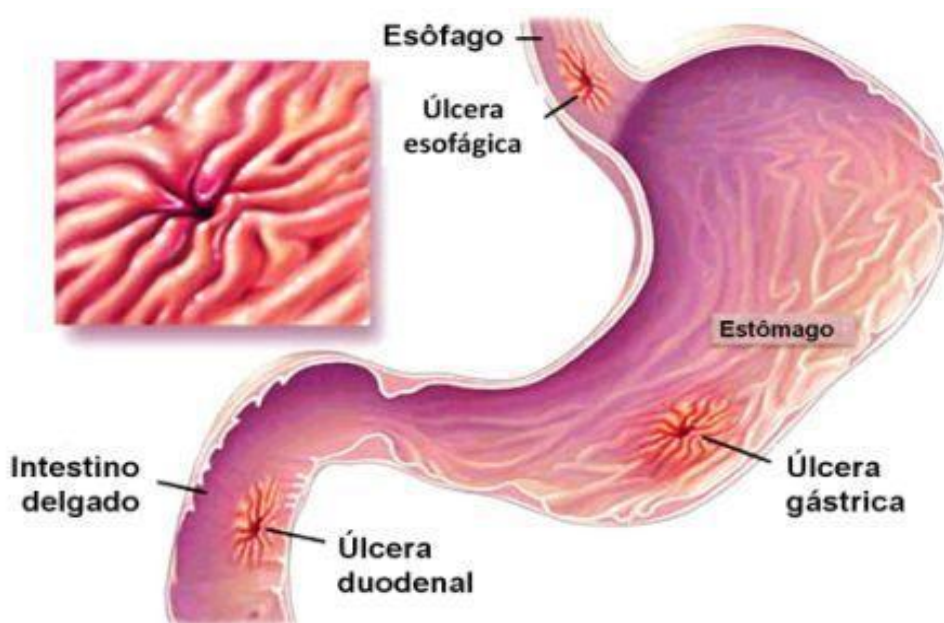


Figura 4. Úlcera péptica (adaptado de JAIN et al., 2007)

Indivíduos com úlcera péptica podem apresentar uma variedade de sintomas no trato gastrointestinal, incluindo dor epigástrica, náuseas, vômitos, sensação de plenitude e refluxo. Além disso, a úlcera péptica é a causa mais comum de hemorragias e perfuração no trato gastrointestinal superior, que estão associados a altas taxas de morbidade e mortalidade (BARKUN; LEONTIADI, 2010).

As lesões gástricas se desenvolvem a partir do desequilíbrio entre os fatores citoprotetores (muco, bicarbonato, fosfolipídios ativos, prostaglandinas, sistema antioxidante e fatores de crescimento) e agressores endógenos (HCl, pepsina,

refluxo biliar, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio e os exógenos (etanol, estresse, antiinflamatórios não-esteroidais, *Helicobacter pylori*) (BANDYOPADHYAY et al., 2001; RAINSFORD, 2001; MAITY et al., 2003).

Entre os fatores de risco que podem influenciar a formação de úlceras gástricas pode-se citar: o tabagismo, consumo excessivo de álcool, uso crônico de medicamentos, principalmente os AINEs, o estresse emocional e os fatores psicossociais, infecção por *H. pylori*, ingestão de determinados tipos de alimentos e predisposição genética. Isolados ou em associação, esses fatores contribuem de maneira significativa para o aumento da secreção de ácido clorídrico na mucosa gástrica e para a redução dos fatores gastroprotetores promovendo a formação de lesões ulcerativas (WOLFE; SANCHS, 2000; YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

O consumo excessivo de álcool pode resultar em danos como edema da mucosa, lesões hemorrágicas, esfoliação epitelial e infiltração de células inflamatórias no estômago (DINOSO; MING ;MCNIFF, 1976.; GUSLANDI, 1987; ZHAO et al., 2009). Vários fatores incluindo liberação de mediadores vasoativos (leucotrieno e histamina) levando a geração de ROS, peroxidação lipídica, retrodifusão de ácido gástrico, danos genéticos e diminuição nos níveis de prostaglandinas podem estar envolvidos na via ulcerogênica (MAROTA et al., 1999; BAGCHI et al., 1998; ZHAO et al., 2009).

Outro fator de risco relacionado a formação de úlcera gástrica no homem, é o estresse que está associado diretamente ao estilo de vida do indivíduo (FILATEROVA et al., 2007). O estresse gástrico envolve reações fisiológicas como: o acúmulo neutrofílico, produção de citocinas pró-inflamatórias, geração de ROS, diminuição do fluxo sanguíneo mucosal e aumento da secreção ácida. Porém, não se sabe qual destes fatores tem maior importância para o desenvolvimento das lesões gástricas induzidas pelo estresse (ODASHIMA et al., 2005).

O uso contínuo de AINEs no tratamento da dor, febre e inflamação também constitui fator de risco para produção da lesão gástrica (BAYIR et al., 2006). Estudos têm revelado que múltiplos elementos patogênicos podem estar envolvidos na formação de úlceras pelos AINEs, como: depleção de prostaglandinas por inibição da enzima ciclooxigenase (COX) (WHITTLE, 1981; WALLACE et al., 2000; TANAKA et al., 2002), supressão da microcirculação gástrica (SUZUKI et al., 2000), aumento de apoptose (SLOMIANY et al., 1997), ativação de neutrófilos (WALLACE et al.,

1990), formação de ROS (WALLACE, 2001) e secreção aumentada de ácido (MOTAWI et al. 2008).

A inibição da ativação de COX causada por AINEs induz à diminuição na biossíntese das prostaglandinas prejudicando a integridade da camada mucobicarbonato na superfície epitelial, bem como a liberação de muco (LICHTENBERGER et al., 1995; HAWKINS; HANKS, 2000; HAWKEY; LANGMAN, 2003) além de ocasionar redução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica com consequente formação da lesão (WALLACE et al., 2000).

A patogênese da lesão gastrointestinal induzida por AINES também depende de vias independentes de PG, como fosforilação oxidativa, redução na proliferação celular da mucosa e ativação de neutrófilos, seguido pelo aumento de adesão endotelial. Estes mecanismos, juntamente com os relacionados à inibição da síntese de PG, conduzem à oclusão de microvasos e superprodução de metabólitos reativos de oxigênio capazes de induzir lesão tecidual oxidativa (FORNAI et al., 2005).

O *H. pylori* é um bastonete gram-negativo, flagelado em forma de espiral, que cresce em meio microaerófilo e costuma colonizar o estômago e duodeno humano. Apesar de o estômago ser um ambiente inadequado para a colonização bacteriana devido a sua alta acidez, o *H. pylori* consegue sobreviver e se desenvolver por uma intensa atividade da enzima urease que aumenta o pH local tornando-se um micro ambiente adequado para o seu desenvolvimento (USTUN et al., 2006).

Sabe-se que em países desenvolvidos a média de colonização pelo *H. pylori* está próximo aos 40%, podendo chegar a aproximadamente 80% em regiões carentes destes países e nos países em desenvolvimento (BONAMIGO et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2007).. Não existem diferenças significativas entre os gêneros na soroprevalência, porém sabe-se que a mesma aumenta progressivamente com a idade. Atualmente é reconhecida como principal fator de risco para o desenvolvimento de úlceras gastroduodenais por estar presente em 95% dos casos de úlceras duodenais e 60-80% das úlceras gástricas (PASSOS, 2007; LINZ; SCHUSTER, 2007).

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, LPS, quimiocinas, citotoxinas (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 hospedeiro (KONTUREK et al., 2006).

A infecção não é autolimitada e pode ser crônica, acompanhando o hospedeiro durante décadas ao longo da vida, muitas vezes de forma assintomática, exceto quando desencadeia uma inflamação crônica na mucosa gástrica (BONAMIGO et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2007).

As lesões gástricas provocadas pelo *H. pylori* resultam principalmente da capacidade de chegar até as células da mucosa gástrica, acompanhados pelo aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 8 (IL-8) e TNF- α . Esta ação atua de forma a afetar a secreção de ácido gástrico e altera a taxa de gastrina-somatostatina, bem como, altera a atividade secretora das células mucosas, produtoras de muco/ HCO₃⁻, e a qualidade de aderência da camada de muco, resultando em gastrites agudas e conseqüentemente, crônicas (KONTUREK et al., 2005).

Dentre as causas que estão associadas ao aumento nas taxas de ocorrência de ulceração gastrintestinal na população mundial, está o hábito de fumar (MAITY et al., 2003). Tais danos estão relacionados aos efeitos que os compostos presentes no cigarro (nicotina) podem acarretar ao organismo como, o aumento da secreção ácida e do pepsinogênio pelo estímulo vagal e aumento da liberação de histamina. Esse agente agressor ainda é responsável pela diminuição do muco, bicarbonato e síntese de PGE₂ (MAITY et al., 2003), dos fatores de crescimento, aumento da resposta inflamatória (SHIN et al., 2002; MAITY et al., 2003), com conseqüente aumento de ROS (MAITY et al., 2003).

1.4 Epidemiologia da úlcera péptica

Estudos epidemiológicos mostram que a úlcera péptica é um agravo à saúde pública, uma vez que afeta entre 8 a 10% da população dos países considerados industrializados. No continente americano quase 2 milhões de adultos sofrem de úlcera ativa em alguma fase da vida sendo que somente nos Estados Unidos pode-se estimar cerca de 4 milhões (FERREIRA, 2005).

No Brasil, apesar de ser uma doença freqüente, não se conhece precisamente sua real incidência, sendo estimado cerca de 1 a 20%, devido à variação nas

populações estudadas e as diferenças na coleta dos dados e nos critérios de diagnóstico (BERSTAD; BERSTAD, 1993.; d'ACCAMPORA et al., 2008.; CASTRO et al., 2009).

A úlcera péptica alcança aproximadamente entre 11 a 20% dos homens e 8 a 11% das mulheres (FERREIRA, 2005) e a proporção do sexo masculino e do feminino para úlceras duodenais é cerca de 3:1 e para as úlceras gástricas é cerca de 2:1 (LIU; CRAWFORD, 2005).

Dados afirmam que as úlceras gástricas são mais freqüentes nos países orientais, especialmente no Japão, enquanto que as úlceras duodenais são mais freqüentes em populações ocidentais (YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

Atualmente, as pesquisas científicas envolvendo úlcera péptica estão direcionadas ao estudo de *H. pylori*, considerada uma das maiores responsáveis pela incidência dessa doença no homem pela sua disseminação nas vias oral-oral e fecal-oral (WATANABE; CHIBA, 2002). A infecção por *H. pylori* é usualmente maior que 80 % em países em desenvolvimento; entretanto, apenas 15 % das pessoas infectadas por *H. pylori* desenvolve úlcera péptica (MAJUMDAR et al., 2007). A erradicação do *H. pylori* reduz drasticamente a reincidência de 67 % para 6 % em pacientes com úlceras duodenais e de 59 % para 4 % em pacientes com úlceras gástricas (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007)

O uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) é a causa mais comum de úlceras pépticas em pacientes sem infecção por *Helicobacter pylori* (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007). O uso de AINEs é o responsável por aproximadamente metade das úlceras perfurativas, ocorrendo mais comumente em pacientes idosos que estão fazendo uso de aspirina ou outros AINEs para doenças cardiovasculares ou artropatia (RAMAKRISHNAN; SALINAS, 2007).

1.5 Terapêutica da úlcera péptica

A terapêutica das doenças ulcerosas surge como forma de aliviar os transtornos causados por essa doença que acomete populações do mundo inteiro. O tratamento farmacológico da úlcera gástrica está baseado no uso de substâncias que inibem a secreção ácida no estômago ou que promovem o estímulo dos mecanismos protetores da mucosa gástrica (ALKOFAHI; ATTA, 1999).

Com base na compreensão dos mecanismos relacionados a fisiopatologia da úlcera péptica e particularmente para o controle da secreção do ácido gástrico, existe no mercado mundial uma variedade de estratégias terapêuticas (JAIN et al., 2006). Então, várias classes de medicamentos, como antiácidos, antagonistas do receptor H_2 , inibidores da bomba de prótons e agentes citoprotetores foram e têm sido desenvolvidos (Figura 5) (BHATTACHARYA et al., 2007).

Os antiácidos foram desenvolvidos na perspectiva de neutralizar a acidez gástrica. Como representantes pode-se citar o bicarbonato de sódio, carbonato de cálcio, hidróxido de alumínio e hidróxido de magnésio (JAIN et al., 2007). Devido aos seus efeitos adversos (diarréia, prisão de ventre, interferência na absorção de drogas e raros distúrbios ácido-base) esses medicamentos são raramente utilizados como terapia primária nos transtornos ocasionados pela acidez gástrica (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Na perspectiva de inibir a secreção ácida gástrica, surgiram os anticolinérgicos (pirenzepina e telenzepina). Entretanto, o uso dessa classe tornou-se pouco usual, devido principalmente a sua relativamente baixa eficácia, uma vez que interagem com receptores muscarínicos do tipo M_1 e apresentarem acentuados efeitos colaterais (HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005), a exemplo de taquicardia (AIHARA, et al., 2003), secura na boca, cefaléia e confusão mental, (HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005).

Os antagonistas dos receptores H_2 (cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina) surgiram como forma de inibir completamente a interação da histamina com receptores H_2 reduzindo assim, tanto volume quanto concentração de íons H^+ do suco gástrico. Eles são seletivos e têm pouco ou nenhum efeito sobre receptores H_1 . Também inibem a secreção ácida ocasionada pela gastrina, agonistas muscarínicos, alimentos, distensão fúndica, bem como outros agentes farmacológicos. Inibem ainda a secreção ácida basal e noturna. Este efeito contribui de maneira importante para a sua eficácia clínica (JAIN et al., 2007). A incidência global dos efeitos adversos é baixa e os efeitos dos antagonistas do receptor H_2 são de pouca intensidade. Esses incluem diarréia, cefaléia, tontura, fadiga, dor muscular, prisão de ventre, e ainda, pode ocorrer ginecomastia em homens e galactorréia em mulheres (HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005).

Nos últimos anos uma atenção especial tem sido dada aos agentes anti-secretores da classe benzimidazol sulfóxido, principalmente devido aos seus efeitos de inibição do bombeamento de prótons pela H^+ , K^+ -ATPase como um meio de controlar o pH gástrico (JAIN et al., 2007). Os inibidores de bomba (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol e esomeprazol) são pró-fármacos, os quais necessitam de ativação em ambiente ácido (AIHARA, et al., 2003; HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005). Esses agentes penetram na célula parietal a partir do sangue (HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005) e se acumulam nos canalículos secretores (AIHARA, et al., 2003; HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005) onde devido à sua fraca natureza básica, são ativados resultando na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio da ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteína no domínio extracelular da H^+ , K^+ -ATPase, promovendo a inibição da bomba de próton (HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005). A sua utilização na clínica requer monitoramento clínico, pois o uso prolongado desses medicamentos pode resultar em hipergastrinemia, hipersecreção ácida rebote, má absorção, infecção e câncer (AIHARA, et al., 2003.; JAIN et al., 2007).

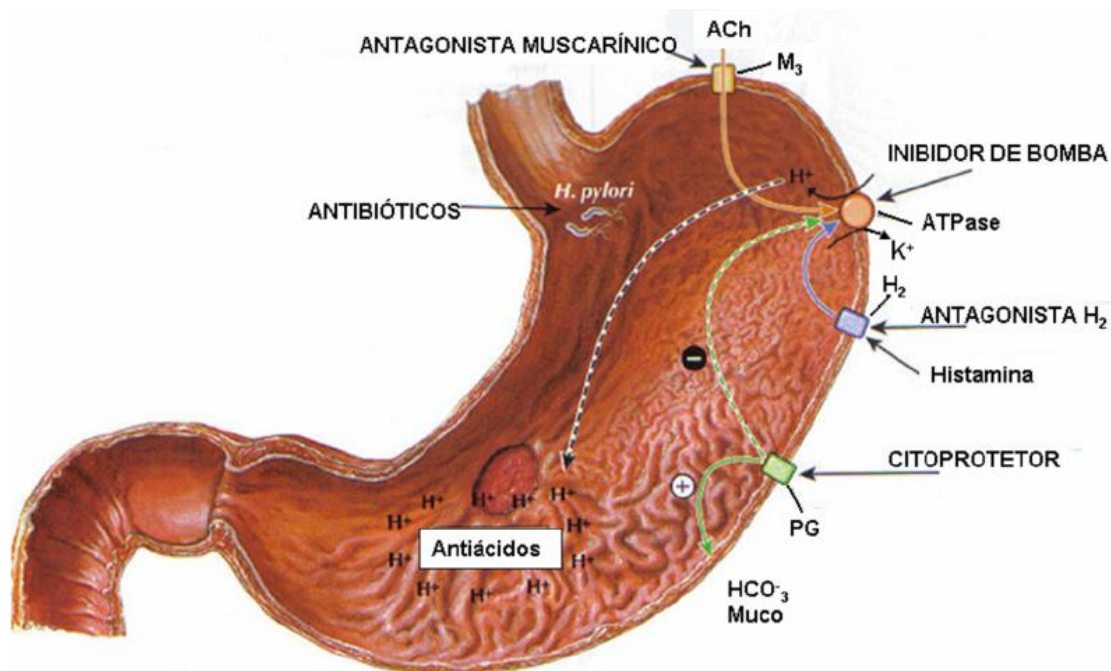


Figura 5. Terapêutica da úlcera péptica (adaptado de RAFFA, RAWLS, BEYZAROV, 2006)

Nos casos em que a doença ulcerativa péptica está associada à infecção por *H. pylori*, a terapêutica utilizada constitui em uma combinação de inibidor de bomba de prótons (omeprazol) ou antagonista do receptor H_2 (ranitidina), associado à dois

antibióticos, claritomicina e amoxicilina ou claritomicina e metronidazol, ou ainda, o inibidor de bomba associado aos dois antibióticos e em conjunto com sais de bismuto (CHENTER; RODRIGUES-JÚNIOR, 2002; MAJUNDAR et al., 2007). O objetivo do tratamento é erradicar a bactéria e conseqüentemente, evitar a reincidência da úlcera (HOOGERWERF; PARSRICHA, 2005; MAJUNDAR et al., 2007). Entretanto, essa terapia apresenta fatores limitantes como náusea, diarreia e tontura (JAIN et al., 2007).

Nos últimos anos, a terapia da úlcera gástrica, além de focada em drogas que possuem como ação farmacológica a inibição da secreção ácida e a remoção de agentes lesivos (AINEs e *H. pylori*) (SCHUBERT; PEURA, 2008), envolve também agentes que possam aumentar os fatores protetores da mucosa, como os citoprotetores (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Entre os representantes dessa classe o sucralfato, sais de bismuto, misoprostol (análogo da PGE₂ de uso hospitalar) e a carbenoxolona (ferramenta farmacológica), todos esses também podem produzir efeitos colaterais (MÖSSNER; CACA, 2005).

A terapêutica da úlcera gástrica tem apresentado um grande avanço nos últimos anos no desenvolvimento de novos fármacos, entretanto, apresenta fatores limitantes quanto à eficácia, produção de efeitos colaterais (DEBASHIS et al., 2002) e alta taxa de recorrência de úlcera (40-80 %) um ano após o tratamento com os antagonistas dos H₂ e os inibidores da bomba de prótons (PPIs) (SZABO; VINCZE, 2000).

Diante dessas considerações se faz necessário investir na pesquisa de novos alvos terapêuticos, a exemplo de plantas medicinais, na perspectiva de garantir alta eficácia, poucos efeitos colaterais e ausência de recidiva.

1.6 Plantas como uma nova alternativa terapêutica

1.6.1 Plantas medicinais

Pesquisas pré-clínicas confirmam a eficácia de várias plantas medicinais no tratamento de doenças gastrintestinais, sendo as suas propriedades terapêuticas atribuídas a diferentes compostos orgânicos e inorgânicos como alcalóides, cumarinas, terpenóides, taninos, ácidos fenólicos e micronutrientes antioxidantes, como cobre e manganês (CHECHINEL-FILHO.; YUNES, 2001; MOTA et al, 2009).

Estudos farmacológicos mostram que muitas plantas medicinais têm sido úteis no tratamento de distúrbios gástricos atuando por diferentes mecanismos, como: *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira (BATISTA et al., 2004) e *Byrsonima crassa* (SANNOMIYA et al., 2005), com compostos que atuam como “varredoras” de espécies reativas de oxigênio na superfície da mucosa gástrica, *Cissus quadrangularis* cuja ação gastroprotetora está associada com sua capacidade de suprimir citocinas pró-inflamatórias e de agir como um antioxidante (JAINU; DEVI, 2006), além daquelas já estudadas pelo nosso grupo como: *Praxelis clematidea* (FALCÃO, 2007), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rígida* (SANTOS, 2008) e *M. obtusifolia* (MOTA, 2009).

O estudo de plantas medicinais é multidisciplinar, envolvendo as áreas da botânica, química, farmacologia e toxicologia. Qualquer pesquisa na atividade farmacológica de compostos naturais depende da integração das áreas mencionadas (RATES, 2001).

1.7 Considerações sobre a família Combretaceae e sobre a espécie *Combretum duarteanum*

Combretaceae é uma grande família de ervas, arbustos escandentes e árvores, que possui cerca de 13 gêneros e 500 espécies, com distribuição tropical, ocorrendo em ambientes quentes de todos os continentes, com centros de diversidade na África e Ásia (STACE, 2004.; LOIOLA et al., 2009).

O tratamento mais completo para Combretaceae no Brasil foi realizado por Eichler (1867), que reconheceu nove gêneros e 65 espécies. Entretanto, de acordo com Marquete e Valente (2006), atualmente estima-se a ocorrência de 78 espécies subordinadas a seis gêneros no país.

Os maiores gêneros dessa família são: *Combretum*, *Terminalia* e *Quisqualis*. Os outros gêneros são: *Anogeissus*, *Buchenavia*, *Bucida*, *Calopyxis*, *Calycopteris*, *Conocarpus*, *Dansiea*, *Guiera*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Macropteranthes*, *Melostemon*, *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Strephonema*, *Terminaliopsis* e *Thilo* (KLOPPER et al., 2006).

Na Paraíba foram registradas 11 espécies subordinadas a cinco gêneros: *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard, *Combretum duarteanum* Cambess., *C. fruticosum* (Loefl.) Stuntz, *C. glaucocarpum* Mart., *C. hilarianum* D. Dietr., *C.*

lanceolatum Eichler, *C. laxum* Jacq., *C. leprosum* Mart., *C. pisonioides* Taub., *Conocarpus erectus* L. e *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. A maioria das espécies possui distribuição restrita, algumas ocorrem em manguezais, outras em ambientes de Caatinga ou em área de Floresta Atlântica (LOILA et al., 2009).

Estudos fitoquímicos realizados para o gênero *Combretum* têm demonstrado a ocorrência de muitas classes de constituintes, incluindo terpenos, estilbenóides, flavonóides, taninos e lignanas (FACUNDO et al., 1993.; MASIKA; AFOLAYAN, 2002; KATERERE et al., 2003.; CHOWDHURY; ISLAM, 2004; ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008).

Metabólitos secundários foram isolados de várias espécies pertencentes a esse gênero, entre eles destacam-se triterpenos pentacíclicos obtidos da *C. molle*, *C. edwardsii*, *C. eleagnoides*, *C. apiculatum*, *C. kraussi*, *C. padoides* e *Anogeissus leiocarpus* (ROGERS; VEROTTA, 1996; KATERERE et al., 2003; ANGEH et al., 2007; CHAABI et al., 2008)., alcalóides de *C. micranthum* (CORSINO et al., 1998), flavonóides de *C. leprosum* (FACUNDO et al., 1993) e *C. erythrophyllum* (MARTINI et al., 2004) e estilbenóides de *C. apiculatum*, *C. psidioides* e *C. molle* (LETCHER; NHAMO, 1971, 1972, 1973; LETCHER et al., 1972).

Vários estilbenóides e dihidroestilbenóides (as combrestatinas) com atividade citotóxica, assim como triterpenoídes e seus glicosídeos com atividade moluscicida, antifúngica, antimicrobiana e antiinflamatória foram isoladas de espécies de *Combretum* (PETTIT et al., 1988; ROGERS, 1989a,b).

As espécies de Combretaceae não se destacam pelo valor econômico, poucas são cultivadas como ornamentais. Algumas são referidas pelo seu emprego na medicina popular (BRAGA 1960; AGRA 1996; FYHRQUIST et al. 2002) no tratamento de distúrbios abdominais, infecções bacterianas, câncer, tosses, diarreia, disenteria, febre, úlceras gástricas, doenças cardíacas, hipertensão, icterícia, hemorragias, doenças de pele, pneumonia, sífilis, dentre outras (OLIVER-BEVER, 1986; IWU, 1993; HUTCHINGS et al., 1996; NEUWINGER, 1996; FYHRQUIST et al., 2002) ou pelo seu potencial farmacológico para possíveis atividades anti-infecciosas, incluindo antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (FÉRREA et al. 1993; BABA-MOSSA et al. 1999; ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008).

