

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAQUEL CENACHI MADALOSSO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA
DE EXTRATOS DE *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. EM
ROEDORES**

Belo Horizonte – MG

2011

RAQUEL CENACHI MADALOSSO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA
DE EXTRATOS DE *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. EM
ROEDORES**

Dissertação, como requisito para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho – FAFAR/UFMG

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati – FAFAR/UFMG

Co-orientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho – FAFAR/UFMG

Belo Horizonte – MG

2011

M178a Madalosso, Raquel Cenachi..
Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores / Raquel Cenachi Madalosso. – 2011.
116f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati.

Co-Orientadora: Dra. Rachel Oliveira Castilho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Campomanesia lineatifolia* – Teses. 2. Myrtaceae – Teses. 3. Estômago – Úlceras – Teses. 4. Úlcera gástrica – Teses. 5. Toxicidade – Teses. 6. Extratos vegetais – Teses. 7. Efeito gastroprotetor – Teses. I. Coelho, Márcio de Matos. II. Tagliati, Carlos Alberto. III. Castilho, Rachel Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.321

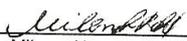
FOLHA DE APROVAÇÃO

RAQUEL CENACHI MADALOSSO

"Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dra. Milene Alvarenga Rachid - UFMG



Prof. Dr. Renes de Resende Machado - UFMG



Prof. Dra. Rachel Oliveira Castilho - UFMG



Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati - UFMG



Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho - UFMG

Belo Horizonte, 28 de abril de 2011

Dedico essa dissertação às
comunidades brasileiras cujo
conhecimento tradicional
inspirou este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Alberto Tagliati pela oportunidade, pela orientação, pelo exemplo, pelo incentivo, pela compreensão e pelo apoio em todos os momentos e situações, que possibilitaram a conclusão dessa Dissertação.

À Profa. Rachel Oliveira Castilho pelo fornecimento dos extratos, pela credibilidade depositada no meu trabalho e pela motivação que trouxe o projeto da *Campomanesia lineatifolia* para o meu caminho.

Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliarí pela imprescindível ajuda e pelos ensinamentos relacionados às análises histomorfométricas, pela confiança e disponibilidade que o fez muito mais do que um simples colaborador.

Ao Prof. Márcio de Matos Coelho pelas sugestões, correções e por ser tão receptivo aos meus comentários e dúvidas.

À veterinária Adelaide pelos ensinamentos relacionados ao trato dos animais. Ao Batista pela dedicação e presteza.

À bibliotecária Simone e aos funcionários de biblioteca da Faculdade de Farmácia pelo auxílio com as pesquisas bibliográficas.

Ao Danilo pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Andréa pelos conselhos, pela ajuda e companhia.

Aos estagiários do laboratório de toxicologia, em especial à Georgiane, à Júlia e ao Marlon, cujo trabalho e dedicação foram essenciais para a realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Protozooses e de técnicas Histológicas pela ajuda e companhia e por serem tão receptivos.

Aos animais experimentais cuja vida não foi em vão.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos meus pais e à minha irmã pelo amor, pelo incentivo e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao Anderson pelo amor, pelo apoio e pela compreensão.

Aos amigos que me incentivaram e acreditaram em meu potencial.

A todas as Deusas e Deuses que me inspiraram e possibilitaram que eu encontrasse dentro de mim a verdadeira vontade, amor e sabedoria para vivenciar essa experiência.

“Ideias são como blocos. Organizadas adequadamente e com a devida paciência, pode-se construir palácios, labirintos, templos e até mundos.”