Tem sido demonstrado que alguns extratos ou princípios ativos obtidos de espécies de *Combretum* possuem um amplo espectro de atividades biológicas

incluindo, propriedades anticancerígenas, citotóxicas, analgésicas, antiinflamatória, hepatoprotetora, antibacteriana, antiviral e antiprotozoária (NABHA et al., 2000; MCGAW et al., 2001; GRIGGS et al., 2001; ASRES et al., 2001; ADNYANA et al., 2001; FYRQUIST et al., 2002; ANCOLIO et al., 2002; ALI et al., 2002; LIRA et al., 2002; OLAJIDE et al., 2003; CIRLA; MANN, 2003; NAM, 2003; YOUNG; CHAPLIN, 2004; MARTINI et al., 2004; BENSSONG et al., 2005).

Algumas espécies de Combretaceae, como *Combretum dolichopetalum* (ASUZU; NJOKU, 1992), *Combretum leprosum* (NUNES et al., 2008), *Terminalia pallida* (GUPTA et al. 2005) e *Guiera senegalensis* (ANIAGU et al. 2005) apresentaram propriedades antiulcerogênicas frente a modelos de indução aguda de úlcera (etanol absoluto e AINEs) assim como em modelos que avaliam a atividade antissecretória (ligadura de piloro) e indutora da produção de muco.

Combretum duarteanum Cambess, espécie selecionada para o estudo, é conhecida popularmente como mofumbo, cipiúba e cipaúba. São arbustos eretos a escandentes, exclusivos da América do Sul, com registro na Bolívia, Paraguai e Brasil (EXELL, 1953). Segundo Loiola & Sales (1996), ocorre no Brasil nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Piauí), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo). A presença desta espécie está associada a ambientes de caatinga e foi relatada para os estados da Bahia, Paraíba e Pernambuco (LOIOLA, SALES 1996). Sua ocorrência na Paraíba está restrita à Caatinga, encontrada geralmente em afloramentos rochosos.

Essa espécie ainda é pouco estudada, havendo relatos do uso na medicina popular para o tratamento de dores, inflamações e problemas relacionados ao TGI, sendo, portanto, o seu critério de escolha para o estudo, o etnofarmacológico. Estudos fitoquímicos ainda estão sendo realizados pelo grupo do Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, porém há indicativos da presença de triterpenos pentacíclicos e flavonóides (dados não mostrados) o que corrobora os estudos fitoquímicos realizados em outras espécies do gênero *Combretum*.



Figura 6. Fotos de *Combretum duarteianum* Cambess (Josean Fachine Tavares, 2010).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este projeto teve como objetivo avaliar a atividade gastroprotetora do extrato etanólico bruto (EEtOH-Cd) da fase hexânica (FaHex-Cd) obtidos das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess, em modelos animais que mimetizam a úlcera gástrica no homem.

2.2 Objetivos Específicos

- Executar triagem farmacológica comportamental e determinação da Dose Letal 50 % do EEtOH-Cd;
- Avaliar, pela triagem farmacológica, o efeito gastroprotetor do EEtOH-Cd frente ao agente lesivo HCl/etanol;
- Avaliar o EEtOH-Cd e da FaHex-Cd em modelos clássicos de indução aguda de úlceras (etanol, estresse e antiinflamatório não-esteroidal);
- Investigar o efeito do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd sobre os parâmetros bioquímicos da secreção gástrica (pH, concentração de íons H⁺, volume de suco gástrico);
- Elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor da *C. duarteanum*.;
- Investigar a atividade cicatrizante do EEtOH-Cd e FaHex-Cd sobre o modelo de indução de úlcera por ácido acético;
- Avaliar a toxicidade do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd durante 14 dias de tratamento da úlcera induzida com ácido acético, por meio do consumo de água e ração, peso corpóreo, peso dos órgãos e análises bioquímicas e hematológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Local da pesquisa

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF) da Universidade Federal da Paraíba no período de março/2009 a dezembro/2010.

3.1.2 Material botânico

O material vegetal utilizado nos experimentos de toxicidade aguda, investigação da atividade gastroprotetora e cicatrizante em animais foram obtidos das folhas da espécie *Combretum duarceanum* Cambess, coletada no município de Serra Branca, Estado da Paraíba, em 2007. Esta espécie foi identificada pela Dra. Maria de Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB, sob código de identificação M. F. Agra et al., 6767.

O extrato etanólico bruto (EEtOH) e a fase hexânica (FaHex) obtidos das folhas de *Combretum duarceanum* Cambess foram fornecidos pelo colaborador da fitoquímica, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares e sua equipe, todos do LTF/UFPB.

3.1.3 Obtenção do extrato etanólico bruto e da fase hexânica de *Combretum duarceanum* Cambess

O material vegetal seco e pulverizado das folhas de *Combretum duarceanum* (1,034g) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, resultando numa solução etanólica, a qual foi filtrada e concentrada em um rotaevaporador, obtendo-se o EEtOH-Cd.

O EEtOH-Cd (260,57 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando seguidamente os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, para

obtenção das fases hexânica (65,48 g), clorofórmica (28,71 g), acetato de etila (15,57 g) e n-butanólica (2,54 g), respectivamente (Figura 7).

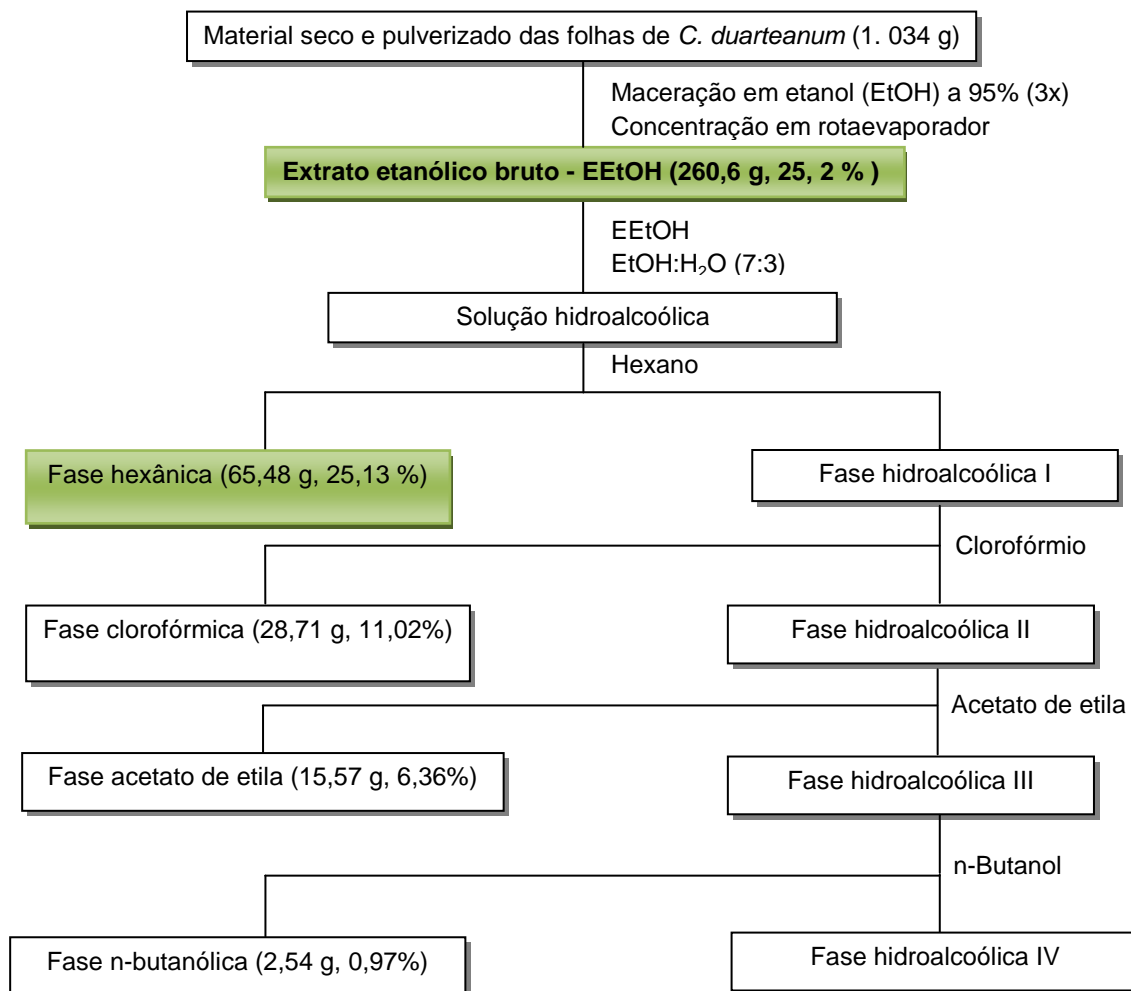


Figura 7. Marcha fitoquímica para obtenção do EEtOH e da FaHex obtidos das folhas de *Combretum duarteanum*. (Realizada pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Josean Fachine Tavares/LTF/UFPB).

3.1.4 Animais

Os animais utilizados nos modelos experimentais de toxicidade aguda, investigação da atividade gastroprotetora e cicatrizante promovidas por *Combretum duarteanum* foram camundongos (*Mus musculus*) albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss pesando entre 25-35 g (figura 8A) ou ratos (*Rattus norvegicus*) albinos machos, linhagem Wistar pesando entre 180-250 g (figura 8B), procedentes

do Biotério “Prof. Thomas George” do LTF/UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias, antes dos ensaios experimentais sob temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclos claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Purina tipo pellets e água *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos, os animais foram submetidos a um jejum (12-36h) que variou de acordo com o preconizado nas metodologias empregadas. Os animais ($n = 5-7$) foram distribuídos em grupos controle negativo (solução tween 80 12%), controle positivo (droga de referência ou ferramenta farmacológica) e amostra vegetal (EEtOH-Cd ou FaHex-Cd).

Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguindo os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERNAM, 1983) e quando necessário de acordo com o protocolo experimental, foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5 % (anestésico) e cloridrato de xilazina 2 % (relaxante muscular), no intuito de diminuir a dor e o sofrimento.

Para a realização deste trabalho, os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPALTF/UFPB com o registro n 0211/09 (ANEXO 1).

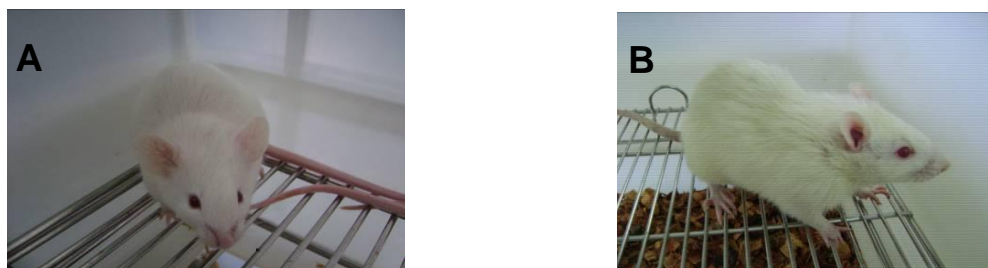


Figura 8. Animais utilizados: (A) camundongo Swiss (*Mus musculus*) e (B) rato Wistar (*Rattus norvegicus*). Fotos pertencentes ao arquivo do grupo de farmacologia de TGI.

3.1.5 Drogas utilizadas

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas as seguintes drogas: carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cimetidina (SIGMA Chemical), piroxicam 20 mg (HEXAL, Brasil), N-etilmaleimida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), N-nitro-L-arginina-metil-éster (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de sódio P.A. (QUIMEX-MERCK, Brasil), hidróxido de sódio (QUIMEX-MERCK, Brasil), fenoftaleína (RIEDEL-DE HAËN, Germany), tween 80 (MERCK, Germany), etanol (MERCK, Germany) e alcian Blue (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido acético

(SYNTH), ácido clorídrico (MERCK, Germany), quetamina 5% (VETANARCOL), xilazina 2 % (DORCIPEC), cloreto de magnésio (MERCK) e sacarose (SIGMA Chemical Co, U.S.A).

O EEtOH-Cd e a FaHex-Cd foram solubilizados em solução tween 80 12%. As substâncias utilizadas como controle positivo, carbenoxolona e cimetidina, assim como os bloqueadores do óxido nítrico e grupamentos sulfidrílicos, N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e o N-etilmaleimida (NEM), respectivamente, foram solubilizadas em solução salina 0,9%.

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaio toxicológico de *Combretum duarteanum* Cambess

3.2.1.1 Estudo comportamental e determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀) (ALMEIDA et al., 1999)

O extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess foi submetido ao ensaio toxicológico agudo com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais frente ao SNC e ao SNA, utilizando como protocolo experimental o modelo descrito por Almeida et al. (1999), além de avaliar o consumo de água e ração, alterações e peso dos órgãos alvos e o índice de letalidade (DL₅₀).

Para a realização desse experimento, foram utilizados camundongos albinos machos e fêmeas da linhagem Swiss pesando entre 25-35 g, os quais foram divididos em 4 grupos, 2 grupos de animais machos e 2 grupos de animais fêmeas e submetidos a um jejum de 12 horas. Cada grupo recebeu o veículo tween 80 12% ou o EEtOH-Cd em uma única dose de 2000 mg/kg (OECD, 2001), por via oral (gavagem).

Após o tratamento foram observados os efeitos gerais nas primeiras quatro horas, nos intervalos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas no primeiro dia, e uma vez ao dia, até completar 72 horas, e comparando ao respectivo grupo controle (tween 80 12 %).

Como parâmetro foi avaliado o consumo de ração na forma de pellets pelos animais, no intervalo de 1-14 dias, após a administração da dose do EEtOH-Cd. A ração foi colocada diariamente e, no dia seguinte foi avaliado o consumo. A ingesta de água foi mensurada da mesma forma.

A pesagem dos camundongos foi realizada antes da administração do EEtOH e no 14º dia após o tratamento. Ao término desse período os animais foram eutanasiados e seus órgãos (coração, fígado, baço e rins) pesados e examinados macroscopicamente.

3.2.2 Investigação da atividade gastroprotetora de *Combretum duarteanum* Cambess

Para uma avaliação prévia da atividade gastroprotetora conferida pela espécie vegetal *C. duarteanum* Cambess, foi realizada uma triagem farmacológica com diferentes doses do EEtOH-Cd (62,5, 125, 250 e 500 mg/Kg), utilizando o modelo de indução aguda de úlcera por etanol acidificado (HCl/etanol).

Após a triagem farmacológica preliminar, foram realizados experimentos que tinham como objetivo demonstrar a atividade gastroprotetora do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd por meio dos modelos de indução aguda de úlceras por etanol absoluto, estresse por imobilização e frio, AINEs (piroxicam) e contensão de suco gástrico, mimetizando as principais causas das injúrias gástricas no homem.

Para corroborar os resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi realizada a avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico (volume do suco gástrico, pH e concentração de íons H⁺ no modelo de ligadura de piloro).

Com intuito de elucidar os mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do EEtOH e da FaHex da espécie vegetal selecionada foi avaliada a produção de muco aderido a mucosa, a participação do NO e dos compostos sulfidrilas.

Por fim, verificou-se a atividade cicatrizante das amostras vegetais de *Combretum duarteanum* utilizando o modelo de indução de úlcera por ácido acético.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, o estômago aberto ao longo da grande curvatura, as lesões ulcerativas foram quantificadas utilizando uma lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e expressas como índice de lesão ulcerativa (ILU) (Figura 9), conforme o número e a severidade das injúrias (SZELENYI; THIEMER, 1978):

Nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1mm;
Nível 2: ulcerações com 2 mm;
Nível 3: ulcerações profundas a partir de 3 mm.

$$\text{ILU} = \sum (\text{lesões nível 1} \times 1) + (\text{lesões nível 2} \times 2) + (\text{lesões nível 3} \times 3)$$

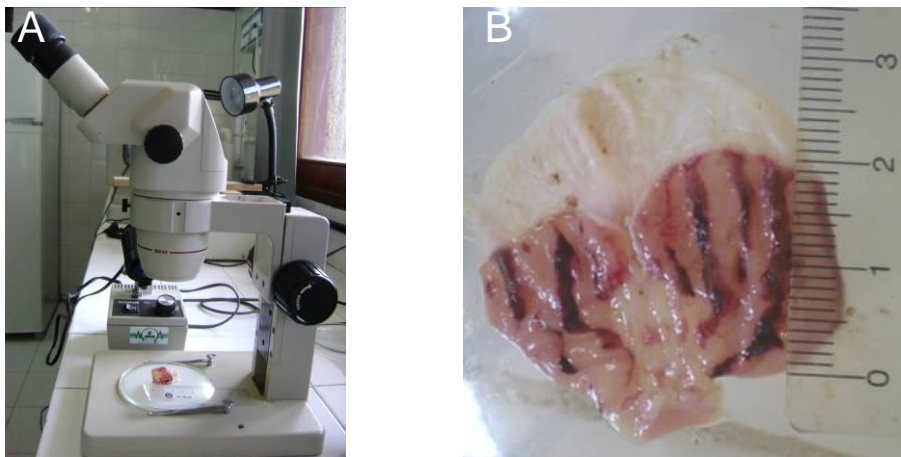


Figura 9. (A) lupa OLYMPUS Optical TL3 – SZ40 e (B) estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (→), para determinação do ILU (Foto: Arquivo do grupo de farmacologia do TGI).

3.2.2.1.1 Indução da úlcera gástrica por HCl/Etanol (Triagem farmacológica) (MIZUI; DOUTEUCHI, 1983, modificado)

Os camundongos machos (n=6-7) foram submetidos a jejum de 24 horas, divididos em grupos, conforme os pré-tratamentos, por via oral (v.o), com carbenoxolona 100 mg/Kg (controle positivo), tween 80 12% 10 mL/Kg (controle negativo) e EEtOH-Cd nas doses 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg. Após 50 min foi administrado solução do agente lesivo 0,3M HCl/Etanol 60% - 0,2 mL, por via oral. Uma hora após, os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do índice de lesão ulcerativo (ILU) (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.2 Indução da úlcera gástrica por etanol absoluto (MORIMOTO et al.,1991, modificado)

Os ratos Wistar machos (n=5-7) foram submetidos a jejum de 24 horas e pré-tratados por v. o. com carbenoxolona 100 mg/ Kg (controle positivo), tween 80 12% 10 mL/ kg e com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd nas doses 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg.

Após 1 hora, foi administrado 4mL/Kg de etanol absoluto (agente lesivo) aos animais v. o. Decorrida mais 1 hora, os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.3 Indução da úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio) (LEVINE et al., 1971, com modificações)

Os camundongos (n=5-7) submetidos a um jejum de 24 horas, foram pré-tratados, por via oral, com cimetidina 100 mg/Kg antagonista dos receptores H₂ (controle positivo), tween 80 12% (10 mL/kg e EEtOH-Cd ou FaHex-Cd nas doses 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg. Trinta minutos após a administração dos tratamentos, os animais foram imobilizados pelas patas dianteiras e traseiras, colocados em contêntores de policloreto de vinila (PVC) (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de 4° C (± 1°C) por um período de 3 horas para indução das úlceras gástricas. Ao final desse período, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.4 Indução da úlcera gástrica por Antiinflamatório-não-esteroidal (Piroxicam) (PUSCAS et al., 1997, com modificações)

Os camundongos (n=5-7) foram submetidos a um jejum de 24 horas, posteriormente pré-tratados, por via oral, com cimetidina 100 mg/Kg, tween 80 12% (10 ml/Kg) e EEtOH-Cd ou FaHex-Cd nas doses de 62,5, 125, 250 e 500 mg/kg. Após 30 min do pré-tratamento, os animais receberam piroxicam 30 mg/Kg (agente lesivo) por via subcutânea (s.c) e 4 horas após essa administração, os camundongos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos no sentido da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.5 Indução da úlcera gástrica por contensão do suco gástrico (SHAY et al., 1945, com modificações).

Após jejum de 36 horas, os ratos (n = 5-7) foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2 % (relaxante muscular) e com cloridrato de quetamina 5 % (anestésico)

e submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifóide para ligadura do piloro e a administração intraduodenal das substâncias conforme o pré-tratamento: com cimetidina 100 mg/kg (controle positivo), tween 80 12% (10 mL/kg) e com a dose mais efetiva do EEtOH-Cd ou da FaHex-Cd. O pré-tratamento oral foi realizado 30 min. antes da ligadura do piloro. Logo após esse procedimento cirúrgico, as incisões dos animais foram suturadas e decorridas quatro horas, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.1.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (v.o. e i.d.) (SHAY et al., 1945, modificado)

Após a ligadura do piloro descrita acima, as substâncias foram administradas conforme o pré-tratamento: cimetidina (100mg/kg), tween 80 12 % (controle negativo), e a dose mais efetiva do EEtOH-Cd ou da FaHex-Cd, via i.d. No entanto, o pré-tratamento oral foi realizado 30 minutos antes da ligadura do piloro. Quatro horas após a ligadura do piloro as incisões foram abertas e os estômagos retirados cuidadosamente. O conteúdo estomacal foi coletado e foram determinados os parâmetros bioquímicos do suco gástrico (volume, pH e concentração de íons hidrogênio).

O conteúdo do estômago foi pesado e, em seguida, calculado o volume do suco gástrico expresso em g/4h. O pH foi verificado com o auxílio de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil) após centrifugação do conteúdo estomacal a 3000 rpm por 10 minutos e expresso em unidades. Em seguida, foram retirados 10 mL do sobrenadante e distribuídos em alíquotas de 5 mL em 2 erlenmeyer para que fosse prosseguida a titulação do suco gástrico e determinada a concentração de H⁺ expressa em mEq/mL/4h. A titulação foi realizada utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N e fenolftaleína, uma solução indicadora, com auxílio de uma bureta digital Solarus[®] (HIRSHMANN LABORGERATE, U.S.A.).

3.2.2.2 Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de *Combretum duarceanum* Cambess

3.2.2.2.1 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica (RAFFATULLAH et al., 1990, modificado)

Após o jejum de 24 horas, os ratos (n = 7-8) foram anestesiados, o abdômen foi incisado e o piloro ligado. Os animais foram tratados com: tween 80 12% (10 mL/kg), carbenoxolona 200 mg/kg e com a dose mais efetiva do EEtOH-Cd (250 mg/Kg) ou da FaHex-Cd (250 mg/Kg), via intraduodenal. Após 4 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos retirados e abertos no sentido da grande curvatura. A porção glandular do estômago foi separada, pesada e imersa, por duas horas, em 10 mL de solução de alcian blue. O excesso de alcian blue foi removido lavando-se o estômago por duas vezes sucessivas, com 7 mL de solução sacarose 0,25 mol/L; sendo a primeira por 15 min e a segunda por 45 min. O corante, complexado ao muco aderido à parede estomacal, foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se intermitentemente por um minuto, a cada 30 min, durante 2 horas. Desse material, foi retirada uma alíquota de 4 mL e adicionada a 4 mL de éter etílico e esta mistura foi agitada por 2 min. A emulsão obtida foi centrifugada por 10 min a 3600 rpm e o sobrenadante, descartado. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 598 nm e determinada a concentração de alcian blue por intercalação em uma curva padrão com várias concentrações de alcian blue. Os resultados foram expressos em mg de alcian blue/g de tecido.

3.2.2.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção (SIKIRIC et al., 1997)

Ratos Wistar machos (n=6-7) foram colocados em jejum por 24 horas e divididos em 8 grupos conforme o pré-tratamento: 4 grupos receberam tween 80 12% (10 mL/kg) e 4 grupos receberam N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) 70 mg/kg (i.p.), um agente bloqueador da enzima sintase de óxido. Após 30 minutos da administração, cada quatro grupos foram tratados por via oral com o veículo tween 80 12%, carbenoxolona 100 mg/kg, e com a dose mais efetiva do EEtOH-Cd ou FaHex-Cd. Após 1 hora do tratamento, os ratos receberam 4 mL/kg de etanol

(agente lesivo) por via oral. Decorridos mais uma hora os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.2.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas (SH) na gastroproteção (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

Ratos Wistar machos (n=6-7) foram colocados em jejum por 24 horas e distribuídos em oito grupos, conforme o pré-tratamento: 4 grupos receberam tween 80 12% e os outros 4 grupos receberão N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg (i.p.), um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas. Após 30 minutos da administração, cada quatro grupos foram tratados por via oral com tween 80 12%, carbenoxolona (100 mg/kg) e com a dose mais efetiva do EEtOH-Cd ou da FaHex-Cd. Após 1 hora, os ratos receberam etanol absoluto 4 mL/kg (agente lesivo) por via oral. Decorridos 60 min, os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos para determinação do ILU (SZELENYI; THIEMER, 1978).

3.2.2.3 Avaliação da atividade cicatrizante de *Combretum duarteanum* Cambess

3.2.2.3.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético (OKABE; AMAGASE, 2005, com modificações)

Após jejum de 24 horas, ratos Wistar machos (n=9) foram divididos aleatoriamente nos grupos sham, tween 80 12 %, cimetidina (100 mg/Kg) , EEtOH-Cd (250 mg/Kg) ou FaHex-Cd (250 mg/Kg), anestesiados com cloridrato de xilazina 2 % (relaxante muscular) e cloridrato de quetamina 5% (anestésico) e tiveram o abdômen aberto para exposição do estômago. Um tubo plástico de 5,0 mm de diâmetro, com um pellet de algodão inserido no seu interior, foi firmemente aplicado à superfície serosa da parede do estômago, para que fosse administrada uma solução de 100 µL de ácido acético (P.A) por 60 segundos. Logo após, o ácido foi removido completamente, para em seguida proceder à sutura do abdômen. Após 48 h da exposição do estômago ao ácido acético, as substâncias para o tratamento foram administradas aos animais por via oral uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. Ao final do tratamento, após jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus estômagos foram removidos e

abertos no sentido da grande curvatura, para a determinação da área da lesão ulcerativa - ALU (mm²) com a ajuda de um paquímetro digital Digimatic (Mitutoyo Corporation da Caliper-Japão).