Silasafey

RESUMO

A *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. (Myrtaceae), conhecida popularmente como gabioba, é uma espécie originária da região amazônica utilizada na medicina tradicional para tratamento de distúrbios gastrintestinais. Em estudos anteriores, o extrato etanólico (EEC) e a fração acetato de etila (FAEC) apresentaram atividade antioxidante *in vitro* e seu perfil fitoquímico foi determinado, indicando a presença de flavonoides e taninos, sendo catequina e quercitrina identificados e isolados. Porém, ainda não existem estudos que comprovem a segurança e atividade farmacológica *in vivo* dessa espécie. No presente estudo, a toxicidade aguda e a atividade gastroprotetora de EEC e FAEC foram avaliadas. O estudo de toxicidade oral aguda foi realizado conforme o método de classes com dose inicial de 2000 mg/kg (OECD423). O efeito gastroprotetor induzido por EEC ou FAEC foi investigado em ratos com lesões gástricas induzidas por etanol (5 mL/kg, *p.o.*) nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (*p.o.*); e, em ratos, com lesões gástricas induzidas por indometacina (40 mg/kg, *p.o.*) nas doses de 400, 800 ou 1200 mg/kg (*p.o.*). As zonas hemorrágicas e regiões de necrose foram quantificadas por análise morfométrica. O conteúdo de muco foi estimado utilizando a coloração ácido periódico de Schiff. EEC e FAEC foram considerados seguros no ensaio de toxicidade aguda. Os extratos diminuíram significativamente a área de lesão em ambos os modelos avaliados de maneira dose-dependente, o que demonstra sua atividade gastroprotetora em relação aos fármacos de referência, sucralfato e cimetidina. A melhor resposta da FAEC, no modelo do etanol, e do EEC, no modelo da indometacina, sugerem que mais de um modo de ação podem estar envolvidos. FAEC 400 mg/kg reverteu, de forma significativa, a depleção dos níveis de muco gástrico induzida por etanol. EEC e FAEC exercem efeito protetor, provavelmente, por mecanismos que envolvem o aumento da defesa da mucosa gástrica. Os resultados contribuem para a validação dos dados etnofarmacológicos de *C. lineatifolia*.

Palavras-chave: *Campomanesia lineatifolia*, Myrtaceae, úlcera gástrica, toxicidade aguda, gastroprotetor, muco gástrico.

ABSTRACT

The *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. (Myrtaceae), popularly known as gabioba, is a native species of the Amazon region used in traditional medicine for treating gastrointestinal disorders. In previous studies, the ethanolic extract (EEC) and ethyl acetate fraction (EAFC) showed *in vitro* antioxidant activity and the phytochemical profile revealed the presence of tannins and flavonoids. Catechin and quercitrin were also isolated and identified. However, there are no studies providing safety and pharmacological *in vivo* data for this species. In the present study, the acute toxicity and gastroprotective activity of EEC and EAFC were evaluated. The acute oral toxicity study was performed according to the method of classes with starting dose of 2000 mg/kg (OECD 423). The gastroprotective activity of EEC or EAFC was investigated in rats with ethanol (5 mL/kg, *p.o.*) induced gastric lesion at doses of 100, 200 or 400 mg/kg (*p.o.*) and in rats with indomethacin (40 mg/kg, *p.o.*) induced acute gastric lesion, at doses of 400, 800 or 1200 mg/kg (*p.o.*) The hemorrhagic zones and regions of necrosis were assessed by using morphometric analysis. The mucus content was estimated by using periodic acid of Schiff stain. EEC and EAFC were found to be safe in acute toxicity test. The extracts significantly decrease lesion area in both models in a dose dependent-manner, which demonstrates their gastroprotective activity as compared to standard drugs sucralfate and cimetidine. The better response of EAFC, in ethanol model, and of EEC, in indomethacin model, suggest that more than one mode of action may be involved. EAFC 400 mg/kg significantly replenished the ethanol-induced depleted levels of gastric mucus. EEC and EAFC gastroprotective activity is possibly mediated through enhance of gastric mucosal defense mechanisms. The results contribute to the validation of the ethnopharmacological data of *C. lineatifolia*.