As fórmulas utilizadas para obtenção da ALU e % da taxa de cura foram as seguintes:

$$ALU = (c) \cdot (l) = \text{mm}^2$$

$$(\%) \text{ da taxa de cura} = \frac{(ALU) C - (ALU) T}{(ALU) C} \times 100$$

c = comprimento (mm) ; l = largura (mm)

ALU (C) = área da lesão ulcerativa do grupo controle negativo

ALU (T) = área da lesão ulcerativa do grupo tratado

Após a determinação da ALU, a região que circunscreve a lesão foi removida para posterior análise histológica. Ao final dos 14 dias de tratamento o sangue foi coletado e os órgãos retirados para avaliação da toxicidade, conforme descrito a seguir.

3.2.2.4 Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FaHex de *Combretum duarteanum* por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético

Para corroborar os resultados anteriores, foram avaliados os possíveis efeitos das amostras vegetais sobre os animais submetidos ao tratamento diário com o EEtOH-Cd ou FaHex-Cd durante 14 dias. Foram avaliados: consumo de água e ração, peso corporal e dos órgãos e parâmetros bioquímicos e hamatológicos.

3.2.2.4.1 Avaliação do consumo de água e ração

Durante os 14 dias de tratamento foram avaliados a quantidade de água e ração. A ração foi colocada diariamente e, no dia seguinte foi avaliada a quantidade consumida pelos ratos. Para avaliar o consumo de água, seguiu-se a mesma

metodologia colocando-se mamadeiras graduadas e, no dia seguinte, o volume de água ingerido pelos animais foi mensurado.

3.2.2.4.2 Avaliação ponderal

A pesagem dos ratos foi realizada no 1º dia antes de iniciar os respectivos tratamentos com a dose mais efetiva do EEtOH ou a FaHex, cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e solução tween 80 12 % 10 mL/kg (controle negativo), e no último dia, correspondente ao 14º dia.

3.2.2.4.3 Avaliação do peso dos órgãos

Outro parâmetro avaliado no modelo de indução de úlcera por ácido acético foi o peso dos órgãos. Ao final do experimento, os ratos foram eutanasiados e tiveram seus órgãos (coração, fígado, rins, baço e pulmão) pesados.

3.2.2.4.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Ao final do tratamento durante o período de 14 dias, os animais passaram por um jejum de 12 horas, em seguida foram eutanasiados e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Para análises bioquímicas, o sangue foi acondicionado em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado às dosagens dos seguintes parâmetros: uréia, creatinina e ácido úrico marcadores da função renal, bem como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), marcadores da função hepática.

Para a análise hematológica o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante (EDTA) para avaliação dos seguintes parâmetros: contagem de hemácias, hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), contagem global e diferencial de leucócitos. Foram realizados esfregaços sanguíneos que após coloração foram analisados em microscópio óptico para confirmação e controle da contagem diferencial de células sanguíneas.

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) (Figura 10A) e para o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter* (Vet) (Figura 10B), respectivamente. Os esfregaços sanguíneos foram corados automaticamente no HEMATEL 200® e analisados em microscópio óptico TAIMIN®, para confirmação e controle da contagem de células.

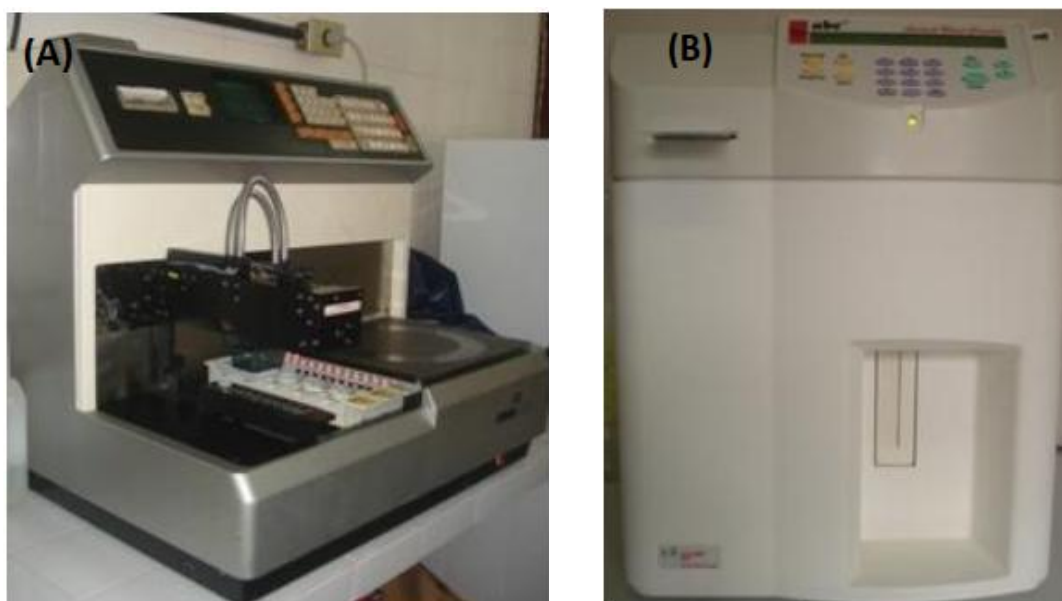


Figura 10. (A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System); (B) Analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter* (Vet) (Foto: João Carlos Pita).

3.3 Análise Estatística

Para os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de Student. Já para os resultados farmacológicos obtidos em ensaios de indução de úlcera gástrica utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por pós-teste (Dunnett e/ou Tukey). Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (d.p.) da média e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$.

Todos os resultados foram analisados com o software, GraphPad Prisma 5.0, San Diego, CA, EUA.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio Toxicológico de *Combretum duarceanum* Cambess

4.1.1 Estudo comportamental e determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀) (ALMEIDA et al., 1999)

Com base nos parâmetros citados por Almeida et al. (1999) os camundongos tratados com o EEtOH-Cd na dose de 2000 mg/kg (v.o.), não apresentaram alterações comportamentais, no peso corporal, peso dos órgãos e nem quanto a ingestão de água quando comparados com seus respectivos grupos controle negativo (solução tween 80 12%), durante o tempo de observação preconizado.

Entretanto, ao ser avaliado o consumo de ração, foi observado redução significativa no grupo dos machos tratados com EEtOH-Cd, quando comparado ao seu respectivo grupo controle, enquanto que nenhuma alteração foi observada no grupo das fêmeas (Tabela 1).

O extrato não provocou alteração macroscópica nos órgãos dos animais avaliados e não causou mortes nos animais durante os 14 dias após a administração, impossibilitando determinação da DL₅₀.

A análise desses parâmetros sugere que, nas condições avaliadas, o EEtOH-Cd (2000 mg/kg) apresenta baixa toxicidade.

Tabela 1. Efeito da administração oral do EEtOH obtido das folhas de *Combretum duarteanum* na evolução ponderal, peso dos órgãos, consumo de água e ração em camundongos machos e fêmeas

Parâmetros	Sexo	Tratamentos	
Evolução Ponderal (g)		Controle Tween 80 (12%)	EEtOH-Cd (2000 mg/Kg)
	Fêmeas		
Inicial		26,43 ± 0,3445	27,07 ± 0,6532
Final		30,82 ± 1,230	32,05 ± 1,592
	Machos		
Inicial		30,17 ± 1,602	32,00 ± 1,581
Final		37,00 ± 2,280	36,00 ± 4,359
Peso dos órgãos (g)			
	Fêmeas		
Fígado		14,07 ± 0,2529	14,24 ± 0,3441
Coração		3,504 ± 0,1537	3,661 ± 0,1416
Rins		5,787 ± 0,3383	5,989 ± 0,5243
Baço		4,183 ± 0,3011	4,469 ± 0,4051
	Machos		
Fígado		14,39 ± 0,5720	14,55 ± 0,7260
Coração		3,603 ± 0,1261	3,485 ± 0,0517
Rins		6,708 ± 0,3836	6,540 ± 0,3580
Baço		4,130 ± 0,07321	4,218 ± 0,1256
Consumo de água (mL)			
	Fêmeas	45,86 ± 3,860	47,00 ± 5,335
	Machos	53,64 ± 7,500	52,50 ± 6,430
Consumo de ração (g)			
	Fêmeas	35,60 ± 2,704	35,99 ± 3,167
	Machos	43,92 ± 4,991	35,81 ± 3,251***

Os resultados estão expressos como média ± d.p (n=6). Teste “t” de Student comparados a tween 80 12%. Para a avaliação dos órgãos, os valores estão expressos como média ± d.p. do arco-seno da divisão do peso dos órgãos pelo peso dos animais; teste “t” de Student $p > 0,05$.

4.2.1 Indução da úlcera gástrica por HCl/Etanol (Triagem farmacológica) (MIZUI; DOUTEUCHI, 1983, modificado)

Os resultados obtidos nesse modelo demonstraram que o EEtOH-Cd (62,5, 125, 250, 500 mg/Kg v.o) e carbenoxolona (100 mg/Kg), reduziram significativamente o ILU em 28, 36, 55, 63 e 41 % respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Tabela 2). Estes resultados sugerem a atividade gastroprotetora do EEtOH-Cd nas doses avaliadas.

Tabela 2. Efeito da administração oral do EEtOH obtido de *C. duarteana* e carbenoxolona nas lesões gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
Tween 80 12%	-	153,6 ± 42,45	-
Carbenoxolona	100	91 ± 32	41**
EEtOH-Cd	62,5	110,3 ± 26,9	28*
	125	99 ± 12,30	36**
	250	68,50 ± 16,80	55***
	500	56,17 ± 15,3	63***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via ANOVA: $F_{(5,31)} = 36$, seguido do teste de Dunnett: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparado com o grupo controle negativo (solução tween 80 12%) (n= 6-7). ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

4.2.2 Indução da úlcera gástrica por etanol absoluto (MORIMOTO et al.,1991, modificado)

Os resultados obtidos para a espécie *C. duarteana* no modelo de indução de úlcera por etanol (v.o.) em ratos demonstraram que o EEtOH-Cd (62,5, 125, 250 e 500 mg/Kg) e carbenoxolona (100mg/kg) inibiram significativamente as lesões ulcerativas em 51, 48, 61, 45 e 60%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Estes resultados se encontram demonstrados na tabela 3 e figura 11.

Tabela 3. Efeito da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos das partes aéreas de *C. duarteana* e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(a)Tween 80 12%		213,0 ± 71,88	-
Carbenoxolona	100	85,67 ± 30,17	60***
EEtOH-Cd	62,5	103,8 ± 39,63	51**
	125	111,6 ± 45,91	48***
	250	82,33 ± 24,78	61***
	500	117 ± 46,3	45**
Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(b)Tween 80 12%		346 ± 40,8	-
Carbenoxolona	100	193 ± 42.8	44***
FaHex-Cd	62,5	219 ± 59	37***
	125	193.6 ± 18.4	44***
	250	73.71 ± 8.4	79***
	500	47.14 ± 13.5	86***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,28)} = 33$ ($n= 5-6$) para o EEtOH e $F_{(5,33)} = 38$ ($n=5-7$) para a FaHex; ($p<0,05$), seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

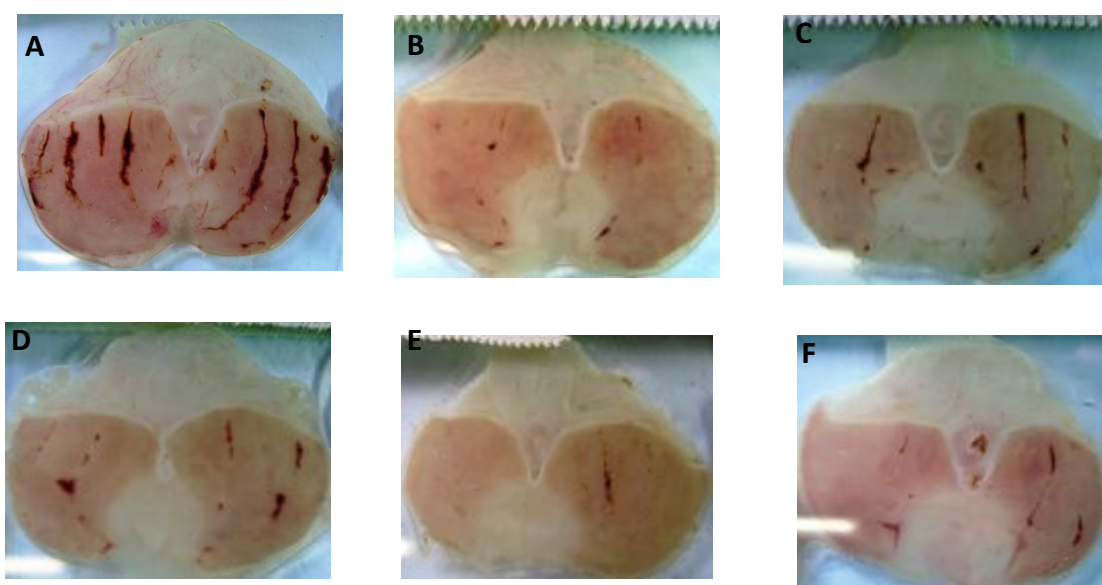


Figura 11 Estômagos de ratos pré-tratados v.o. com solução tween 80 12 % (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), EEtOH-Cd (62,5 mg/kg) (C), EEtOH-Cd (125 mg/kg) (D), EEtOH-Cd (250 mg/kg) (E), EEtOH-Cd (500 mg/kg) (F).

Resultados semelhantes foram observados quando avaliado a FaHex-Cd (62,5, 125, 250 ou 500 mg/kg) ou carbenoxolona (100 mg/kg), demonstrando uma inibição significativa das lesões ulcerativas em 37, 44, 79, 86 e 44% respectivamente, quando comparado ao controle negativo (Tabela 3b e figura 12).

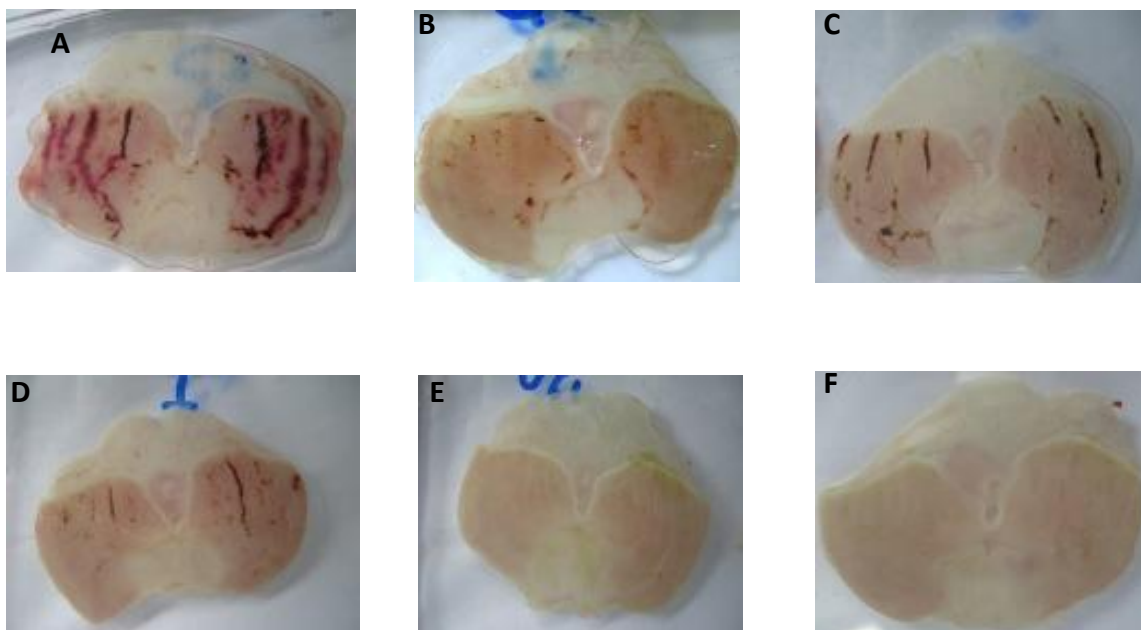


Figura 12 . Estômagos de ratos pré-tratados v.o. com solução tween 80 12 % (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), FaHex -Cd (62,5 mg/kg) (C), FaHex-Cd (125 mg/kg) (D), FaHex -Cd (250 mg/kg) (E), FaHex -Cd (500 mg/kg) (F)

Portanto, esses resultados sugerem que tanto o EEtOH-Cd quanto a FaHex-Cd, apresentaram atividade gastroprotetora, frente as lesões gástricas induzidas por etanol absoluto.

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, foi realizada uma comparação estatística entre as diferentes doses dos grupos tratados com EEtOH-Cd ou FaHex-Cd, utilizando o teste de Tukey, o que permitiu escolher a dose mais efetiva do EEtOH-Cd (250 mg/kg) e da FaHex-Cd (250 mg/kg) em inibir as ulcerações gástricas. Essas doses foram selecionadas para os experimentos de avaliação dos parâmetros bioquímicos e modelos de elucidação dos mecanismos de ação.

4.2.3 Indução da úlcera gástrica por estresse (imobilização e frio) (LEVINE et al., 1971, com modificações)

No modelo de indução aguda de úlcera gástrica induzida pelo estresse por imobilização e frio em camundongos, os resultados obtidos demonstraram que o EEtOH-Cd e a cimetidina (100 mg/kg) inibiram significativamente as lesões ulcerativas em 44, 54, 69 e 50% (doses de 125, 250, 500 mg/Kg para o EEtOH e cimetidina, respectivamente) quando comparados ao grupo controle negativo (Tabela 4a). Resultado semelhante ocorreu para FaHex-Cd, nas doses de 62,5, 125, 250, 500 mg/Kg em que foi observada uma redução significativa das lesões ulcerativas em 55, 56, 69, 79 e 24%, para as doses avaliadas e cimetidina, respectivamente (Tabela 4b). Esses resultados sugerem que as amostras vegetais obtidas de *C. duarteamum*, protegem a mucosa gástrica dos camundongos das injúrias relacionadas ao estresse.

Tabela 4. Efeitos da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos das partes aéreas de *C. duarteamum* e da cimetidina nas lesões gástricas induzidas por estresse por imobilização e frio em camundongos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(a)Tween 80 12%		199,7±24,11	-
Cimetidina	100	99,6±18,62	50***
EEtOH- Cd	62,5	167,0±44,07	16
	125	111,2±22,46	44***
	250	92,5±25,03	54***
	500	62,67±18,46	69***
Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(b)Tween 80 12%		226,8±41,38	-
Cimetidina	100	172,6±22,93	24**
FaHex-Cd	62,5	103,3±6,7	55***
	125	99,17±19,7	56***
	250	70,3±8,6	69***
	500	48,0±12,4	79***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(5,29)} = 34$ (n=5-6) para o EEtOH e $F_{(5,29)} = 34$ (n=5-7) para a FaHex; (p<0,05), seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo **p<0,01, ***p<0,001. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

4.2.4 Indução da úlcera gástrica por Antiinflamatório-não-esteroidal (Piroxicam) (PUSCAS et al., 1997, com modificações)

De acordo com os resultados obtidos nesse modelo, foi possível observar que o EEtOH-Cd nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg e a cimetidina (100 mg/kg) reduziram significativamente o índice de lesão ulcerativa em 30, 42, 49 e 54 %, respectivamente, quando comparadas com o controle negativo (Tabela 5a). Comportamento também observado para a avaliação da FaHex-Cd (250 e 500 mg/Kg) e da cimetidina (100 mg/kg), v.o, em 43, 52 e 32 %, respectivamente, quando comparadas ao seu respectivo controle negativo (Tabela 5b), o que sugere um efeito gastroprotetor dos mesmos, no modelo de indução de úlcera avaliado.

Tabela 5. Efeito da administração oral do EEtOH, da FaHex obtido das folhas de *C. duarteanum* e da cimetidina em úlceras gástricas induzidas por antiinflamatório não esteroidal (piroxicam 30 mg/kg) em camundongos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(a)Tween 80 12%		72,3±21,61	-
Cimetidina	100	33,3±5,04	54***
EEtOH-Cd	62,5	71,33±10,0	1,3
	125	50,6±11,8	30*
	250	41,86±10,0	42***
	500	37±11,12	49***
Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(b)Tween 80 12%		116,5±6,03	-
Cimetidina	100	79,4±17	32*
EEtOH-Cd	62,5	109,4±19	6
	125	102,2±22,7	12
	250	66±14	43***
	500	56±25	52***

ANOVA $F_{(5,33)} = 38$ para o EEtOH (n=6-7) e $F_{(5,28)} = 33$ para a FaHex (n= 5-6); (p<0,05),seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo *p<0,05, ***p<0,001. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa

4.2.5 Indução da úlcera gástrica por contensão do suco gástrico (SHAY et al., 1945, com modificações)

Os resultados obtidos para as amostras vegetais de *C. duarteanum* frente à contensão da secreção gástrica utilizando o modelo de ligadura de piloro em ratos demonstraram que o EEtOH-Cd (250 mg/kg) e a cimetidina (100 mg/kg), administradas por via oral, inibiram, significativamente, em 66 % e 25 o índice de lesões ulcerativas, respectivamente. Resultado semelhante também foi observado para a FaHex-Cd (250 mg/kg) e o cimetidina (100 mg/kg) que reduziu o ILU em 41 e 23 % quando comparados aos respectivos controle negativo (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos das folhas de *C. duarteanum* e da cimetidina nas lesões gástricas induzidas por contensão da secreção gástrica pela ligadura de piloro em ratos.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(a)Tween 80 12%		189,6 ± 21,59	-
Cimetidina	100	142,5 ± 512,14	25***
EEtOH-Cd	250	64,71 ± 8,056	66***

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(b)Tween 80 12%		268,6 ± 38,14	-
Cimetidina	100	207,8 ± 22,07	23*
FaHex-Cd	250	158,7 ± 37,85	41***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,15)} = 17$ para o EEtOH (n=5-7) e $F_{(2,14)} = 16$ para a FaHex (n=5-6); ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa

Em se tratando dos resultados obtidos para as amostras de *C. duarteanum* administradas por via intraduodenal, o EEtOH-Cd (250 mg/kg) e a cimetidina (100 mg/kg), inibiram em 39 e 32 % o índice de lesões ulcerativas, respectivamente, condição esta também observada para a FaHex-Cd (250 mg/kg) e o respectivo controle positivo que reduziram o ILU em 45 e 27 % quando comparado ao controle negativo (Tabela 7).

Tabela 7. Efeitos da administração intraduodenal do EEtOH, da FaHex e da cimetidina, nas lesões gástricas induzidas por contensão da secreção gástrica pela ligadura de piloro em ratos

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(a)Tween 80 12%		213,8 ± 18,28	-
Cimetidina	100	146,1 ± 24,63	32***
EEtOH-Cd	250	131,0 ± 23,22	39***

Tratamento	Dose (mg/Kg)	ILU	Inibição (%)
(b)Tween 80 12%		179,6 ± 17,03	-
Cimetidina	100	130,7 ± 13,31	27***
FaHex-Cd	205	99,14 ± 11,88	45***

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,16)} = 18$ para o EEtOH (n = 6-7) e $F_{(2,18)} = 20$ para a FaHex (n=7); ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett, comparado ao controle negativo, *** $p < 0,001$. ILU= Índice de Lesão Ulcerativa.

Os dados sugerem que as amostras vegetais protegem a mucosa gástrica das lesões induzidas por contensão do suco gástrico.

4.2.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro v. o. (SHAY et al., 1945, com modificações)

No modelo de ligadura de piloro, também foram avaliados parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal dos ratos, como: pH, concentração de íons H^+ e o volume do suco gástrico, após a administração oral da solução tween 80 12%, cimetidina (100 mg/kg), EEtOH-Cd (250 mg/kg) e FaHex-Cd (250 mg/kg) em ratos.

Os dados obtidos mostraram que o EEtOH-Cd e a FaHex-Cd, nas doses avaliadas, não promoveram alterações nos parâmetros bioquímicos observados, porém nos grupos dos animais nos quais foram administrados cimetidina, ocorreram alterações significativas no pH, volume gástrico e na concentração de ácido total, quando comparados aos seus respectivos controles negativos (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito da administração oral do EEtOH, da FaHex obtidos de *C. duarteanum* e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura de piloro em ratos

Tratamento	pH (unidades)	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Volume gástrico (g)
Tween 80 12%	3,1 ± 0,2	12,4 ± 3,82	1,66 ± 0,4
Cimetidina (100 mg/kg)	6,54 ± 0,89***	4,8 ± 1,72**	0,62 ± 0,26***
EEtOH-Cd (250 mg/kg)	3,46 ± 0,36	12,2 ± 3,2	1,28 ± 0,33
Tween 80 12%	3,28 ± 0,24	14,3 ± 2,8	1,19 ± 0,4
Cimetidina (100 mg/kg)	6,77 ± 0,41***	6,6 ± 2,3***	0,62 ± 0,22*
FaHex-Cd (250 mg/kg)	3,1 ± 0,21	15,07 ± 1,9	1,28 ± 0,3

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2, 16)} = 18$ (EEtOH) / $F_{(2, 17)} = 19$ (FaHex) para pH; $F_{(2, 16)} = 18$ (EEtOH) / $F_{(2, 17)} = 19$ (EEtOH) para [H⁺]; $F_{(2, 16)} = 18$ (EEtOH) / $F_{(2, 15)} = 17$ (EEtOH) para volume gástrico, seguido do teste de Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (n= 5-7).

Os resultados apresentados sugerem que o efeito gastroprotetor exercido pelo EEtOH e a FaHex não está relacionado a redução da secreção ácida gástrica.

4.2.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro i.d

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal dos ratos, como volume do suco gástrico, pH e concentração de H⁺, após a administração intraduodenal da solução tween 80 12% (controle negativo), cimetidina (100 mg/Kg), EEtOH (250 mg/Kg) ou FaHex (250 mg/Kg) obtidos das folhas de *Combretum duarteanum*, não foram observadas alterações significativas dos parâmetros avaliados. Nos grupos dos animais que receberam cimetidina (100 mg/kg) ocorreu alterações dos parâmetros avaliados (Tabela 9). Esses resultados sugerem que a ação gastroprotetora do EEtOH e da FaHex da espécie em estudo não está relacionada a redução da secreção ácida gástrica.

Tabela 9. Efeito da administração intraduodenal do EEtOH, da FaHex obtidos das partes de *C. duarteanum* e cimetidina sobre os parâmetros bioquímicos do suco gástrico após a ligadura de piloro em ratos

Tratamento	pH (unidades)	[H ⁺] (mEq/mL/4h)	Volume gástrico (g)
Tween 80 12 %	3,67 ± 0,50	12,5 ± 2,54	0,62 ± 0,19
Cimetidina (100 mg/kg)	4,48 ± 0,70*	8,44 ± 2,50*	0,52 ± 0,18
EEtOH-Cd (250 mg/kg)	3,50 ± 0,2	13,76 ± 2,29	0,59 ± 0,12
Tween 80 12 %	2,79 ± 0,29	13,42 ± 1,80	0,92 ± 0,27
Cimetidina (100 mg/kg)	3,4 ± 0,23***	9,29 ± 1,29***	0,60 ± 0,18*
FaHex-Cd (250 mg/kg)	2,70 ± 0,21	14,90 ± 0,91	0,88 ± 0,19

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2, 16)} = 18$ (EEtOH) / $F_{(2, 18)} = 20$ (FaHex) para pH; $F_{(2, 15)} = 17$ (EEtOH) / $F_{(2, 18)} = 20$ (FaHex) para [H⁺]; $F_{(2, 14)} = 16$ (EEtOH) / $F_{(2, 16)} = 18$ (FaHex) para volume gástrico, seguido do teste de Dunnett * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (n = 6-7)

4.3 Avaliação dos Mecanismos de Ação Envolvidos na Atividade Gastroprotetora de *Combretum duarteanum* Cambess

Na perspectiva de elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora de EEtOH e FaHex obtidos de *Combretum duarteanum* foram avaliadas a participação do muco aderido à mucosa, dos grupamentos sulfidrilas e do óxido nítrico.

4.3.1 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica (RAFFATULLAH et al., 1990, modificado)

Os resultados obtidos no modelo que investiga a participação do muco na gastroproteção induzida pela FaHex-Cd e carbenoxolona mostraram que não houve alteração significativa na concentração de muco, induzida pela amostra vegetal, quando comparada ao controle negativo, ao passo que a carbenoxolona (200 mg/kg), conforme esperado, aumentou os níveis do muco quando comparado ao grupo tween 80 12% (Gráfico 1).

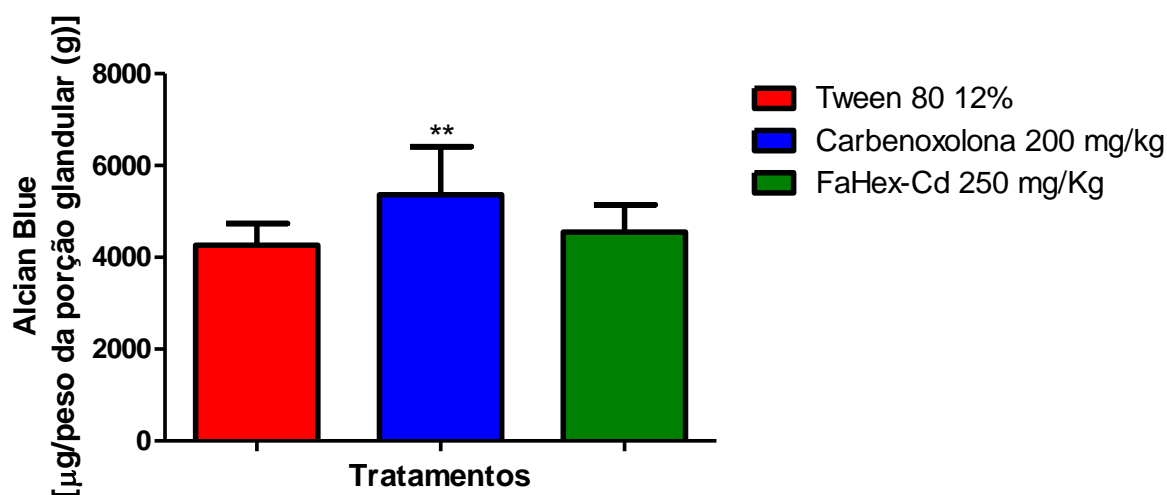


Gráfico 1. Efeito da administração oral da FaHex-Cd e carbenoxolona na produção de muco. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett $**p < 0,01$, ($n = 7-8$).

O resultado sugere que o efeito gastroprotetor da FaHex-Cd não está relacionado ao aumento da concentração de muco aderido à mucosa gástrica.

4.3.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção (SIKIRIC et al., 1997)

Os dados obtidos no modelo que investiga a participação de NO na proteção induzida por EEtOH-Cd (250 mg/kg) e FaHex-Cd (250 mg/kg), mostram que nos ratos dos grupos previamente tratados com solução tween 80 12 % e depois tratados com EEtOH ou carbenoxolona, ocorreu uma inibição significativa do ILU em 67 % e 50 %, respectivamente. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com o L-NAME (bloqueador da sintase de óxido nítrico) e posteriormente tratados com EEtOH ou carbenoxolona foi observada uma exacerbação do ILU com inibição de apenas 44 e 37 %, respectivamente, quando comparados ao seu controle negativo (Gráfico 2 e Figura 13). Os resultados obtidos sugerem que o NO participa do efeito gastroprotetor promovido pelo EEtOH nas condições avaliadas.

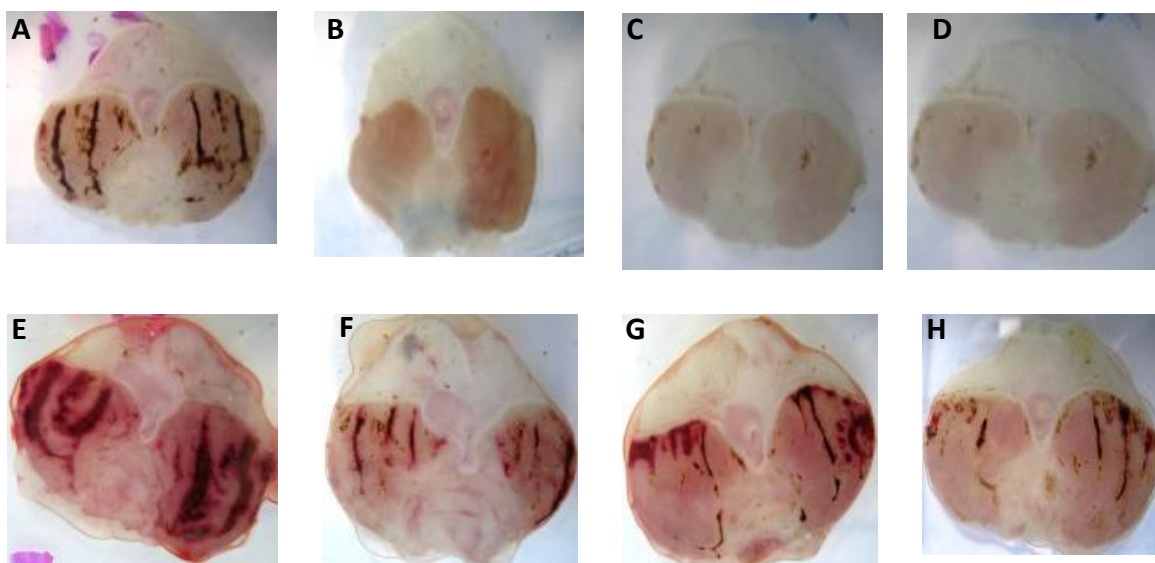


Figura 13. Estômagos de ratos ulcerados e tratados com tween/tween (A) tween/carbenoxolona (B), tween/EEtOH (C), tween/FaHex (D), L-NAME/tween (E), L-NAME/carbenoxolona (F), L-NAME/EEtOH (G), L-NAME/FaHex (H).

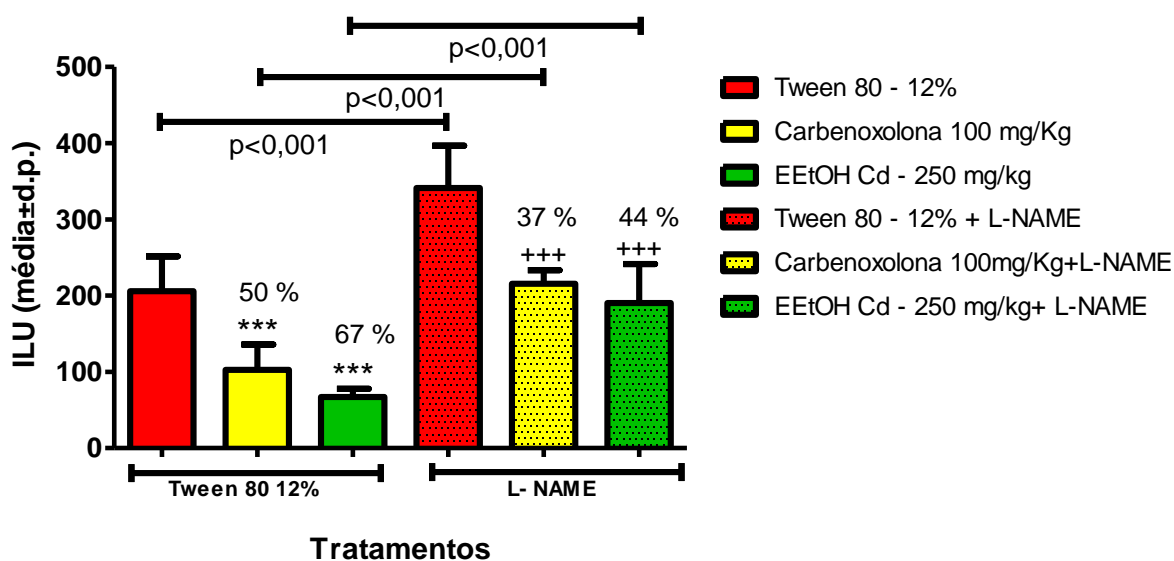


Gráfico 2. Efeito da administração oral do EEtOH obtidos das partes aéreas de *C. duarteana* e da carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME. Os resultados estão expressos como média \pm d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,17)} = 19/ F_{(2,14)} = 16$ ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett *** $p < 0,001$ comparando-se ao grupo solução tween 80 a 12% + solução tween 80 12%; +++ $p < 0,001$ comparando-se ao grupo L-NAME + solução tween 80 a 12%; teste de Tukey, comparando os grupos que receberam o mesmo tratamento $p < 0,001$. (n = 6-7)

Quando se avaliou os grupos previamente tratados com solução tween 80 12 % e depois tratados com FaHex ou carbenoxolona, foi observado que ocorreu

uma inibição significativa do ILU em 61 e 40 %, respectivamente. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com o L-NAME (bloqueador da sintase de óxido nítrico) e posteriormente tratados com FaHex ou carbenoxolona ocorreu uma exacerbação do ILU com inibição de 36 e 34 % respectivamente, quando comparados ao seu controle negativo. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que existe a participação do NO no efeito gastroprotetor promovido pela fase hexânica da amostra vegetal (Gráfico 3 e figura 13).

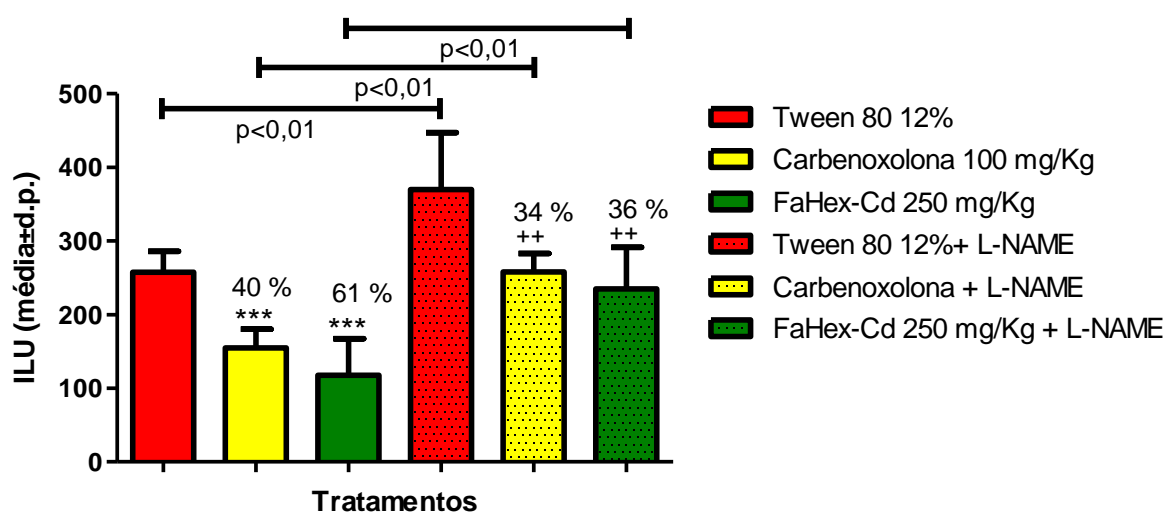


Gráfico 3. Efeito da administração oral da FaHex obtidos das partes aéreas de *C. duarteanum* e carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com L-NAME. Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): $F_{(2,17)} = 19 / F_{(2,14)} = 16$ ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett *** $p < 0,001$ comparando-se ao grupo solução tween 80 a 12% + solução tween 80 12%; ++ $p < 0,01$ comparando-se ao grupo L-NAME + solução tween 80 a 12%; teste de Tukey-Kramer, comparando os grupos que receberam o mesmo tratamento $p < 0,001$. (n=6-7)

4.3.3 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas (SH) na gastroproteção (MATSUDA; LI; YOSHIKAWA, 1999)

Ao analisar os dados obtidos no modelo que avalia o envolvimento dos grupamentos sulfidrilas no efeito gastroprotetor do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd, foi observado que nos grupos de animais previamente tratados com solução tween 80 12 % e depois tratados com EEtOH-Cd (250 mg/kg) ou carbenoxolona (200 mg/kg), ocorreu uma inibição significativa do ILU em 67 % e 47 %, respectivamente. Entretanto, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com o NEM (bloqueador de grupamentos sulfidrilas) e tratados com EEtOH-Cd ou carbenoxolona, foi

observado uma exacerbação do ILU com 39 e 46 % de inibição quando comparados ao seu controle negativo (Gráfico 4 e figura 14).

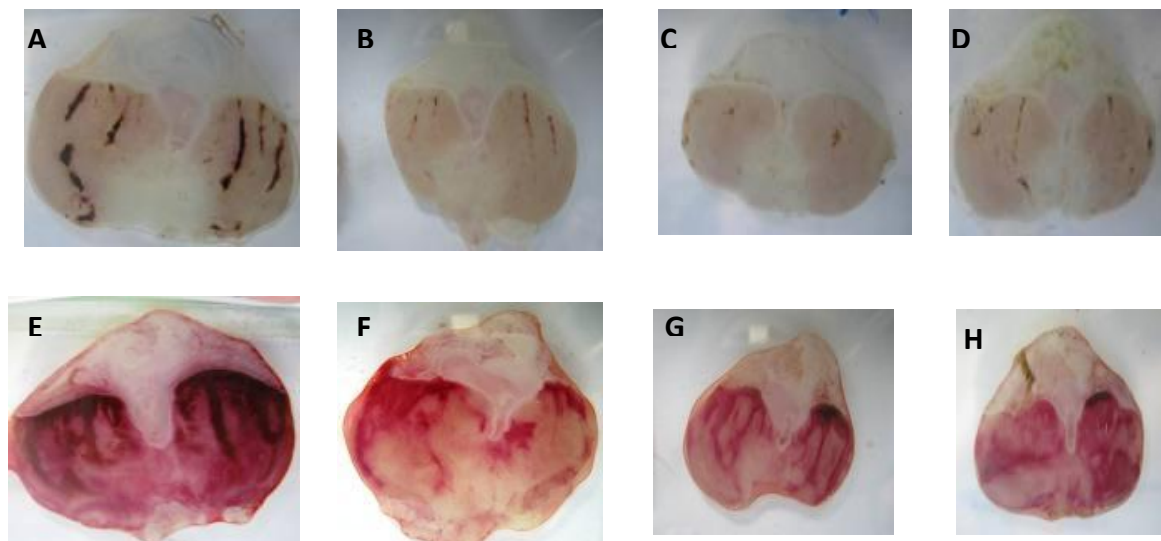


Figura 14. Estômagos de ratos ulcerados e tratados com tween/tween (A) tween/carbenoxolona (B), tween/EEtOH (C), tween/FaHex (D), NEM/tween (E), NEM/carbenoxolona (F), NEM/EEtOH (G), NEM/FaHex (H).

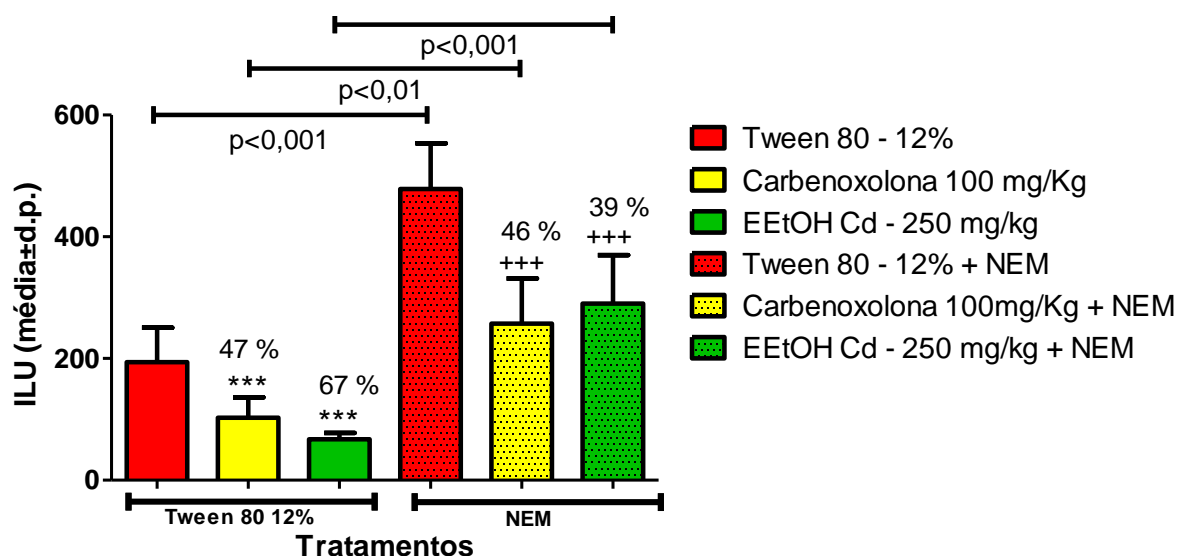


Gráfico 4. Efeito da administração oral do EEtOH obtido das folhas de *C. duarteanum* e da carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM. Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6-7). ANOVA: $F_{(2,15)} = 17 / F_{(2,16)} = 18$ ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett *** $p < 0,01$ comparando-se ao grupo tween 80 12% + tween 80 12%; +++ $p < 0,001$ comparando-se ao grupo NEM + tween 80 12%; teste de Tukey-Kramer, comparando os grupos que receberam o mesmo tratamento $p < 0,001$. (n=6-7).

Resultados semelhantes foram observados nos grupos de animais previamente tratados com solução tween 80 12 % e depois tratados com FaHex ou

carbenoxolona, onde ocorreu uma inibição significativa do ILU em 46 e 37 %, respectivamente. Porém, quando foram avaliados os grupos pré-tratados com o NEM (bloqueador de grupamentos sulfidríla) e que receberam o mesmo tratamento do grupo anterior, foi observada uma exacerbação do ILU para 40 e 37 % de inibição quando comparados também ao seu controle negativo (Gráfico 5 e Figura 14).

Os resultados obtidos na realização deste protocolo experimental demonstraram que a via dos grupamentos sulfidríla está envolvida no efeito gastroprotetor promovido por *C. duarteanum*.

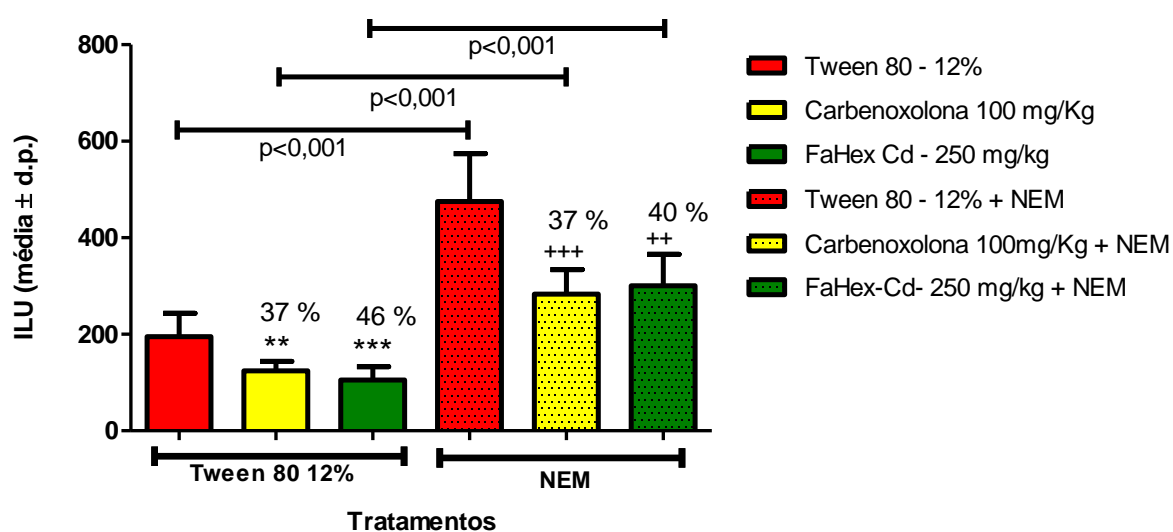


Gráfico 5. Efeito da administração oral da FaHex obtido das folhas de *C. duarteanum* e da carbenoxolona em úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos pré-tratados com NEM. Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n = 6$). ANOVA: $F_{(2,15)} = 17 / F_{(2,16)} = 18$ seguido do teste de Dunnett * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ comparando-se ao grupo tween 80 12% + tween 80 12%; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ comparando-se ao grupo NEM + tween 80 12%; teste de Tukey, comparando os grupos que receberam o mesmo tratamento $p < 0,001$

4.4 Avaliação da Atividade Cicatrizante de *Combretum duarteanum* Cambess

Com a finalidade de avaliar o processo de cicatrização produzido pelas amostras vegetais obtidas de *C. duarteanum* foi determinada a área de lesão ulcerativa (ALU) e como parâmetros adicionais foi avaliada a toxicidade do EEtOH e da FaHex por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético.

4.4.1 Úlcera gástrica induzida por ácido acético (OKABE; AMAGASE, 2005, com modificações)

No modelo de indução de úlcera gástrica por ácido acético, foi observado redução na área da lesão ulcerativa em 38, 48 e 60,5 %, após tratamento de 14 dias com EEtOH-Cd (250 mg/Kg, v.o), FaHex-Cd (250 mg/kg, v.o.) e cimetidina (100 mg/kg, v.o.), respectivamente (Gráfico 6). O grupo Sham, constituído por animais em que a úlcera não foi induzida, não apresentou lesão, como esperado. De acordo com esses resultados tanto o extrato etanólico bruto como a fase hexânica apresentaram atividade cicatrizante da úlcera gástrica induzida pelo ácido acético.