Keywords: *Campomanesia lineatifolia*, Myrtaceae, acute toxicity, gastric ulcer, gastroprotective, gastric mucus

LISTA DE FIGURAS

1	<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz & Pav.....	20
2	Estrutura química de substâncias que podem ser encontradas em espécies do gênero <i>Campomanesia</i>.....	23
3	Estômago e glândulas gástricas.....	24
4	Modelo ilustrando a regulação da secreção ácida neural, parácrina e hormonal.....	26
5	Patogênese celular e molecular de úlceras induzidas por AINE.....	33
6	Procedimento para execução do teste de toxicidade aguda oral pelo método de classes com a dose inicial de 2000 mg/kg.....	49
7	Ganho de massa corporal de ratas após sete dias no teste de toxicidade aguda.....	58
8	Variação da massa corporal de ratas durante catorze dias no teste de toxicidade aguda.....	58
9	Consumo de água por ratas durante catorze dias no teste de toxicidade aguda.....	59
10	Consumo de ração por ratas durante catorze dias no teste de toxicidade aguda.....	59
11	Avaliação da massa do fígado, baço e rins (g/200g animal) de ratas após catorze dias, no teste de toxicidade aguda.....	60
12	Avaliação da massa do coração, pulmões, estômago e cérebro (g/200g animal) de ratas após catorze dias, no teste de toxicidade aguda.....	61
13	Aspecto macroscópico dos estômagos dos ratos. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por etanol.....	63
14	Área de zonas hemorrágicas (mm²) em estômago de ratos submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração <i>p.o.</i> de EEC e FAEC nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle).....	64
15	Área de zonas hemorrágicas (mm²) em estômago de ratos submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração <i>p.o.</i> de EEC e FAEC na dose de 200 mg/kg, em dose única diária ou por três dias consecutivos, antecedendo a indução das lesões.....	65

16	Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando região de necrose. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por etanol.....	66
17	Área de necrose (μm^2) na mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de lesões por etanol, após administração <i>p.o.</i> de EEC e FAEC nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle).....	67
18	Área de mucosa gástrica (μm^2) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões por etanol, após administração <i>p.o.</i> de EEC e FAEC (400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle).....	67
19	Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando o efeito sobre o muco gástrico, corado pelo PAS. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por etanol.....	69
20	Índice de muco (I.M.) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração <i>p.o.</i> de EEC (200 mg/kg), FAEC (400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle).....	70
21	Índice de muco (I.M.) de ratos submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração <i>p.o.</i> de EEC ou FAEC nas dose de 100, 200 ou 400 mg/kg ou veículo (controle).....	70
22	Distribuição da coloração PAS+ nas fatias 1 e 4 da mucosa gástrica de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões por etanol, após administração <i>p.o.</i> de FAEC na dose 400 mg/kg.....	71
23	Aspecto macroscópico dos estômagos dos ratos. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i>.....	72
24	Área de zonas hemorrágicas (mm^2) na mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de lesões por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i>, após administração <i>p.o.</i> de EEC ou FAEC nas doses de 400, 800 ou 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle).....	73
25	Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando região de necrose. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i>.....	75

26	Área de necrose (μm^2) na mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de lesões por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i> após administração <i>p.o.</i> de EEC ou FAEC nas doses de 400, 800 ou 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle).....	76
27	Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando o efeito sobre o muco gástrico corado pelo PAS. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i>.....	77
28	Índice de muco (I.M.) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões gástricas por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i> após administração <i>p.o.</i> de EEC ou FAEC na dose de 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle).....	78
29	Área de mucosa gástrica (μm^2) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões gástricas por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i> após administração <i>p.o.</i> de EEC e FAEC na dose de 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle).....	78
30	Curva dose-resposta de EEC e FAEC em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos. Doses: 100, 200 ou 400 mg/kg.....	79
31	Curva dose-resposta de EEC e FAEC em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i> em ratos. Doses: 400, 800 ou 1200 mg/kg.....	80
32	Porcentagem de proteção gástrica (%) em ratos submetidos à indução de lesões por etanol e indometacina 40 mg/kg <i>p.o.</i>, após <i>p.o.</i> de EEC ou FAEC nas doses de 100 mg/kg ou 400 mg/kg.....	81

LISTA DE TABELAS

1	Atividade biológica de espécies do gênero <i>Campomanesia</i>.....	21
2	Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Campomanesia</i>.....	22
3	Sinais observados no teste de toxicidade aguda oral (dose única) de EEC e FAEC em