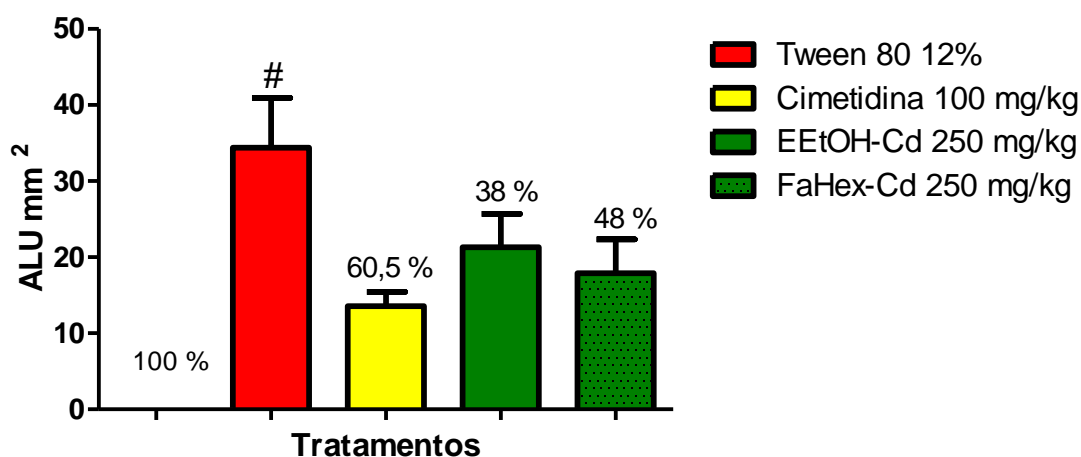


Gráfico 6. Efeito cicatrizante do EEtOH e da FaHex obtidos de *Combretum duarteanum* no modelo de úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos. Os dados estão expressos como média \pm d.p. (n = 6-11). ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Tween 80 12 % vs EEtOH e FaHex *** $p < 0,001$. Os números percentuais indicam a porcentagem de proteção em relação ao grupo tween.

4.4.1.1 Avaliação da toxicidade do EEtOH e da FaHex *Combretum duarteanum* por doses repetidas durante 14 dias no modelo de ácido acético

4.4.1.1.1 Avaliação do consumo de água e ração

Complementando a avaliação da atividade cicatrizante, foi realizado o acompanhamento do consumo diário de água e ração dos animais testados e observou-se um aumento significativo na ingestão de água e ração pelos ratos tratados com EEtOH-Cd (250 mg/kg, v.o.), quando comparado ao controle negativo. Essa alteração não foi constatada para os grupos tratados com a FaHex-Cd (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de *Combretum duarteanum* durante 14 dias sobre o consumo de água e ração dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Tratamento	Dose	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Sham	-	31,30 ± 2,53	25,64 ± 2,37
Tween 80 12 %	10 mL/kg	33,60 ± 2,30	22,93 ± 2,75
Cimetidina	100 mg/kg	32,28 ± 3,71	23,80 ± 5,03
EEtOH-Cd	250 mg/kg	39,69 ± 2,15***	27,52 ± 3,78**
FaHex-Cd	250 mg/kg	31,63 ± 2,23	22,89 ± 3,00

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 6-11). ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett, **p<0,01, ***p<0,001 comparados ao tween 80 12 %.

4.4.1.1.2 Avaliação ponderal

Além dos resultados acima descritos, foi avaliada a toxicidade produzida por doses repetidas do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd (250 mg/kg, v.o.) durante 14 dias de tratamento. Com isso foi observado que as amostras vegetais não promoveram alterações significativas no peso corporal dos ratos, quando comparados ao controle negativo (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de *Combretum duarteanum* durante 14 dias sobre o peso dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Tratamento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Aumento (%)
Sham	245,7 ± 20,14	298,2 ± 17,60	17,58 ± 5,21
Tween 80 12 %	204,6 ± 21,3	255,7 ± 15,65	19,95 ± 7,36
Cimetidina	223,3 ± 14,41	276,7 ± 25,15	19,03 ± 4,55
EEtOH-Cd	221,3 ± 14,17	278,3 ± 17,65	25,79 ± 3,13
FaHex-Cd	203,6 ± 25,31	257,7 ± 22,31	27,25 ± 5,21

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 5-11). Análise de Variância de uma via ANOVA, seguido do teste de Dunnett, p<0,05 comparados ao tween 80 12 %.

4.4.1.1.3 Avaliação do peso dos órgãos

O tratamento durante 14 dias com o EEtOH-Cd ou FaHex-Cd (250 mg/kg, v.o.) também não promoveu alteração significativa no peso dos órgãos dos ratos ulcerados com ácido acético, em comparação ao grupo controle negativo (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de *Combretum duar-teanum* durante 14 dias sobre o peso dos órgãos dos ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Órgãos	Sham	Tween 80 12 %	Cimetidina (100 mg/kg)	EEtOH (250 mg/kg)	FaHex (250 mg/kg)
Coração	3,40 ± 0,72	3,85 ± 0,12	3,72 ± 0,24	3,99 ± 0,44	3,90 ± 0,36
Fígado	11,00 ± 0,74	10,89 ± 0,74	11,36 ± 0,43	10,89 ± 0,66	10,61 ± 0,66
Rins	5,09 ± 0,13	5,34 ± 0,17	5,31 ± 0,23	5,14 ± 0,16	5,39 ± 0,26
Baço	2,78 ± 0,36	3,06 ± 0,31	2,80 ± 0,17	2,80 ± 0,13	2,95 ± 0,44
Pulmão	4,33 ± 0,72	4,95 ± 0,64	4,70 ± 0,45	4,26 ± 0,20	5,12 ± 0,71

Dados da razão do peso dos órgãos dividido pelo peso corpóreo e transformado em arcoseno. Os dados estão expressos como média ± d.p. (n = 6-11). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, p>0,05 comparados ao tween 80 12 %.

4.4.1.1.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Em relação à análise dos parâmetros bioquímicos avaliados, nenhuma alteração foi observada quando EEtOH-Cd e FaHex-Cd foram comparados ao controle negativo (Tabela 13).

4.4.1.1.5 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Com relação aos parâmetros hematológicos, nenhuma alteração foi observada quando EEtOH-Cd e FaHex-Cd foram comparados ao controle negativo (Tabela 14).

Tabela 13. Efeito da administração oral do EEtOH e da FaHex obtidos de *C. duarteanum* durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Parâmetros	Tratamentos					
	Bioquímicos	Sham	Tween 80 12%	Cimetidina (100 mg/kg)	EEtOH (250 mg/kg)	FaHex (250 mg/kg)
Glicose (mg/dL)		198,3 ± 36,70	133,5 ± 34,46	208,9 ± 51,01**	169,4 ± 22,71	139,3 ± 25,02
Triglicerídeos (mg/dL)		93,00 ± 22,49	99,80 ± 17,64	93,29 ± 16,03	91,20 ± 14,17	88,67 ± 7,53
Colesterol (mg/dL)		58,09 ± 12,10	68,43 ± 11,84	62,71 ± 13,82	66,14 ± 5,67	67,78 ± 11,77
Uréia (mg/dL)		46,36 ± 8,33	42,57 ± 5,97	40,11 ± 5,86	38,67 ± 6,12	41,11 ± 7,52
Creatinina (mg/dL)		0,54 ± 0,09	0,51 ± 0,07	0,51 ± 0,061	0,50 ± 0,06	0,51 ± 0,12
Ácido úrico (mg/dL)		0,37 ± 0,13	0,52 ± 0,08	0,51 ± 0,12	0,52 ± 0,15	0,44 ± 0,12
AST (U/l)		78,67 ± 10,46	124,0 ± 37,38	106,1 ± 19,42	92,00 ± 17,93	113,9 ± 20,72
ALT (U/l)		40,45 ± 9,29	49,00 ± 6,16	45,44 ± 12,76	40,14 ± 8,24	40,57 ± 3,26

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 5-11). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, p<0,05 comparados à solução tween 80 12 %.

Tabela 14. Efeito da administração oral do EEtOH e da FAcOEt obtidos de *C. duarteana* durante 14 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos no modelo de úlcera induzida por ácido acético

Parâmetros	Tratamentos					
	Hematológicos	Sham	Tween 80 12 %	Cimetidina (100 mg/kg)	EEtOH (500 mg/kg)	FaHex (250 mg/kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)		7,74 ± 0,33	7,50 ± 0,39	7,42 ± 0,31	7,56 ± 0,35	7,45 ± 0,53
Hemoglobina (g/dL)		14,50 ± 0,57	13,91 ± 0,66	14,10 ± 0,57	14,08 ± 0,50	13,87 ± 0,52
Hematócrito (%)		43,11 ± 2,25	41,53 ± 2,17	42,08 ± 2,11	41,69 ± 1,56	40,81 ± 2,05
VCM (μ^3)		55,66 ± 1,79	55,43 ± 2,20	56,71 ± 1,28	55,20 ± 1,66	54,86 ± 2,94
HCM (μg)		18,75 ± 0,45	18,60 ± 0,74	19,03 ± 0,37	18,57 ± 0,43	18,68 ± 0,92
CHCM (%)		33,70 ± 0,57	33,54 ± 0,29	33,49 ± 0,69	33,66 ± 0,77	34,04 ± 0,55
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)		8,47 ± 1,51	9,68 ± 1,51	10,48 ± 1,53	9,22 ± 0,94	8,61 ± 1,10
Neutrófilo (%)		21,00 ± 5,10	31,00 ± 5,35	23,88 ± 4,82*	26,67 ± 1,97	27,86 ± 6,62
Eosinófilo (%)		1,00 ± 0,00	1,86 ± 0,90	1,33 ± 0,50	1,43 ± 0,53	1,00 ± 0,00
Linfócitos (%)		73,36 ± 5,33	61,86 ± 6,41	70,56 ± 6,00	66,43 ± 4,03	69,56 ± 9,71

Os valores estão expressos como média ± d.p. (n = 5-11). Análise de Variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett, $p < 0,05$ comparados à solução tween 80 12 %.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A redução na produção de ácido gástrico assim como o estímulo dos fatores protetores da mucosa gástrica são os principais alvos da terapia da úlcera péptica (VYAWAHARE et al., 2009). Atualmente existem vários medicamentos sintéticos disponíveis no mercado para o tratamento da úlcera (BHATTACHARYA et al., 2007). Porém, apesar da eficácia clínica, seus possíveis efeitos colaterais, interações medicamentosas e os altos índices de reincidência representam um grande obstáculo na terapêutica (MILLER; FARAGHER, 1986.; VYAWAHARE et al., 2009). Sendo ainda importante destacar que a introdução de novos medicamentos para o tratamento da úlcera exige um alto custo financeiro (VYAWAHARE et al., 2009).

Por estes motivos, nos últimos anos tem crescido o interesse por novas alternativas terapêuticas. As plantas medicinais estão entre as mais atrativas fontes de novos medicamentos, mostrando resultados promissores para o tratamento de úlcera gástrica (VYAWAHARE, 2009). Muitos estudos comprovam os efeitos gastroprotetores de extratos e outros derivados vegetais de várias espécies de plantas medicinais (BORRELLI, IZZO, 2000; VYAWAHARE, 2009).

Quais extratos são realmente ativos, como e quando podem ser prescritos e como devem ser preparados são questões que misturam o conhecimento popular ao científico e que devem ser respondidas por comprovações científicas e da ampliação dos estudos das plantas brasileiras (MACIEL et al, 2002).

Diante dessas considerações, o presente trabalho foi realizado com o intuito de investigar a toxicidade e validar o uso popular de *C. duarteanum* frente à atividade gastroprotetora e cicatrizante, avaliando assim o efeito do EEtOH e da FaHex obtidos das folhas desta espécie, em modelos de indução aguda de úlceras tendo como agentes lesivos o HCl/etanol, etanol absoluto, AINEs (piroxicam), estresse por imobilização e frio e contensão do suco gástrico, modelos estes que mimetizam as principais causas de úlcera no homem, além de investigar os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora e avaliar o processo de cicatrização da úlcera induzida por ácido acético.

Procedimentos clínicos com plantas medicinais têm sido largamente utilizados desde os primórdios da história humana, muitas vezes sem restrições e de forma indiscriminada (VENDRUSCOLO et al., 2005). No entanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como

medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA.; NASCIMENTO, 2006; AGRA et al., 2007; 2008). É fundamental o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia da qualidade destas preparações, pois seu uso inadequado, sem o conhecimento toxicológico necessário, pode originar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos (VENDRUSCOLO et al., 2005).

Os estudos toxicológicos têm entre muitas finalidades contestar a idéia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que o uso popular de plantas medicinais é suficiente para validar a eficácia destes medicamentos (LAPA, 1999; LAPA, 2001; CRAVEIRO et al., 2008; MARLIÉRE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008).

A toxicidade aguda é utilizada para avaliar as substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou sinais tóxicos como estabelecido pela legislação vigente em cada país (MARIZE, 2006), podendo também ser determinadas as espécies animais mais susceptíveis à ação da substância avaliada, identificar órgãos alvos e selecionar doses para estudos posteriores (CHAN; HAYES, 1994). Nesta perspectiva foi realizado o ensaio toxicológico pré-clínico agudo com EEtOH-Cd.

O estudo foi iniciado com a realização da triagem farmacológica comportamental utilizando a metodologia preconizada por Almeida et al (1999), com objetivo de indentificar as possíveis alterações em nível do SNC e SNA produzidas pelo EEtOH na dose de 2000 mg/kg (OECD, 2001). Portanto, foi observado que o EEtOH-Cd na dose única de 2000 mg/kg (v.o.) não provocou nenhuma alteração comportamental dentro dos parâmetros avaliados.

Em adição aos parâmetros anteriormente avaliados, foi analisado se houve variação do peso corporal, já que é um parâmetro considerado indicador de efeitos adversos, ou seja, os animais que sobrevivem não podem perder mais que 10 % do peso inicial (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). O EEtOH-Cd (2000 mg/Kg v.o.) não alterou significativamente o peso dos animais tratados em relação aos respectivos grupos controles aos quais foram comparados (Tween 80 12 %), estando a variação dentro dos limites estabelecidos pela literatura.

Ainda na avaliação da toxicidade aguda, quando investigado o consumo de água dos animais, não foi verificada nenhuma alteração significativa na ingesta de água, tanto no grupo dos machos quanto no das fêmeas, porém, com relação ao consumo de ração foi detectada alterações significativas para os machos, fato não ocorrido no grupo das fêmeas. Entretanto, apesar do consumo alimentar ser um

parâmetro importante no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica (IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003), esse resultado não é suficiente para inferir toxicidade a amostra vegetal estudada, nas condições avaliadas.

Conforme preconizado por Dallegrave (2003) alterações na massa relativa dos órgãos relacionam-se diretamente com toxicidade. Assim, para investigar essa teoria foi avaliado no final do ensaio toxicológico agudo se o EEtOH promoveu alterações significativas no peso dos órgãos. Dessa forma, foi observado que o EEtOH não promoveu alteração significativa e nem alteração macroscópica nos mesmos quando comparado aos órgãos dos animais controles.

Por não ter ocorrência de morte dos animais, não foi possível determinar a DL_{50} . Foi possível escolher com segurança as doses do EEtOH e FaHex para realização da investigação da atividade gastroprotetora e cicatrizante. A escolha dessas doses está de acordo com o preconizado por Souza Brito (1994), que diz que a dose utilizada para extratos brutos em triagens farmacológicas não devem ultrapassar 1000 mg/kg.

Assim, para uma avaliação inicial da atividade do EEtOH-Cd, quanto ao seu efeito gastroprotetor, foi realizada uma triagem farmacológica, utilizando como agente lesivo da mucosa gástrica o etanol acidificado (HCl/etanol).

Segundo Mizui e Doteuchi (1983) a lesão causada pelo HCl/etanol, confere um efeito tóxico direto na mucosa gástrica, causando transtornos na integridade da mucosa, sendo um bom modelo para investigar produtos com possível atividade citoprotetora.

De acordo com Szabo (1987) há pouco envolvimento do ácido gástrico na formação da lesão, a presença do HCl apenas acelera o processo. Além disso, o etanol induz a solubilização dos componentes do muco no estômago, com concomitante diminuição do potencial transmucoso, aumentando o fluxo de Na^+ e K^+ para o lúmen, reforçando simultaneamente a secreção de pepsina, perda de íons H^+ e o conteúdo de histamina no lúmen, além disso, ocorre estresse oxidativo, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA (SZABO, 1987; GONZALES et al., 2001).

Os resultados obtidos nesse protocolo experimental mostraram que o EEtOH-Cd inibiu significativamente as lesões gástricas produzidas pelo agente lesivo em camundongo o que permitiu a continuidade do trabalho.

Entende-se como defesa da mucosa a habilidade da mesma em resistir a injúrias produzidas por secreções endógenas (ácido, pepsina e bile) e a ingestão de agentes irritantes (ex: álcool) (WALLACE, 2001). A formação de úlceras gástricas por agentes necrozantes como o HCl e etanol estão envolvidos com a diminuição dos mecanismos de proteção (KINOSHITA et al., 1995).

O etanol em altas concentrações danifica diretamente a mucosa gástrica provocando gastrite aguda, levando a hiperemia, edema, hemorragia, úlcera, dentre outros danos (PAN et al., 2008) sendo, por isso, largamente utilizado para induzir úlcera gástrica em animais (SHEEBA; ASHA, 2006). A administração intragástrica de álcool absoluto em ratos, os quais foram mantidos em jejum por 24 horas, é capaz de produzir lesões hemorrágicas lineares, edema na submucosa, friabilidade da mucosa, recrutamento de células inflamatórias e a perda de células epiteliais do estômago (FRANKE; TEYSSEN; SINGER, 2005). Vários mecanismos estão envolvidos no processo patogênico da úlcera induzida por etanol, dentre os quais incluem-se a depleção de grupamentos sulfidrílicos não-protéicos, a modulação do sistema do óxido nítrico e a redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (LA CASA et al., 2000).

Nesta perspectiva foi avaliado se o EEtOH-Cd e FaHex-Cd protegem a mucosa gástrica das lesões induzidas pela administração oral de etanol absoluto. Com base nos resultados foi observado que tanto o EEtOH-Cd quanto a FaHex-Cd foram capazes de proteger significativamente a mucosa gástrica dos ratos, sugerindo que tal efeito farmacológico pode estar ligado à vários fatores, dentre os quais podemos citar estimulação dos sistemas antioxidantes, diminuição da peroxidação lipídica, aumento na produção de óxido nítrico com restabelecimento do fluxo sanguíneo local, proteção contra danos genéticos, aumento na produção de prostaglandinas constitutivas assim como produção de muco e bicarbonato e melhora na regeneração das células epiteliais gástricas.

Com o dano ocasionado pelo etanol ao sistema antioxidante do organismo, os radicais livres de oxigênio tendem a reagir com ácidos graxos insaturados na membrana da célula, afetando a fluidez e a permeabilidade da membrana celular (BAGCHI et al., 1998; REPETTO et al., 2003). Além disso, a mucosa gástrica é rica em grupamentos protéicos sulfidrílicos, que podem ser alvo de ROS. Grupos sulfidrilas de proteínas oxidadas levam a desnaturação de proteínas ou inativação

de enzimas além de danos ao receptor ou modificação da membrana celular, contribuindo para a lesão na mucosa (LA CASA et al., 2000; BILICI et al., 2002).

Adicionado a estes fatores, ainda existe uma importante atuação do metabólito desse agente lesivo, o acetaldeído, resultante da oxidação do etanol, que também é responsável por causar injúria na mucosa gástrica, por apresentar efeitos mutagênicos e carcinogênicos em culturas de células e em modelos animais (VÄKEVÄINEN et al., 2000), além de formar complexo com a glutatona, diminuindo os níveis de antioxidante favorecendo a peroxidação lipídica (SALASPURO, 2003) .

O próximo passo desse trabalho foi investigar se as amostras vegetais, em estudo eram capazes de promover proteção gástrica frente às lesões ulcerativas agudas induzidas pelo estresse e AINE, pois nesses modelos estão envolvidas a via do nervo vago bem como fatores citoprotetores da mucosa.

Ulcerações causadas pelo estresse são lesões difusas na parede mucosa do estômago, ocorrendo algumas vezes no esôfago e intestino. Geralmente são ocasionadas por eventos estressantes a exemplo de queimaduras, choque, sepse, cirurgia e trauma (JIA et al., 2007).

Entre os vários modelos de estresse animal, o de imobilização e frio tem produzido resultados mais reprodutíveis e é clinicamente relevante, visto que comumente é usado para induzir ulceração por estresse (SENAY; LEVINE, 1967; SILENE, 1988; PARE, 1988, JIA et al., 2007). Nesse modelo a diminuição da temperatura, ativa o sistema termogênico no cérebro, resultando na secreção do hormônio liberador da tireotrofina (TRH), que libera o hormônio estimulante da tireóide (TSH), via nervo vago, aumentando a secreção ácida (TANAKA et al., 2007).

Este modelo pode danificar o estômago dos animais por interação do sistema neuro-imuno-endócrino, que estimula o sistema nervoso autônomo (BANDYPADHYAY et al., 2001), ativa o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenocortical (PRUETT, 2003; FILARETOVA, 2006) e estimula o sistema termogênico do cérebro (TANAKA et al., 2007), resultando na modulação do sistema imune e, por consequência, na resposta inflamatória (HAMAGUCHI et al., 2001; PRUETT, 2003; ODASHIMA et al., 2005; TANAKA et al., 2007; FILARETOVA et al., 2007).

O TGI, em particular o estômago, é sensível a vários estímulos estressantes (FILARETOVA, 2006) como hipovolemia, depressão cardíaca, vasoconstrição esplênica e principalmente diminuição do fluxo sanguíneo gástrico, que contribui para isquemia da mucosa e retrodifusão de ácido (MENGUY; DESBAILLETS;

MASTERS, 1974; KAMADA et al., 1982) que tem sido propostos como maior fenômeno patofisiológico nas lesões induzidas por estresse. A produção de radicais livres de oxigênio via sistema xantina oxidase, neutrófilos e peroxidação lipídica iniciada pelas espécies reativas de oxigênio têm sido investigadas para explicar os mecanismos de formação das lesões gástricas induzidas pelo estresse (JIANG et al., 2005).

A úlcera gástrica induzida pelo estresse pode ser mediada pela liberação do fator de corticotrofina (CRF) (BHATIA; TANDON, 2005), corticosteróides (MAYER, 2000), prostaglandinas (DHARMANI et al., 2005), secreção ácida (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006) e neurotransmissores (SAAD et al., 2001).

A hipersecreção de catecolamina resulta na ativação do sistema simpático-adrenomedular que contribui para isquemia da mucosa gástrica por produzir vasoconstrição esplânica. Entretanto, tanto a estimulação simpática quanto a parassimpática do estômago induz ao aumento da motilidade gástrica e contração muscular, o que leva a vasoconstrição e isquemia na mucosa gástrica. Além disso, a hiperatividade do sistema simpático também provoca constrição direta dos microvasos da submucosa gástrica, reduzindo o fluxo sanguíneo para mucosa do estômago ocasionando a hipóxia e isquemia local (HASE; MOSS, 1973; KITAGAWA; FUJIWARA; OSUMI, 1979; DAS et al., 1997).

Sob condições de isquemia e hipóxia, espécies reativas de oxigênio (ROS) como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil são rápida e continuamente produzidos, resultando no estresse oxidativo, comprovadamente responsável pelo desenvolvimento e progressão de necrose epitelial e ulceração da mucosa (DAS et al., 1997; SHIAN et al, 2000, YASUKAWA et al., 2004). Além disso, esta condição isquêmica é acompanhada por uma resposta aguda inflamatória da mucosa gástrica caracterizada pela acumulação de células e de vários mediadores inflamatórios (LIU et al, 1998; HAMAGUCHI et al., 2001; NISHIDA et al., 1997; OKAJIMA et al., 2000)

O recrutamento e ativação de neutrófilos contribuem para o processo fisiopatológico ocorrido na mucosa gástrica (LIU et al, 1998; HAMAGUCHI et al., 2001). A síntese e liberação de mediadores inflamatórios, especialmente citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , e IL-18, são importantes determinantes da inflamação da mucosa seguida da lesão gástrica ocasionada pelo estresse por imobilização e frio (NISHIDA et al., 1997; OKAJIMA et al., 2000; NISHIDA; OHTA;

ISHIGURO, 1998; BREGONZIO et al., 2003; SEKIYAMA et al., 2005; SEINO et al., 2007).

No modelo de indução de úlcera por estresse (imobilização e frio) o EEtOH e a FaHex de *C. duarteanum* foram capazes de inibir o desenvolvimento das úlceras. Como no modelo de estresse há um aumento na secreção de ácido, inibição da secreção de muco e bicarbonato (pela estimulação da via histaminérgica e pela inibição da ação das PGs), além do aumento na produção de radicais livres, é possível inferir até o momento que o EEtOH-Cd e FaHex-Cd conferem atividade gastroprotetora por mecanismos anti-secretório, citoprotetor e/ou antioxidante, a serem investigados posteriormente.

De acordo com os resultados obtidos, passou-se a investigar um modelo mais específico relacionado com a citoproteção, que é o modelo de úlcera gástrica induzida por antiinflamatório não esteroide, utilizando para isto EEtOH-Cd e FaHex-Cd em camundongos.

Os antiinflamatórios não esteroidais causam danos gastrintestinais devido tanto a ação local quanto aos efeitos sistêmicos, sendo estes mediados principalmente pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas, por inibição da enzima cicloxigenase (COX), COX-1 e COX-2 (MUSUMBA.; PRITCHARD.; PIRMOHAMED, 2009).

Vários mecanismos estão envolvidos na ação citotóxica local do AINEs. A ação local na mucosa inicia-se pela quebra da barreira celular epitelial gástrica (TOMISATO et al., 2004). Os AINEs têm demonstrado atenuar a barreira hidrofóbica de superfície do estômago por se associar quimicamente com os fosfolípídeos presentes na superfície de gel da camada mucosa gastrintestinal, danificando as propriedades hidrofóbicas da barreira (DARLING et al., 2004; LICHTENBERGER et al., 2006). Ocasionalmente, ocasionam ruptura da membrana de fosfolípídeos e aumenta a permeabilidade por induzir modificações na hidrofobicidade da membrana, fluidez, espessura e formação de poros. Isto leva a uma exposição ao ácido, devido sua retrodifusão, levando a morte celular por apoptose e necrose com desenvolvimento de úlceras gástricas (LICHTENBERGER et al., 2006). Além disso, inclui-se a redução da secreção de muco e bicarbonato (PHILLIPSON et al., 2002; BAUMGARTNER et al., 2004) e diminuição da capacidade do EGF em promover reparação epitelial, pela inibição na ativação de seus receptores, consequentemente, desencadear a via de sinalização (PAI et al., 2001).

A capacidade dos AINES causarem úlceras tem mostrado boa correlação com sua habilidade em suprimir a síntese de prostaglandina, com maior significância em relação a COX-1 que a COX-2. A inibição da COX-1 também leva a um decréscimo na produção de tromboxano causando aumento na tendência ao sangramento podendo ser este o principal fator determinante da propensão de um AINE provocar complicações hemorrágicas (MUSUMBA.; PRITCHARD.; PIRMOHAMED, 2009).

A integridade da mucosa gástrica depende da contínua geração de prostaglandina E₂ (PGE₂) e prostaciclina (PGI₂), mediada pela COX-1 e COX-2, que catalisam uma etapa limite na conversão de ácido araquidônico em endoperóxido de prostaglandina e prostanóides (MUSUMBA.; PRITCHARD.; PIRMOHAMED, 2009). PGE₂ e PGI₂ são potentes vasodilatadores e controlam quase todos os aspectos da defesa e cicatrização da mucosa gástrica (MUSUMBA.; PRITCHARD.; PIRMOHAMED, 2009). A diminuição nos níveis de prostaglandina pode resultar em hipermotilidade gástrica, distúrbios microvasculares, promovendo assim a ativação e infiltração de neutrófilos, com subsequente produção de ROS e peroxidação lipídica, o que ocasiona dano gástrico (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Além disso, a inibição dessa enzima promove a redução de muco e bicarbonato (RAINSFORD, 2001) e da acidez gástrica (WALLACE, 2001). A inibição de COX-1 também pode aumentar a expressão de COX-2, resultando na maior produção de PGs via essa enzima (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

No modelo de indução de úlcera por AINE (piroxicam) foi observado que o EEtOH-Cd e FaHex-Cd obtidos de *C. duarteanus* inibiram significativamente as lesões ulcerativas induzidas pelo agente lesivo (antiinflamatório não-esteroidal), o que sugere atividade gastroprotetora, possivelmente via mecanismos citoprotetores, visto que as lesões promovidas por AINEs envolvem principalmente a inibição das PGs, principais mediadoras da citoproteção na mucosa gástrica.

De acordo com os resultados obtidos nestes modelos clássicos de indução aguda de úlcera gástrica, pode-se concluir parcialmente que tanto o EEtOH-Cd como FaHex-Cd inibiram as lesões gástricas produzidas por esses agentes lesivos, apresentando propriedade gastroprotetora, que está relacionada a inibição da secreção ácida gástrica, aumento dos mecanismos de proteção da mucosa (citoproteção) e a ação antioxidante.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos com *Combretum leprosum* em que o extrato etanólico apresentou atividade gastroprotetora, frente a modelos de indução aguda de úlcera como etanol absoluto e AINEs (NUNES et al., 2008).

Os resultados promissores das amostras vegetais nos levou a investigar outro modelo que corroborasse os resultados anteriores. Pelo modelo de ligadura do piloro foram avaliados o ILU e os parâmetros bioquímicos (pH, concentração de íons e volume gástrico) do EEtOH-Cd e FaHex-Cd nas suas doses mais efetivas.

A seleção das doses mais efetivas do EEtOH-Cd e FaHex-Cd foi realizada pelo modelo de úlcera induzida por etanol, considerando a sua etiologia ampla e complexa, além de ser um modelo simples e com reprodutibilidade. A dose mais efetiva tanto para o extrato quanto para a fase foi 250 mg/kg.

O acúmulo de ácido e pepsina neste modelo leva a uma autodigestão e ulceração da mucosa gástrica (SHAY et al., 1945; GOEL.; BHATTACHARYA, 1991, BHARTI.; WAHANE.; KUMAR, 2010) sendo o aumento da acidez gástrica considerado um fator que contribui na patogênese da úlcera (GOA.; MONK, 1987; TARIQ et al., 2007). Além disso, a migração de neutrófilos na mucosa após a ligadura do piloro está envolvida no dano causado à mucosa do estômago, possivelmente por liberar radicais livres o que pode acarretar peroxidação lipídica e danos para a membrana da célula (RASTOGI et al., 1998).

No modelo de ligadura de piloro é possível avaliar alterações nos parâmetros bioquímicos do conteúdo gástrico (TOMA et al., 2004) como pH, acidez total e volume gástrico, podendo ser considerada com atividade anti-secretória as substâncias que afetam a acidez gástrica. Acredita-se que esta hipersecreção ácida seja estimulada por reflexo vago-vagal, em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido à obstrução do piloro. Este procedimento estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no TGI é estimular as células parietais a secretar HCl (BAGGIO et al., 2003).

Em tal modelo tanto a administração oral quanto a intraduodenal do EEtOH-Cd e FaHex-Cd (250 mg/Kg) reduziram significativamente o índice de lesão ulcerativa por contensão do suco gástrico, culminando em atividade gastroprotetora. Simultaneamente, a realização desse procedimento experimental, na tentativa de se obter uma confirmação ou uma rejeição de tal hipótese, foi realizada a avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico, onde foi observado que o pH,

concentração de H^+ e volume do suco gástrico, não foram alterados significativamente quando comparados aos seus respectivos controles negativos.

Esses resultados sugerem que ambos o EEtOH-Cd e FaHex-Cd por diferentes vias não apresentam alterações nos parâmetros bioquímicos da secreção gástrica, porém esta última não pode ser totalmente descartada devido ainda não ter sido avaliados outros modelos a exemplo da avaliação de bomba H^+ , K^+ , ATPase, visto que é forte indicador da atividade anti-secretória.

Diante dos resultados, tornou-se necessário compreender os mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora do EEtOH-Cd e da FaHex-Cd e para isso, foram realizados protocolos experimentais que avaliassem a participação do muco, óxido nítrico e grupamentos sulfidrilas na gastroproteção promovida pelas amostras vegetais.

O muco é secretado na superfície do estômago e age tanto como um lubrificante reduzindo danos físicos quanto o acesso das bactérias ao epitélio (LIÉVIN-LE.; SERVIN, 2006; MEYER-HOFFERT et al., 2008).

No TGI humano, o muco é mais espesso no estômago (180 μm ; variando de 50–450 μm) e cólon (110–160 μm) (COPEMAN et al., 1994.; KERSS.; ALLEN.; GARNER, 1982; SANDZEN.; BLOM.; DAHLGREN, 1988; CONE et al., 2009). A superfície luminal da camada de muco é coberta por uma película de fosfolídeos surfactantes com fortes propriedades hidrofóbicas (LICHTENBERGER, 1999.; HILLS.; BUTLER.; LICHTENBERGER, 1983; LAINE.; TAKEUCHI.; TARNAWSKI, 2008). O gel mucoso é secretado pela superfície apical das células epiteliais e contem 95% de água e 5 % de glicoproteínas mucinas (ALLEN.; FLEMSTRÖM, 2005; ATUMA; STRUGALA; ALLEN, 2001; JORDAN; NEWTON; PEARSON, 1998).

O muco gástrico é a primeira linha de defesa contra o ácido, esse muco aderido juntamente com o bicarbonato secretado pelo epitélio, serve como uma barreira contra a autodigestão (ALLEN.; FLEMSTROM, 2005). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrintestinais, incluindo gastrina e secretina, assim como PGE_2 e agentes colinérgicos (MONTROSE et al., 2006 , ALLEN.; FLEMSTRÖM, 2005). Substâncias ulcerogênicas como aspirina e sais biliares causam dissipação do gel mucoso e parede de fosfolípido, levando a retrodifusão de ácido e lesão da mucosa (ALLEN.; FLEMSTRÖM, 2005, DARLING; ROMERO; DIAL, 2004).

Este fator protetor é hábil em agir como agente antioxidante reduzindo os danos à mucosa ocasionados por radicais livres de oxigênio. Se alguns radicais são gerados na superfície epitelial contendo muco, este pode seqüestrá-los. As propriedades protetoras da barreira de muco dependem não somente da estrutura do gel, mas também da quantidade ou espessura da parede que recobre a superfície mucosa (PENISSI.; PIEZZI, 1999).

Os resultados obtidos nesse modelo experimental, que teve como intuito a determinação do muco gástrico aderido a mucosa após o tratamento com a FaHex-Cd (250 mg/Kg) indicaram que a mesma não foi capaz de aumentar de modo significativo a produção de muco. Entretanto, a carbenoxolona aumentou a produção de muco significativamente, porém, de acordo com o conhecimento sobre o seu mecanismo de ação tal resultado já era esperado.

Realizada a avaliação da participação do muco no mecanismo de ação do efeito citoprotetor de *C. duarteatum*, a próxima etapa do presente trabalho foi avaliar a participação do óxido nítrico na citoproteção promovida pela espécie vegetal em estudo.

O óxido nítrico é o mediador de várias funções biológicas no trato gastrointestinal, incluindo fluxo sanguíneo, manutenção da integridade da mucosa e do tônus vascular da mucosa. O NO é sintetizado a partir da conversão da L-arginina para quantidades equimolares de L-citrulina (LANAS, 2008). A oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO é catalisada por uma das três isoformas da óxido nítrico sintetase (NOS). Em nível de trato gastrointestinal, há duas isoformas constitutivas expressas, chamadas de NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), as quais são expressas basalmente pelo endotélio vascular e nervos entéricos do trato gastrointestinal, respectivamente (CHO, 2001). A isoforma induzida (iNOS) é expressa em macrófagos e neutrófilos, mas também pode ser observada nas células epiteliais e neurônios (WALLACE.; MILLER, 2000) .

Uma vez que o NO é gerado, ele liga-se ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel e catalisa a conversão do GTP em cGMP (MONCADA.; HIGGS, 1993). Este liga-se a domínios alvos de proteínas kinases, canais iônicos e fosfodiesterases, para obter respostas celulares (LANAS, 2008).

O NO é responsável tanto pela mediação das funções teciduais normais, quanto pelas lesões na mucosa gástrica. O NO produzido pela cNOS é um mediador das defesas e do reparo na mucosa gastrointestinal, porém o NO produzido via iNOS

tem efeito pró-ulcerogênico (KOBATA et al., 2007) também podendo alterar a motilidade gástrica (WALLACE, 1999; CHO, 2001).

Com o intuito de avaliar o envolvimento do óxido nítrico no mecanismo de ação gastroprotetor provocado pelo EEtOH-Cd e FaHex-Cd, foi realizado o modelo de úlcera induzida por etanol em ratos pré-tratados com N-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) uma droga bloqueadora da síntese do NO. Dessa forma, foi observado que o EEtOH e FaHex reduziram de forma significativa o ILU sugerindo que a gastroproteção produzida pelo extrato e fase de *C. duarteanum* Cambess envolve a participação do NO.

Outro agente gastroprotetor importante a ser investigado no mecanismo de ação desta espécie foram os grupamentos SHs, que atuam mantendo a estabilidade do muco ao formar pontes de dissulfeto com suas subunidades (CHANDRANATH, BASTAK; SINGH, 2002) e aumentando a sua produção (SALIM, 1993).

Os compostos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) são agentes que desempenham um papel chave na proteção da mucosa contra injúria gástrica produzida pelo etanol (SZABO; VATTAY, 1990; FERREIRA et al., 2008). A concentração relativamente elevada de NP-SH, que é principalmente glutathiona reduzida (GSH), além de cisteína (CSH), coenzima A e outros tióis, indica suas possíveis implicações para gastroproteção (MILLER et al., 1985; NAGY.; NAGATA.; SZABO, 2007). O aumento nos danos à mucosa gástrica está acompanhada pelo decréscimo na concentração de compostos NP-SH, devido aos grupos SH ligarem-se aos radicais livres formados pela ação dos agentes nocivos. Também podem estar envolvidos no seqüestro de radicais livres de oxigênio e no controle da produção natural de muco (SALIM, 1993; FERREIRA et al, 2008)..

A GSH protege a mucosa gástrica do estresse oxidativo induzido por etanol ao se ligar aos radicais livres que são formados por este agente nocivo. O etanol quebra as pontes de sulfetos que unem as subunidades de muco tornando-o solúvel em água, reduzindo, assim ,seu efeito protetor (KUSHIMA et al., 2005).

A depleção de GSH durante a injúria da mucosa gástrica pode ser devido a: (1) oxidação direta de GSH a GSSG; (2) formação de dissulfetos mistos com grupos SH ou cisteína; (3) conjugação não enzimática com GSH (MURPHY.; KEHRER, 1989; NAGY.; NAGATA.; SZABO, 2007). Ao passo que o aumento no nível de GSH oxidada é um dos elementos na patogênese da lesão da mucosa. O GSSG é rapidamente reduzida a GSH pelo GSSGR dependente de NADPH (JAESCHKE,

1990; NAGY.; NAGATA.; SZABO, 2007). Quando a oxidação de GSH à GSSG excede a capacidade da GSSGR, GSSG é ativamente transportada para fora das células. GSSG destrói seletivamente os inibidores de protease de cisteína, conseqüentemente ela pode ativar proteases lisossomais (Catepsinas B, H, L) na mucosa gástrica que participam do desenvolvimento precoce das lesões gástricas (SZABO.; NAGY.; PLEBANI, 1992; NAGY et al., 1997.; SZABO.; PIHAN.; DUPUY, 1987; NAGY.; NAGATA.; SZABO, 2007).

Diante os resultados obtidos, foi observado que o EEtOH-Cd e FaHex-Cd reduziram de forma significativa o ILU, sugerindo que a gastroproteção produzida pelo extrato e fase de *C. duarteanum* Cambess envolve a participação de compostos sulfidrílicos.

Mediante a relevância da atividade gastroprotetora do EEtOH e da FaHex obtidos de *C. duarteanum*, passou-se a investigar a capacidade das amostras vegetais de estimularem o processo de cicatrização da úlcera no modelo de indução por ácido acético.

O modelo de ácido acético tem sido amplamente utilizado para avaliar o processo de cicatrização da úlcera, sendo considerado o modelo experimental que mais se assemelha à úlcera crônica no homem em termos de características patológicas e mecanismo de cicatrização (OKABE, AMAGASE, 2005). O processo de cicatrização da úlcera é caracterizado por ser geneticamente programado incluindo fatores como, inflamação, proliferação celular, re-epitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese, interações entre várias células e o remodelamento da matriz e do tecido, todos resultantes na cicatrização (MARTIN; WALLACE, 2006.; TARNAWSKI, 2005; WALLACE et al., 2006).

Todos esses eventos são controlados por citocinas, fatores de crescimento e de transcrição ativados por lesão tecidual, atuando via ação autócrina e/ou parácrina. Dentre os fatores de crescimento destacam-se: o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β) bem como COX-2 (MARTIN; WALLACE, 2006.; TARNAWSKI, 2005; WALLACE et al., 2006).

A estrutura da glândula é gradativamente restabelecida simultaneamente à circulação da mucosa (WALLACE et al., 2006), sendo acompanhada pelo aumento

nos níveis de gastrina plasmática e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β), as quais são regulados pelos fatores de crescimento, em especial o VEGF. A angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera e a replicação das células epiteliais na margem restabelecem a arquitetura glandular (BRZOZOWSKI, 2003; WALLACE, 2006).

As plaquetas também contribuem significativamente para o processo de cicatrização da úlcera, em parte via produção de inúmeros fatores de crescimento, que podem promover a angiogênese e a proliferação das células epiteliais (MARTIN; WALLACE, 2006.; TARNAWSKI, 2005; WALLACE et al., 2006).

Com intuito de avaliar se *C. duarteanum* estaria acelerando o processo de cicatrização da úlcera, o EEtOH-Cd e a FaHex-Cd foram administrados durante um período 14 dias após a indução de úlcera por ácido acético. Neste experimento as amostras vegetais aumentaram o processo de cicatrização da úlcera, visto que reduziram significativamente a ALU, sugerindo que *C. duarteanum* apresenta atividade cicatrizante.

Adicionalmente foram avaliados o consumo de água e ração, peso corpóreo, peso dos órgãos, além dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, servindo como indicadores de possível toxicidade após 14 dias de tratamento com as amostras vegetais (CALVO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2008).

Foi observado que o EEtOH-Cd promoveu aumento no consumo de água e ração, porém não alteraram o peso corpóreo e dos órgãos dos animais avaliados. A determinação do consumo de água e ração é importante no estudo de segurança de um produto com finalidade terapêutica, isto explica-se pelo fato de que a ingestão adequada de água e nutrientes são essenciais para a manutenção do estado fisiológico dos animais e para se ter uma resposta adequada à droga teste (STEVENS; MYLECRAINE, 1994; IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003; FÉRES et al., 2006).

Com relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, não foi constatada alteração significativa quando comparados ao grupo controle negativo (tween 80 12%).

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é possível sugerir que *C. duarteanum* apresenta promissora atividade gastroprotetora, com propriedades cicatrizantes. Essa atividade está relacionada a mecanismos citoprotetores cabendo uma maior investigação quanto ao mecanismo anti-secretório e antioxidante.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos nesse trabalho de avaliação da atividade gastroprotetora do extrato etanólico bruto (EEtOH) e da fase hexânica (FaHex) obtidos das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess, em modelos de indução de úlcera que mimetizam as causas desta afecção no homem, foi possível chegar as seguintes conclusões:

- ✓ O EEtOH-Cd apresenta baixa toxicidade nas doses avaliadas;
- ✓ O EEtOH-Cd e a FaHex-Cd apresentaram atividade gastroprotetora frente aos agentes indutores de úlcera gástrica;
- ✓ A ação citoprotetora das amostras vegetais está relacionada com participação dos grupamentos sulfidrilas e do óxido nítrico;
- ✓ O EEtOH-Cd e a FaHex-Cd apresentaram efeito cicatrizante no modelo de úlceras induzido por ácido acético, possivelmente por atuarem na estimulação de fatores de crescimento e da angiogênese;
- ✓ O EEtOH-Cd e FaHex-Cd não apresentaram sinais de toxicidade de acordo com os parâmetros avaliados durante os 14 dias de tratamento da úlcera gástrica induzida por ácido acético;
- ✓ A atividade antiulcerogênica das amostras vegetais pode estar relacionada à presença de terpenos.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Os resultados promissores obtidos instigaram a continuação do trabalho, com a perspectiva de aprofundar o estudo da atividade antiulcerogênica do EEtOH e da FaHex obtidos das folhas de *Combretum duarteanum*, proporcionando um maior conhecimento sobre a atividade farmacológica da espécie, então nos propomos a:

- ✓ Investigar o mecanismo citoprotetor envolvido na atividade gastroprotetora de *C. duarteanum* por meio da determinação dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) na mucosa gástrica;
- ✓ Realizar análise histológica do estômago, a partir do modelo de indução de úlcera por ácido acético, avaliar por meio de estudos imunohistoquímicos os fatores envolvidos no processo de cicatrização de lesões, na proliferação celular e angiogênese por meio da determinação de COX₂; de PCNA - marcador de proliferação celular que fornece dados do processo de cicatrização; da *HSP 70* (Heat Shock Protein) que tem a função de proteger de preservar as estruturas das proteínas, reparar ou remover proteínas danificadas e *CXCR4* (receptor de quimiocina CX 4) - marcador endotelial para avaliar angiogênese;
- ✓ Investigar o mecanismo antioxidante do EEtOH e da FaHex de *C. duarteanum* utilizando o modelo de úlceras gástricas induzidas por isquemia e reperfusão;
- ✓ Pesquisar o efeito antiulcerogênico das amostras vegetais de *C. duarteanum* em modelo de lesões duodenais induzidas por cisteamina em ratos;
- ✓ Avaliar o efeito antiinflamatório intestinal do EEtOH e da FaHex de *C.*

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADNYANA, I. K; TEZUKA, Y; BANSKOTA, A. H; TRAN, K. O; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. **J Nat Prod**, v. 64, p. 360– 3, 2001.
- AGRA, M.F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa. Editora União, 1996.
- AIHARA T, NAKAMURA E, AMAGASE K, TOMITA K, FUJISHITA T, FURUTANI K, OKABE S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacol Ther**, v.98, p.109-27, 2003.
- AIHARA, T., NAKAMURA, Y., TAKETO, M.M., MATSUI, M., OKABE, S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M₃ and M₅ but not M₁ muscarinic acetylcholine receptors in mice. **AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, p. 1199-1207, 2005.
- ALI, H; KONIG, G. M; KHALID, S. A; WRIGHT, A. D; KAMINSKY, R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **J Ethnopharmacol**, v. 83, p. 219– 28, 2002.
- ALKOFAHI, A.; ATTA, A. H. Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.67, p. 341-345, 1999.
- ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, p.C1–19, 2005.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANAS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALKOFAHI, A.; ATTA, A. H. Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.67, p. 341-345, 1999.
- ANCOLIO, C; AZAS, N; MAHIOU, V; OLLIVER, E; GIORGIO, C; KEITA, A et al. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. **Phytother Res**, v. 19, p.646– 9, 2002
- ANDERSON, K.; CARLSSON, E. Potassium-competitive acid blockade: a new therapeutic strategy in acid-related diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 108, p. 294-307, 2005.
- ANDREOLI, T.E. Free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 650-651, 2000.

- ANGEH, J. E. A, HUANGB, X; SATTLER, I; SWAN, G. E; H. DAHSE B, A. H'ARTL B, ELOFF, J. N. A. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol**, v.110, p. 56–60, 2007.
- ANIAGU, S. O; BINDA, L. G; NWINYI, F. C; ORISADIPE, A; AMOS, S; WAMBEBE, C; GAMANIEL, K. Anti-diarrhea and ulcer-protective effects of the aqueous root extract of *Guiera senegalensis* in rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 97, 549–554, 2005.
- ARAKI, H.; YAGI, K.; SUZUKI, K., et al. Roles of prostaglandin E receptor subtypes in cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomachs. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14(Suppl 1) p,18–25, 2000.
- ARUOMA O. I.. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biol. Med.** v. 20, p. 675-705, 1995.
- ASRES, K; BUCAR, F; KNAUDER, E; YARDLEY, V; KENDRICK, H; CROFT S. L. In vitro antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. **Phytother Res**, v. 15, p. 613–7, 2001.
- ASUZU, I. U; NJOKU, J. C. The pharmacological properties of the ethanolic root extract of *Combretum dolichopetalum*. **Phytother**. v.6, p. 125-128, 1992.
- ATHMANN, C.; ZENG, N.; SCOTT, D. R.; SACHS, G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, p. G1048–G1058, 2000.
- ATUMA, C.; STRUGALA, V.; ALLEN, A., et al. The adherent gastric mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, p. G922–G929, 2001.
- BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, F.K. & BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **J Ethnopharmacol**. p, 335-338, 1999.
- BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L et al. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol. Research**, v 47, p 93-8, 2003.
- BAGCHI, D.; CARRYL, O. R.; TRAN, M. X.; KROHN, R. L.; BAGCHI, D.J.; GARG, A.; BAGCHI, M.; MITRA, S.; STOHS, S. J. Stress, diet and alcoholinduced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **J Appl Toxicol**, v. 18, p, 3-13, 1998.
- BAKER, R. D; COOK, C. O; GOODWIN, D. C. Properties of catalase-peroxidase lacking its C- terminal domain. **Biochemical and biophysical Research Communications**, v. 320, p. 833-839, 2004.
- BANDYOPADHAY, D.; BISMAS, K.; BHATTACHARYYA, M.; REITER, R.J.; BANERJEE, R. K. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. **Current Mol. Med**, v. 1, p. 501-513, 2001.

- BARKUN, A; LEONTIADIS, G. Systematic Review of the Symptom Burden, Quality of Life Impairment and Costs Associated with Peptic Ulcer Disease. **A. J. Medicine**, v. 123, p. 358- 366, 2010.
- BAROCELLI, E.; BALLABENI, V. Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review. **Pharmacol. Research**, v. 47, p. 299-304, 2003.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BARROS, D. **Fitomedicamentos na indústria brasileira**. Phytomédica, ano 1, v. 1. Disponível no endereço: http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf. Acesso em 24/11/2006.
- BHATTACHARYA, S; BANERJEE, D; BAURI A. K; CHATTOPADHYAY, S. BANDYOPADHYAY, S. K.. Healing property of the Piper betel phenol, allylpyrocatechol against indomethacin induced stomach ulceration and mechanism of action. **World J Gastroenterol**, v. 13, p. 3705-713, 2007.
- BATISTA, L.M., ALMEIDA, A.B.A., MAGRI, L.P., TOMA, W., CALVO, T.C., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A.R.M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biol. Pharm. Bull.**, v.27, p. 328-332, 2004.
- BAUMGARTNER, H. K.; MONTROSE, M. H. Regulated alkali secretion acts in tandem with unstirred layers to regulate mouse gastric surface pH. **Gastroenterology**, v. 126, p. 7747–7783, 2004.
- BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomed.**, v. 13, p. 584–590, 2006.
- BEGNAMI, M. D. F. S.; CUNHA, I. W.; MONTAGNINI, A.; NONOGAKI, S.; SOARES, F. Immunohistochemical expression of nitric oxide synthases in gastric adenocarcinomas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 40, n. 5, p. 351 -357, 2004.
- BENSSONG, P. O, OB, C. L; ANDREOLA, M. L; ROJAS, L. B; POUYSEGU, L, IGUMBOR, E et al. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrate. **J Ethnopharmacol**, v. 99, p. 83–91, 2005.
- BERSTAD, K.; BERSTAD, A. I infection in peptic ulcer disease. **Scand J Gastroenterol**, v.28, p. 561-567, 1993.

BHATIA, V.; TANDON, R .K. Stress and the gastrointestinal tract. **J. Gastroenterol. Hepatol**, v. 20, p. 332–339, 2005.

BHARTI, S.; WAHANE V.D.; KUMAR, V.L. Protective effect of Calotropis procera latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **J. Ethnopharmacol.** v. 127, p. 440–444, 2010.

BI, L. C.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense: na integrated protective response. *Current Opinion Gastroenterology*, v. 19, p. 526-532, 2003.

BILICI, D.; SULEYMAN, H.; BANOGLU, Z. N.; KIZILTUNC, A.; AVCI, B.; CIFTCIOGLU, A.; BILICI, S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. **Dig Dis Sci**, v. 47, p. 856-861, 2002.

BLAIR, I. A. Analysis of endogenous glutathione- adducts and theirs metabolits. **Biomed. Chromatogr**, v. 24, p. 29-38, 2010.

BONAMIGO, R.R.; LEITE C.S.M.; BAKOS L. Estudo sobre a associação entre *Helicobacter pylori* eurticária crônica idiopática. **Rev Ass Med Brasil**. V. 45, p. 9-14, 1999.

BORRELLI, F; IZZO, A .A.. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother Res.** v.14, p. 581-91, 2000.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **J. Thermal Biology**, v. 31, p. 208-216, 2006.

BRAGA, R.. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 2ª ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim. Nova**, v. 33, p. 229-239, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Medicamentos fitoterápicos. **Nota técnica do comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos a respeito do que foi veiculado sobre plantas medicinais e fitoterápicos na imprensa televisiva e escrita no último mês.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/206535804446b59789c29b703378b097/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+1+do+CNPMF_06+10+2010.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 10 jan 2011.

BREGONZIO, C., I. ARMANDO, H. ANDO, M. JEZOVA, G. BAIARDI, AND J. M. SAAVEDRA. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. **Am. J. Physiol.** v. 285, p. G414–G423, 2003.

BROZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; SLIWOWSKI, Z.; DROZDOWICZ, D.; ZACZEK, M.; KEDRA, D. Role of L-arginine, a substrate for nitric oxide-synthase, in gastroprotection and ulcer healing. **J Gastroenterol.**, v .32, n. 4, p. 442-52, 1997.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – Polish achievements. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.54, p.99-126, 2003.

CALAM, J.; BARON, J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **Brit Med J**, v. 323, p. 980-983, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, vol.55, no.3, p.37-39, 2003.

CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S.; BALLESTEROS, K. V.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAMASHIRI, J.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; TAKAHIRA, R. K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, p.451-459, 2007.

CASTRO, L.P.; COELHO, L. G. V.; VIEIRA, W.L.S.V.; RODRIGUES, M.A.G. Úlcera péptica Gastroduodenal. **Tratado clínica médica**. 2ª edição. São Paulo: Ed. Roca, 2009.

CHAABI, M.; BENAYACHE, S; BENAYACHE, F; N'GOM, S; KONÉ, M; ANTON, R; WENIGER, B; LOBSTEIN, A. Triterpenes and polyphenols from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae). **Biochem Syst Ecol** v. 36, 59–62, 2008.

CHAN, P.K.; HAYES, A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A.W. (ed.). Principles and methods of toxicology. 3. ed. **New York: Raven Press**, p. 579--647, 1994.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M. A.; SINGH, J. A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol-induced gastric ulcers. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.29, p. 173-180, 2002.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHECHINEL-FILHO, V., YUNES, R.A. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental. In **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**; Yunes, R.A., Calixto, J.B., Eds.; Argos Editora Universitária: Chapecó, Brazil, 2001.

CHEN, D.; AIHARA, T.; ZHAO, C.; HÅKANSON, R.; OKABE, S. Differentiation of the Gastric Mucosa I. 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**, p. 291, p. G539 G544, 2006.

CHENTER, L.; RODRIGUES-JÚNIOR, L. Úlcera Péptica. Em: MISZPUTEN, S. **J. Gastroenterologia**. 1ª ed. Editora Manole, Barueri, SP., p.49-64, 2002.

CHEESEMAN, K. H; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 481-493, 1993.

CHIOU, S. K.; TANIGAWA, T.; AKAHOSHI, T., et al. Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury. **Gastroenterology**, v. 128, p. 63–73, 2005.

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

CHOWDHURY, R; ISLAM, N. Ahydroxylated mansumbin-28-oic acid from *Combretum coccineum*. **Biochem Syst Ecol**, v. 32, p.443– 5, 2004.

CIRLA, A; MANN J. Combretastatins: from natural products to drugs discovery. **Nat Prod Rep**, v. 20, p. 558– 64, 2003.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; NORTELBOER, H.; ZANDER, J.; BLADERSEN, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141-52, 2001.

CONE, R. A.. Barrier properties of muçus. **Advanced Drug Delivery Reviews** 61 p. 75–85, 2009.

CONNER, E. M; GRISHAM, M. N. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, p. 274-277, 1996.

COPEMAN, M., et al. The gastroduodenal mucus barrier and its role in protection against luminal pepsins: the effect of 16,16 dimethyl prostaglandin E2, carbopolpolyacrylate, sucralfate and bismuth subsalicylate. **J. Gastroenterol. Hepatol.** v. 9 (Suppl 1) p. S55–S59, 1994.

CORSINO, J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S. P.; SUZELEI CASTRO FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**. v. 49, p. 2181-2183, 1998.

CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, A. S.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18 (Supl.), p. 739-743, 2008.

d' ACCAMPORA, J.A.; LIMA, D.A.N.; SOUSA, M.V.; AQUINO, A.C.; RUSSI, R. F.; VIEIRA., L, A. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perfurada atendidos no centro cirúrgico do Hospital de Florianópolis. **Rev Méd Resid**, v.10, p. 141-146, 2008.

DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato- Roundpã em ratos wistar. 225 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

DARLING, R. L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E. J.; AKUNDA, J. K.; LANGENBACH, R.; LICHTENBERGER, L. M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface

hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. **Gastroenterology**. p 127- 94–104, 2004.

DAS, D.; BANDYOPADHYAY D.; BHATTACHARJEE, M.; BANERJEE, R. K. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. **Free Radical Biol. Med.** v. 23, p. 8–18, 1997.

de ZWUART, L. L.; MEERMAN, J. H.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Bio Med** v. 26, p. 202-226, 1999.

DHARMANI, P.; CHAUHAN, S. V.; GAUTAM, P. Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in experimental chronic gastric ulcer healing. **Eur. J. Pharmacol**, v. 519, p, 277–284, 2005.

DINOSO, V. P; MING, S; MCNIFF, J. Ultrastructural changes of the canine gastric mucosa after topical application of graded concentrations of ethanol. **Am J Dig Dis**, v. 21, p. 626–632, 1976.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicinal Laboratorial**, v. 99, p. 343-350, 2003.

EBERHART, C.E., DUBOIS, R.N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, p. 285-301, 1995.

ELOFF, J. N; KATERERE, D. R; MCGAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **J Ethnopharmacol** v. 119, p. 686–699, 2008.

EICHLER, A.G. Combretaceae. In: C.F.P. MARTIUS; EICHLER, A.W.; I. URBAN (eds.). **Flora Brasiliensis**, v. 14, p. 77-128, 1867.

EXELL, A.W. The *Combretum* species of the new world. **Bot J Linnean Soc** . p, 130-141, 1953.

EVANGELISTA, S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. **Curr Pharm Des**, v.12, p. 2977–84, 2006.

FACUNDO, V. A; ANDRADE, C. H. S; SILVEIRA, E. R; BRAZ-FILHO R; HUFFORD, C. D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 411–415, 1993.

FALCÃO, H. S. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato etanólico bruto e fase clorofórmica obtidos das partes aéreas de *Praxelis clematidea* (Griseb.) R. M. King & H. Robinson em modelos animais. 2007, João Pessoa, 113 p. **Dissertação** (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

FAURE, P.; LAFOND, J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER A. E., **A. Free Rad in bio syst.** Boston: Verlag, p. 237-248, 1995.

- FÉRES, C. A. O.; MADALOSSO, R. C.; ROCHA, O. A.; LEITE, J. P. V.; GUIMARÃES, T. M. D. P.; TOLEDO, V. P. P.; TAGLIATI, C. A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphan dramollis* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology** 108:450–456, 2006.
- FÉRREA, G.; CANESSA, A.; SAMPIETRO, F.; CRUNIANI, M.; ROMUSSI, G.; BASSETTI, D.. In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. **Antiviral Research**. p, 317-325, 1993.
- FERREIRA A L. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. Tese de mestrado. UNICAMP, Campinas-SP, 2005.
- FERREIRA M. P.; NISHIJIMA, C. M, SEITO L. N.; DOKKEDAL, A. L, FERREIRA M. L.; DI STASI L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J Ethnopharmacol**, 2008.
- FILARETOVA, L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. **Autonomic Neurosc: Basic Clin**, v. 125, p. 86-93, 2006.
- FILARETOVA, L.; PODVIGINA, T.; BAGAEVA, T.; BOBRY SHEV, P.; TAKEUCHI, K. Gastroprotective Role of Glucocorticoid Hormones. **J.Pharmacol Sciences**, v. 104, p. 195-201, 2007.
- FORNAI, M.; NATALE, G.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 372, p. 79–87, 2005.
- FRANKE, A.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. **Digest Dis Sci**, v. 23, p. 204–213, 2005.
- FRY, C. Secretions of the salivary glands and stomach. **Basic Science**, v. 27, p. 503-506, 2009.
- FRIIS–HANSEN, L.; RIENECK, K.; NILSSON, H.; WADSTRÖM, T.; REHFELD, J. F. Gastric Inflammation, Metaplasia, and Tumor Development in Gastrin–Deficient Mice. **Gastroenterology**, v. 131, p. 246–258, 2006.
- FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTRÖM, C.A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzânia. **J Ethnopharmacol**. p. 169-177, 2002
- GIARAUD, A. S.; JACKSON, C.; MENHENNIOTT, T. R.; JUDD, L. M. Differentiating of the Gastric Mucosa IV. Role of trefoil peptides and IL-6 cytokine family signalling in gastric homeostasis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, p.G1–5, 2007.

GOA, K. L.; MONK, J. P. Emprostil: a preliminary review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of peptic ulcer disease. **Drugs**, v. 3, p. 539-559, 1987.

GOEL, R. K.; BHATTACHARYA, S. K. Gastroduodenal mucosal defence and mucosa protective agents. **In J Exp Bio**, v. 29, p. 701-714, 1991.

GONZALES, F. G., PORTELA, T. Y., STIPP, E. J; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifoliana*, *Sorocea bamplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **J Ethnopharmacol.** v. 77, p. 41-47, 2001.

GOO, T.; AKIBA, Y.; KAUNITZ, J. D. Mechanisms of Intra-gastric pH Sensing. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 12, p. 465-470, 2010.

GOWER, W.R.; PREMARATNE, S.; MCCUEN, R. W.; ARIMURA, A.; MCAFEE, Q; SCHUBERT, M. L. Gastric atrial natriuretic peptide regulates endocrine secretion in antrum and fundus of human and rat stomach. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** , v. 284, p.G638-G645, 2003a.

GOWER, W. R.; DIETZ, J. R.; MCCUEN, R. W.; FABRI, P. J.; LERNER, E. A.; Regulation of atrial natriuretic peptide secretion by cholinergic and PACAP neurons of the gastric antrum. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 284, p.G68-G74, 2003b.

GREGÓRIO, G. **Nova legislação de fitomedicamentos inclui plantas brasileiras.** *Phytomedica*, ano 1, v. 1. Acesso em 24/11/2006. Disponível no endereço:http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero_5.pdf.

GRIGGS, J; METCALFE, J. C; HESKETH, R. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. **Lancet Oncol**, v.2, p.82-7, 2001.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Disc Today: Technol**, v.2, n3, p. 281-286. 2005.

GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. **Dig Dis**, v. 5, p. 21-32, 1987.

GUPTA, M; MAZUMDER, U. K; MANIKANDAN, L; BHATTACHARYA, S; SENTHILKUMAR, G. P; SURESH, R. Anti-ulcer activity of ethanol extract of *Terminalia pallida* Brandis. in Swiss albino rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 405-408, 2005.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr.Rev.**, v. 55, p. S44-S49, 1997.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, p. 1179 -1180-1187. 2000.

HALTER, F.; TARNAWASKI, A. S.; SCHAMASSMANN.; PESKAR, B. M. Cyclooxygenase-2 expression on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issue and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443-453, 2001.

HAMAGUCHI, M.; WATANABE T.; HIGUCHI K.; TOMINAGA K.; FUJIWARA Y.; ARAKAWA, T. Mechanisms and roles of neutrophil infiltration in stress-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci**, v.46, p. 2708–2715, 2001

HASE, T.; MOSS, B. J. Microvascular changes of gastric mucosa in the development of stress ulcer in rats. **Gastroenterol**, v. 65, p. 224–228, 1973.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAWKEY, C. J; LANGMAN, M. J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors. **Gut**, v. 52, p. 600–608, 2003.

HAWKINS, C; HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. **J Pain Symp Manag**, v. 20, p. 140-151, 2000.

HENKEL, R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **As J Androl**, v. 13, p. 43–52, 2011.

HERNÁNDEZ, C.; SANTAMATILDE, E.; MCCREATH, K. J., et al. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. **Br J Pharmacol**, v. 156 p, 262–72, 2009.

HIARATA, T.; NAITO, Y.; HANDA, O., et al. Heat-shock protein 70-overexpressing gastric epithelial cells are resistant to indomethacin-induced apoptosis. **Digestion**, v. 79, p. 243–50, 2009.

HILLS, B. A.; BUTLER, B. D.; LICHTENBERGER, L. M. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. **Am J Physiol**, v. 244, p. G561–G568, 1983.

HOLZER, P. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Op Gastroenterol**, v. 16, p. 469–478, 2000.

HOLZER, B. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterol**, v. 114, p.823–39, 1998.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P. J. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers, and gastroesophageal reflux disease. In: Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (Eds.), **Pharmacol Basis of Ther**. Mc Graw Hill, New York, p. 967–981, 2006.

HOOGERWERF, W. A.; PASCHIDA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. Em: Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. New York:Mc Graw Hill, p. 757-768, 2005.

HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. *Current Op Gastroenterol*, v. 22, p. 593–598, 2006.

HRITZ, I.; HERSZENYI, L.; MOLNAR, B et al. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and epithelial growth factor receptor expression and has no effect on apoptosis and p53 expression. *World J Gastroenterol* V.11, P. 4721–6, 2005a.

HUTCHINGS, A; SCOTT, A. H; LEWIS, G; CUNNINGHAM, A.B. Zulu Medicinal Plants: An Inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburgl, 1996.

IMAI, H; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Bio Med*, v. 34, p. 145- 169, 2003.

IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water- for life. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*, v. 18, p. 3402-3405, 2003.

IWU, M. M. Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press, Florida, 1993.

JAESCHKE, H. Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *Am J Physiol*, v. 258, p. G499-G505, 1990.

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

JAINU, M; DEVI, C. S. S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *J Ethnopharmacol*, v. 104, p. 156–163, 2006.

JIA, YI-TAO.; WEI, WEI.; MA, BING.; XU, YU.; LIU, WEN-JUN.; WANG, YU.; LV KAI-YANG, TANG, HONG-TAI, WEI, DUO.; XIA, ZHAO-FAN. Activation of p38 mapk by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. *J Immunol*, v. 179, p. 7808-7819, 2007.

JIANG, PING.; CHANG, LIN.; PAN, CHUN-SHUI.; QI, YONG-FEN.; TANG, CHAO-SHU. Protective role of metallothionein in stress-induced gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol*, v. 18, 11p. 2739-2743, 2005.

JONES, M. K.; PADILLA, O. R.; WEBB, N. A.; NORNG, M. The anti-apoptosis protein, survivin, mediates gastric epithelial cell cytoprotection against ethanol-induced injury via activation of the p34(cdc2) cyclin-dependent kinase. *J Cell Physiol*, v. 215, p. 750–64, 2008.

JORDAN, N.; NEWTON, J.; PEARSON, J., et al. A novel method for the visualization of the in situ mucus layer in rat and man. *Clin Sci (Lond)*, v. 95, p. 97–106, 1998.

JORDÃO-JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M.M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Med.*, Ribeirão Preto, v.31, p.434-449, 1998

KAMADA, T.; SATO N.; KAWANO, S.; FUSAMOTO, H.; ABE, H. Gastric mucosal hemodynamics after thermal or head injury. **Gastroenterol**, v. 83, p. 535–540, 1982.

KATERERE, D. R, GRAY, A. I; NASH, R. J, WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochem.**, v. 63, p. 81–8, 2003.

KATO, S.; KITAMURA, M.; KOROLKIEWICZ, R. P.; TAKEUCHI, K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: effects of NO donors and NO synthase inhibitor. **Brit J Pharmacol**, v. 123, p. 839–846, 1998.

KATO, S.; AIHARA, E.; YOSHII, K., et al. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP receptor subtypes in the rat. **Am J Physiol**, v. 89, p. G64–G69, 2005.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 15, p. D1-D6, 2000.

KERSS, S.; ALLEN, A.; GARNER, A. A simple method for measuring thickness of the mucus gel layer adherent to rat, frog and human gastric mucosa: influence of feeding, prostaglandin, N-acetylcysteine and other agents. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 63 (2), p. 187–195, 1982.

KINOSHITA, M.; KUME, E.; TAMAKI, H. Roles of prostaglandins, nitric oxide and the capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection produced by ecabet sodium. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 275, p. 494–50, 1995.

KITAGAWA, H., FUJIWARA, M.; OSUMI, Y. Effect of water-immersion stress on gastric secretion and mucosal blood flow in rats. **Gastroenterol**, v. 77, p. 298–302, 1979.

KLOPPER, R.R.; CHATELAIN, C.; BÄNNINGER, V.; STEYN, H.M.; DE WET, B.C; ARNOLD, T.H.; GAUTIER, L.; SMITH, G.F.; SPICHIGER, R. Checklist of the flowering plants of Sub-Saharan Africa. An index of accepted names and synonyms. **S. African Biod Network Report** No. 42, SABONET, Pretoria, 2006.

KOCH, O.R.; PANI G.; BORRELLO S.; COLAVITTI, R.; CRAVERO, A.; FARR, S.; GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanolinduced cell injury. **Mol Asp Med**, v. 25, pg. 91–198, 2004.

KOBATA, A.; KOTANI, T.; KOMATSU, Y.; AMAGASE, K.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Dual Action of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Ischemia/Reperfusion-Induced Mucosal Injury in Mouse Stomach. **Digestion**, v. 75, p. 188-197, 2007.

KONTUREK, P. C. H.; DUDA, A.; BRZOZOWSKI, T. KONTUREK, S. J.; KWIECIEN, S.; DROZDOWICZ, D.; PAJDO, R.; MEIXNER, H.; HAHN, E. G. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1 β , tumor necrosis factor and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia – reperfusion gastric injury. **Scan J Gastroenterol**. v.35, p.452-463, 2000.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J Physiol Pharmacol**, v. 56(Suppl. 5), p. 5–31, 2005.

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

KONTUREK, J. S.; KONTUREK, P. C.; PAWLIK, T.; SLIWOWSKI, Z.; OCHMANSKI, W.; HAHN, E.G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. **J Physiol Pharmacol**, v. 55, p. 5-17, 2004.

KONTUREK, S. J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; nobel prize for achievements in gastrology during last century. **J Physiol Pharmacol**, v. 56, p. 507-530, 2005.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, J.W.; PLONKA, M.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M.; BRZOZOWSKI, T.; BIELANSKI, W. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. **J physiol pharmacol.**, v. 57, p. 29-50, 2006.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection – How, Why, When, and Where? Nitric oxide: **Bio Chem.**, v. 1, p. 107-120, 1997.

KULAKSIZ, H.; ARNOLD, R.; GÖKE, B.; MARONDE, E.; MEYER, M.; FAHRENHOLZ, F.; FORSSMANN, W. G.; EISSELE, R. Expression and cell-specific localization of the cholecystinin B/gastrin receptor in the human stomach. **Cell Tiss Research**, v. 299, p. 289–298, 2000.

KUSHIMA, H., HIRUMA-LIMA, C.A., SANTOS, M.A., VIANA, E., COELHO FERREIRA, M., SOUZA BRITO, A.R.M., Gastroprotective activity of *Pradosia huberi* on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulphhydryls and nitric oxide. **J. Ethnopharmacol.**, v.101, p.61-67, 2005.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; MARTIN CALERO, M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 45-53, 2000.

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

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

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arth Res.Ther.** Vol 10 Suppl 2. p, 1-6, 2008.

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões C.M.O. (Ed). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p.181-196, 1999.

LAPA, A. J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LIMA, T. C. M. *Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais*. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE). 74p, 2001.

LETCHER, R.M; NHAMO, L. R. M; Chemical constituents from the Combretaceae. Part I. Substituted phenanthrenes and 9,10-dihydrophenanthrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. **J Chem Soc C**, P.3070–3076, 1971.

LETCHER, R. M; NHAMO, L. R. M; Chemical constituents from the Combretaceae. Part IV. Phenanthrene derivatives from the heartwood of *Combretum hereroense*. **J Chem Soc.**, Perkin Transactions I, 1179–1191, 1973.

LETCHER, R. M; NHAMO, L. R. M; GUMIRO, I. T. Chemical constituents of the Combretaceae. Part II. Substituted phenanthrenes and 9,10-dihydrophenanthrenes and a substituted bibenzyl from the heartwood of *Combretum molle*. **J Chem Soc**, Perkin Transactions I, 206–210, 1972.

LEVINE, R.J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: Pfeiffer, C.J. (Ed.), **Peptic Ulcer**. **Munksgaard**, Copenhagen, p. 92-97, 1971.

LICHTENBERGER, L. M; WANG, Z. M; ROMERO, J. J; ULLOA, C; PEREZ, J. C; GIRAUD, M. N; BARRETO, J. C. Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastric intestinal injury. **Nat Med**, v. 2, p. 154–158, 1995.

LICHTENBERGER, L. M. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 15, p. 463–472, 1999.

LICHTENBERGER, L. M.; ZHOU, Y.; DIAL, E. J.; RAPHAEL, R. M. NSAID injury to the gastrointestinal tract: evidence that NSAIDs interact with phospholipids to weaken the hydrophobic surface barrier and induce the formation of unstable pores in membranes. **J Pharm Pharmacol**, v. 58 p. 1421–8, 2006.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiots. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, p. 315–37, 2006.

LIMA, I. O. Avaliação farmacológica do extrato metanólico bruto e da fase n-butanólica obtida da espécie *Herissantia crispa* (L.) Brizicky em modelos animais frente à atividade antiulcerogênica. 2008, João Pessoa, 114 p. **Dissertação** (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.

LINZ, B.; SCHUSTER, S.C. Genomic diversity in *Helicobacter* and related organisms. **Res Microbiol.**, v.158, p. 737-744, 2007.

LIRA, S. R. D; ALMEIDA, R. N; ALMEIDA, F. R. C; OLIVEIRA, F. S; DUARTE, J. C. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *C leprosum*. **Pharm Biol**, v. 40, p. 213–5, 2002.

- LIU, C.; CRAWFORD, J. M. O trato gastrointestinal. IN: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 17, p. 851 – 857, 2005.
- LIU, W.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; HARADA, N.; SOBEH, I.; IRIE, T. Role of neutrophil elastase in stress-induced gastric mucosal injury in rats. **J. Lab. Clin. Med.** v. 132, p. 432–439, 1998.
- LOIOLA, M.I.B. & SALES, M.F. Estudos taxonômicos do gênero *Combretum* Loefl. (Combretaceae R. Br.) em Pernambuco – Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** . p, 173-190, 1996.
- LOIOLA, M.I.B.; ROCHA, E.A; BARACHO, G.S; Agra, M.F. Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. **Act Bot Bras** 23(2): 330-342. 2009.
- LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Curr.Topics Cell. Regulation**. v. 36, pg.95-116, 2000.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; MARTINS, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LAPA, A. J.; VANDERLINDE, F. A.; *Phytochem. Pharmacol. II Ser. Recent Prog. Med. Plants*, v. 8, p. 460, 2002.
- MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer-recent mechanistic update. **Mol Cell Biochem**, v.253, p.329-338, 2003.
- MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J.. *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers. **Medicine**. 35, 204-209, 2007.
- MARIZE, C. V. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Rev Elet Farm**, v. 3, p. 93-98, 2006.
- MARLIÉRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEIN, C. H.; ACURCIO, F. A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18 (Supl., p. 754-760, 2008.
- MAROTTA, F; TAJIRI, H; SAFRAN, P; FESCE, E; IDEO, G. Ethanol-related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. **Digestion**, v. 60, p. 538–543, 1999.
- MARTIN, M. J.; JIMENEZ, M. D.; MOTILVA, V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. **Curr Pharm Design**, v. 7, p. 881-908, 2001.
- MARTIN, G. R.; WALLACE, J. L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp Biol Med**, v. 231, p. 130–7, 2006.
- MARTINI, N; KATERERE, D .R. P; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids isolated from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 207-212, 2004.

- MARQUETE, N. F. S; VALENTE, N. M. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, v. 56, p. 131-140, 2006.
- MASIKA, P. J; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **J Ethnopharmacol**, v.83, p.129– 34, 2002.
- MATSUDA, H., LI, Y., YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulphhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanolinduced gastric mucosal lesion in rats. **Life Sci.**, v.65, p.27-32, 1999.
- MAYER, E. A. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, p. 861-869, 2000.
- MCCORD, JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J of Med**, v. 108, p. 652-9, 2000.
- MCGAW, L. J; RABE, T; SPARG, S. G; JAGER, A. K; ELOFF, J. N; STADEN VAN, J. An investigation on the biological activity of Combretum species. **J Ethnopharmacol**, v.75:45 –50, 2001.
- MEGALA, J.; GEETHA, A. Free radical-scavenging and H⁺, K⁺-ATPase inhibition activities of *Pithecellobium dulce*. **Food Chemistry** , v. 121, p. 1120-1128, 2010.
- MENGUY, R.; DESBAILLETS, L.; MASTERS , Y. F. Mechanism of stress ulcer: influence of hypovolemic shock on energy metabolism in the gastric mucosa. **Gastroenterol.**, v. 66, p, 46–55, 1974.
- MEYER-HOFFERT, U.; HORNEF, M. W.; HENRIQUES-NORMARK B et al. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. **Gut**, v. 57, p. 764–71, 2008.
- MILLER, T. A.; LI, D.; KUO, Y. J.; SCHMIDT, K. L.; SHANBOUR, L. L. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE2 and ethanol. **Am J Physiol**, v. 249, p. G137-G144, 1985.
- MIZUI, T., DOUTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Jap. J. Pharmacol.**, v.33, p.934-945, 1983.
- MIZUSHIMA, T. Various stress proteins protect gastric mucosal cells against non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Inflammopharmacol**, v. 15, p. 67–73, 2007.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Brit J Pharmacol.**, v. 147, p. S193–S201, 2006.”
- MONTROSE MH, YASUTADA A, TAKEUCHI K, et al. Gastroduodenal mucosal defense. In: Johnson LR, ed. New York: Academic Press, p. 1259–1291, 2006.

MOTAWI, T. K; ABD ELGAWAD, H. M, SHAHIN, N. N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **J Biomed Sci**, v. 15, p. 405–412, 2008.

MORIMOTO, Y. SHIMOHARA, K., OSHIMA, S., SUKAYUKI, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesion and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine, **Japan. J. Pharmacol.**, v.57, p.495-505, 1991.

MOTA, K. S. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica de *Maytenus obtusifolia* Mart. (Celastraceae) em modelos animais. **Dissertação de mestrado**, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), UFPB, João Pessoa, 2009.

MOTA, K. S. L.; DIAS, G. E. N.; PINTO, M. E. F.; LUIZ-FERREIRA, A.; SOUZA-BRITO, A. R. M; HIRUMA-LIMA, C. A; BARBOSA-FILHO, J. M; BATISTA, L. M. Flavonoids with Gastroprotective Activity. **Molecules**. v. 14, 979-1012, 2009.

MURPHY, M. E.; KEHRER, J. P. Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. **Biochem J**, v. 260, p. 359-364, 1989.

MUSUMBA, C.; PRITCHARD, D. M.; PIRMOHAMED, M. Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 30, p. 517–531, 2009.

NABHA, S. M; WALL, N. R; MOHAMMED, R. M; PETTIT, G. R; AL-KATID, A. M. Effects of combretastatin A-4 prodrug against a panel of malignant human Blymphoid cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 11, p. 385– 92, 2000.

NAGY, L.; JOHNSON, B. R.; HAUSCHKA, P.; SZABO, S. Characterization of proteases and protease inhibitors in the rat stomach. **Am J Physiol**, v. 272, p. G1151-G1158, 1997.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrototoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. **W J Gastroenterol**, v. 13 (14), p. 2053-2060, 2007.

NAITO, Y; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in helicobacter pylori- induced inflammation and oxidative stress. **Free radical bio med**, v. 33, p. 323-336, 2002.

NAM, N. H. Combrestatin A-4 analogues as antimitotic antitumor agents. **Curr Med Chem**, v. 10, p. 1697– 722, 2003.

NEUWINGER, H. D. African Ethnobotany (Chemistry, Pharmacology, Toxicology). Chapman and Hall, Germany, 1996.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, I. Involvement of the xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric

mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **Digestion** v. 58, p. 340–351, 1997.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; ISHIGURO, I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **FEBS Lett.** v.425, p. 243–248, 1998.

NUNES, P. H. M., CAVALCANTI P. M. S., GALVÃO, S. M. P., MARTINS, M. C. C. 2009. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Pharmazie**, v. 64, p. 58–62.
ODASHIMA, M.; OTAKA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; MATSUHASHI, T.; HORIKAWA, Y.; HATAKEYAMA, N.; OYAKE, J.; OHBA, R.; LINDEN, J.; WATANABE, S. Selective adenosine A2A receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **J Gastroenterol Hepatol.**, v.20, p. 275-280, 2005.

The Organization of Economic Co-operation Development (OECD). The OECD Guideline for Testing of Chemical: 407 Repeated Dose Oral Toxicity - Rodent: 28-Day or 14-Day Study. **OECD**, Paris, p. 1–7, 2001.

OHNO, T.; HATTORI, Y.; KOMINE, R., et al. Roles of calcitonin gene-related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. **Gastroenterol**, v. 134, p. 215–25, 2008.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models - The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, n. 8, p. 1321-341, 2005.

OKAJIMA, K., MURAKAMI, K.; LIU, W.; UCHIBA, M. Inhibition of neutrophil activation by ranitidine contributes to prevent stress-induced gastric mucosal injury in rats. **Crit. Care Med**, v. 28, p. 2858–2865, 2000.

OLAJIDE, A. O; MAKINDE, J. M; OKPAKO, D. T; Evaluation of the anti-inflammatory property of the extract of *Combretum micranthum* G Don (Combretaceae). **Inflammopharmacol**, v. 11, p. 293–8, 2003.

OLIVER-BEVER, B. Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.

PAI, R.; SOREGHAN, B. A.; SZABO, I. L, et al. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nat Med**, v. 8, p. 289–93, 2002.

PAI, R.; SZABO, I.L.; GIAP, A.Q.; KAWANAKA, H.; TARNAWSKI, A.S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit re-epithelialization of wounded gastric monolayers by interfering with actin, Src, FAK, tensin signaling. **Life Sciences**, v. 69, p. 3055–3071, 2001.

PAN, JIN-SHUI.; HE, SHAO-ZHEN.; XU, HONG-ZHI.; ZHAN, XIAO-JUAN.; YANG, XIAO-NING.; XIAO, HONG-MIN.; SHI, HUA-XIU.; REN, JIAN-LIN. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **J Gastroenterol** 14(38). p. 5857-5867, 2008.

- PARE, W. P. A comparison of two ulcerogenic techniques. *Physiol. Behav.* v.44, p. 417–420, 1988.
- PASSOS, M. C. F. Infecção pelo *Helicobacter pylori*: prevalência e associação com lesões gástricas. **Arq Gastroenterol.** v. 44, 2007.
- PENISSI, A.; PIEZZI, R. Effect of dehydroelucidine on mucus production. A quantitative study. **Dig Dis Sciences**, v. 44, p. 708–712, 1999.
- PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. **Inflammopharmacol**, v. 13, p. 15–26, 2005.
- PETTIT, G. R; SINGH, S. B; NIVEN, M. L; SCHMIDT, J. M., HAMEL, E; LIN, C. M. Isolation, structure, synthesis, and antimitotic properties of combretastatins B-3 and B-4 from *Combretum caffrum*. **J Nat Prod**, v. 51, p. 517–527, 1988.
- PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNA, S. J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, p. G211–G219, 2002.
- POHLE, T.; BRZOZOWSKI, T.; BECKER, J. C.; VAN DER VOORT, I. R.; MARKMANN, A.; KONTUREK, S. J.; MONICZEWSKI, A.; DOMSCHKE, W.; KONTUREK, J. W. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 15, p. 677-687, 2001.
- PRUETT, S. B. Stress and the immune system. **Pathophysiol**, v. 9, p. 133-153, 2003.
- PUSCAS, I., PUSCAS, C., COLTAU, M., PASÇA, R., TORRES, J., MÁRQUEZ, M., HERRERO, E., FILLAT, O., ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v.47, p.568- 572, 1997.
- RAFFA, R.B., RAWLS, S.M., BEYZAROV, E.P. **Atlas de Farmacologia de Netter**. Artmed. Porto Alegre, Brasil, p.169-190, 2006.
- RAFFATULLAH, S.; TARIQ, M.; AL-YAHYA, M. A.; MOSSA, J. S.; AGEEL, A. M. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 29, p 25-34, 1990.
- RAINSFORD, K. D. The ever-emerging anti-inflammatories. Have there been any real advances? **J Physiol – Paris**, v. 95, p.11-19, 2001.
- RAMAKRISHNAN, K.; SALINAS, R. C. Peptic Ulcer Disease. **Am F Physic**. Volume 76, Número 7, 2007.
- RASTOGI, L.; PATNAIK, G. K.; DIKSHIT, M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacol Res.** v. 38, n. 2, p.125-132, 1998.

- RATES, S. M. K. Plants as source drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAZA, M.; AL-SHABANAH, O.A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. A effect of prolonged vigabratin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of swiss albino mice. **Sci Pharm**, v. 70, p. 135-145, 2002.
- REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Bra J Med Bio Res**, v. 35, p. 523–534, 2002.
- REPETTO, M.; MARIA, A.; GUZMAN, J.; GIORDANO, O.; LLESUY, S. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, p. 551-557, 2003.
- ROGERS, C.B. Isolation of the 1a-hydroxycycloartenoid mollic acid a-L-arabinoside from *Combretum edwardsii* leaves. **Phytochemistry**, v. 28, p. 279–281, 1989a.
- ROGERS, C. B. New mono- and bi-desmosidic triterpenoids isolated from *Combretum padoides* leaves. **J Nat Prod.**, v. 52, p 528–533, 1989b.
- ROGERS, C.B; VEROTTA, L. Chemistry and biological properties of the African Combretaceae. In: HOSTETTMAN, K; CHINYANGANGA, F; MAILLARD, M; WOLFENDER, J.-L. (Eds.), Chemistry, Biological and Pharmacological properties of African Medicinal Plants. **University of Zimbabwe Publications**, Harare, Zimbabwe, 1996.
- ROKUTAN, K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, p. D12–9, 2000.
- ROULEAU, A.; HERON, A.; COCHOIS, V., et al. Cloning and expression of the mouse histamine H₃ receptor: evidence for multiple isoforms. **J Neurochem**; v. 90, p. 1331–1338, 2004.
- ROVER, L; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.
- RUKKUMANI, R; ARUNA, K; VARNA, P. S; MENON, V. P. Influence of ferulic acido on circulatory prooxidant antioxidante status during alchool and PUFA induced toxicity. **J Physiol Pharmacol.**, v. 55, p. 551-561, 2004.
- SAAD, S .F.; AGHA, A. M.; AMRIN, AEL, N. Effect of bromazepam on stress-inducedgastric ulcer in rats and its relation to brain neurotransmitters. **Pharmacol. Res**, v. 44, p. 495–501, 2001.
- SANDZEN, B.; BLOM, H.; DAHLGREN, S. Gastric mucus gel layer thickness measured by direct light microscopy. An experimental study in the rat, **Scand. J. Gastroenterol.** v. 23, n .10, p. 1160–1164, 1988.
- SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.

- Flavonoids and ulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 1-6, 2005.
- SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterol.**, v.126, p.903-913. 2004.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; YESILADA, E. Tradicional medicine and gastroprotective crude drugs. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 61-66, 2005.
- SALASPURO, M. P. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. **Best Prac Res.**, v. 17, p. 679-694, 2003.
- SALIM, A. S. Sulfhydryl-containing agents: new approach to the problem of refractory peptic ulceration. **Pharmacol.**, v. 46, p. 281–288, 1993.
- SANTOS, V. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarréica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule de *Maytenus rigida* mart. (Celastraceae) em modelos animais. 2008, João Pessoa, 121 p. **Tese** (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.
- SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 20, p. 519–525, 2004.
- SCHUBERT M. L.; PEURA D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterol** . p, 1842–1860, 2008.
- SENAY, E. C.; LEVINE R. J.. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 124, p. 1221–1223, 1967.
- SEINO, H.; UEDA, H.; KOKAI, M.; TSUJI, N. M., KASHIWAMURA, S.; MORITA Y.; OKAMURA, H. IL-18 mediates the formation of stress-induced, histamindependent gastric lesion. **Am. J. Physiol.** v. 292, p, G262–G267, 2007.
- SEKIYAMA, A.; UEDA, H.; KASHIWAMURA, S.; SEKIYAMA, R.; TAKEDA, M.; ROKUTAN, K.; OKAMURA, H. A stress-induced, superoxide-mediated caspase-1 activation pathway causes plasma IL-18 upregulation. **Immunity**, v. 22, p.669–677, 2005.
- SHAY, H., KOMAROV, S.A., FELS, S.S., MERANZE, D., GRUENSTEIN, M., SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. **Gastroenterol.**, v.5, p.43-61, 1945.
- SHEEBA, M. S.; ASHA, V. V. Effect of *Cardiospermum halicacabum* on ethanol-induced gastric ulcers in rats. **J. Ethnopharmacol.** V. 106, p. 105–110, 2006.
- SHIAN, W. M.; SASAKI I.; KAMIYAMA, Y.; NAITO, H.; MATSUNO, S.; MIYAZAWA, T. The role of lipid peroxidation on gastric mucosal lesions induced by waterimmersion- restraint stress in rats. **Surg. Today**, v. 30, p. 49–53, 2000.

- SHIN, V. Y.; LIU, E. S. L.; KOO, M. W. L.; WANG, J. Y.; MATSUI, H.; CHO, C. H. Cigarette smoke extracts delay wound healing in the stomach: involvement of polyamine synthesis. **Exp Bio Med**, v. 227, p. 114-124, 2002.
- SIKIRIC, P.; SEIWERTH, S.; GRABAREVIC, Z.; et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. **Eur. J. Pharmacol.**, v.332, p.23-33, 1997.
- SILENE, W. Experimental models of gastric ulceration and injury. **Am. J. Physiol**, v. 255, p. G395–G402, 1988.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 618-626, 2008.
- SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S.S.; BARRETO, A. S.; QUITANS-JUNIOR, L. J. Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori* Revisão. **RBAC**. v. 39(1), p. 9-13, 2007.
- SLOMIANY, B. L; PIOTROWSKI, J; SLOMIANY, A. Induction of tumor necrosis factor-alpha and apoptosis in gastric mucosal injury by indometacin: effect of omeprazole and ebrotidine. **Scand J Gastroenterol**, v. 32, p. 638–642, 1997.
- SOUZA BRITO, A.R.M. **M Ens Toxicol .in vivo**. Ciências médicas. Campinas: Editora da Unicamp, p.15-22, 1994.
- STACE, C.A.,. **Flowering Plants of the Neotropics**. The New York Botanical Garden. Princenton University Press. United Kingdom, Combretaceae. p. 110-111, 2004.
- STARODUB, O. T.; DEMITRACK, E. S.; BAUMGARTNER, H. K.; MONTROSE M. H. Disruption of the Cox-1 gene slows repair of microscopic lesions in the mouse gastric epithelium. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 294, p. C223–32, 2008.
- STEVENS, K.R.; MYLECRAINE, L.; Issues in chronic toxicology. In: Hayes, A.W. (Ed.), Principles and Methods of Toxicology, 3rd ed. **Raven Press, New York**, p. 673, 1994.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. **Prog.Lipid Res.**, v. 39, n. 4, p. 289-314, 2000.
- SZELENYI, I., THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Arch. Toxicol.**, v.41, p.99-105, 1978.
- SZABO, S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional biochemical and histochemical studies. **Scan J Gastroenterol.**, v. 22, p. 21–28, 1987.

- SZABO, S.; NAGY, L.; PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clin Chim Acta**; v. 206, p. 95-105, 1992.
- SZABO, S.; PIHAN, G.; DUPUY, D. The biochemical pharmacology of sulfhydryl compounds in gastric mucosal injury and protection. In: Szabo S, Mózsik Gy, editors. *New Pharmacology of Ulcer Disease. Experimental and New Therapeutic Approaches*. New York: Elsevier, p. 24-436, 1987.
- SZABO, S.; VATTAY, P. Experimental gastric and duodenal ulcers. Advances in pathogenesis. **Gastroenterol**, Clinical North America, v. 19, p. 67–85, 1990.
- SZABO, S.; VINCZE, A. Growth factors in ulcer healing: Lessons from recent studies. **Journal of Physiology - Paris**, v. 94, p. 77-81, 2000.
- TAKEDA, M.; HAYASHI, Y.; YAMATO, M., et al. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. **J Physiol Pharmacol**, v. 55, p. 193–205, 2004.
- TAKEUCHI, K.; KOMOIKE, Y.; TAKEEDA, M., et al. Gastric mucosal ulcerogenic responses following barrier disruption in knockout mice lacking prostaglandin EP1 receptors. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 16, p. 74–82, 2002.
- TAKEUCHI, K.; UKAWA, H.; KATO, S., et al. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E receptor subtype EP3. **Gastroenterol**, v. 117, p.1128–1135, 1999.
- TANAKA, A.; HASE, S; MIYAZAWA, T; OHNO, R; TAKEUCHI, K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, p.1248– 1254, 2002.
- TANAKA, A.; HATAZAWA, R.; TAKAHIRA, Y.; IZUMI, N.; FILARETOVA, L.; TAKEUCHI, K. Preconditioning stress prevents cold restraint stress-induced gastric lesions in rats: Roles of COX-1, COX-2, and PLA2. **Dig Dis Sci**, v. 52, p. 478-487, 2007
- TARIQ, M.; KHAN, H.A.; ELFAKI, I.; ARSHADUDDIN, M.; MOUTAERY, M.; RAYES, H.; SWAILAM, R. Gastric antisecretory and antiulcer effects of simvastatin in rats. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, p. 2316-2323, 2007.
- TARNAWSKI, A.; STACHURA, J.; DURBIN, T., et al. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. **Gastroenterol**, v. 102, p. 695–8, 1992.
- TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig Dis Sci**, v. 50, p. S-24-S33, 2005.
- TATEMACHI, M.; OGURA, T.; SAKURAZAWA, N.; SUGITA, M.; ESUMI, H. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. **Int. J. Exp. Path.**, v. 84, p. 213 – 220, 2003.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicol**, v. 179, p. 183-196, 2002.

TODA, N., HERMAN, A.G. Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves. **Pharmacol. Rev.**, v.57, p.315-338, 2005.

TOMA, W., TRIGO, J.R., PAULA, A.C.B., SOUZA BRITO, A.R.M. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcers. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.82, p.319-325, 2004.

TOMISATO, W.; TSUTSUMI, S.; HOSHINO, T et al. Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. **Biochem Pharmacol**, v. 67, p. 575–85, 2004.

USTUN, O.; ELIK, B. O.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 108, p. 457–46, 2006.

VÄKEVÄINEN, S.; TILLONEN, J.; SALASPURO, M.; JOUSIMIES-SOMER, H.; NUUTINEN, H.; FÄRKILÄ, M. Hypochlorhydria induced by a proton pump inhibitor leads to intragastric microbial production of acetaldehyde from ethanol. **Aliment Pharmacol Ther.**,v. 14, p. 1511-1518, 2000.

VASCONCELOS, P.C.P.; KUSHIMA, H.; ANDREO, M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W.; TAKAHIRA, R.K.; PELLIZZON, C.H.; Studies of gastric mucosa regeneration and safety promoted by *Mouriri pusa* treatment in acetic acid ulcer model. **J Ethnopharmacol** 115:293–301, 2008.

VYAWAHARE, N. S.; DESHMUKH, V. V., GADKARI, M. R., KAGATHARA, V. G.. Plants with Antiulcer Activity. **Phcog Rev.** v. 3, p. 118-125, 2009

VUYYURU, L.; SCHUBERT, M. L.; HARRINGTON, L., et al. Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach. **Gastroenterol**, v.109, p. 1566—1574, 1995.

VUYYURU, L.; SCHUBERT, M. L. Histamine, acting via H3 receptors, inhibits somatostatin and stimulates acid secretion in isolated mouse stomach. **Gastroenterol**, v. 113, p. 1545—1552, 1997.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection a healing: current knowledge and future research **Amer. J. Med.** v. 110, p. 19S-23S, 1999.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. S. Nitric oxide in mucosal defense. A little goes a long-way. **Gastroenterol**, v. 119, p. 512-520, 2000.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W; REUTER, B. K; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterol**, v. 119, p. 706–714, 2000.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, G. W. The mucoid cap over superficial gastric damage in the rat. A high-pH microenvironment dissipate by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and endothelin. **Gastroenterol** 99: 295–304, 1990.

WALLACE, J. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **Am J Med** 110, p. 19S–22S, 2001.

WALLACE, J. L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; DUDAR, G. K. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. **Br J Pharmacol**, v. 148, p. 274–278, 2006.

WALLACE J. L; GRANGER D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **FASEB J**, v. 10, p. 731–40, 1996.

WALLACE J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev**, v.88, p. 1547–65, 2008.

WATANABE, T.; CHIBA, T. Pathogenesis of gastric and duodenal ulcer in the elderly. **Nippon Rinsho**, v. 60, p. 1515-1520, 2002.

WHITTLE, B. J. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indometacin in the rat. **Gastroenterol**, v. 80, p. 94–98, 1981.

WEHKAMP, J.; SCHAUBER, J.; STANGE, E. F. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 23, p. 32–8, 2007.

WOLFE, M. M.; SANCHS, G. Acid suppression: Optimizing therapy for gastrroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome. **Gastroenterol**, v. 118, p. s9-s31, 2000.

YAMAJI N, YOKOO Y, IWASHITA T. Structural determination of two active compounds that bind to the muscarinic M-3 receptor in beer. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 31, p.S9–S14, 2007.

YANG, Y. H, WU, W. K, TAI, E. K, et al. The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.318, p. 547–54. 2006

YAO, X.; FORTE, J. G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. Annual Review of Physiology, v.65, p.103-131, 2003.

YASUKAWA, K.; KASAZAKI, K.; HYODO, F.; UTSUMI, H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in rats with water immersion restraintinduced gastric lesions using in vivo electron spin resonance spectroscopy. **Free Radical Res**, v. 38, p. 147–155, 2004.

YOUNG, S. L; CHAPLIN, D. J. Combrestatin A-4 phosphate: background and current clinical status. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, p. 1171– 82, 2004.

YUAN, Y.; PADOL, I.T., AND HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nat.Clin.Pract.Gastroenterol.Hepatol.**, v. 3, p. 80-89, 2006.

ZHAO, W; ZHU, F; SHEN W; FU, A; ZHENG, L; YAN, Z; ZHAO, L; FU G. Protective effects of DIDS against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Acta Biochim Biophys Sin** , v. 41, p. 301, 2009.

ZHU, A.; KAUNITZ, J. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Gastroenterol Rep**, v.10, p.548–54, 2008.

ZIMMERNAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.

ZOPPI CC, ANTUNES-NETO J, CASTANHO FO, GOULART FO, MOTTA E MOURA N, VAZ DE MACEDO D. Alteração em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev Paul Edu Fis**, v. 17, p. 119-130 2003

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo utilizado na triagem farmacológica (ALMEIDA et al, 1999)

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30`	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípiá					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO

João Pessoa, 10 de abril de 2010

CEPA Nº. 0211/09

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

Departamento/Setor: LTF

Ref.: Avaliação da atividade antiulcerogênica e antiinflamatória do extrato etanólico bruto e das fases obtidas de *Combretum Duarceanum* Cambess. (Combretaceae)

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 200 camundongos e 255 ratos

Período: até março de 2011.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB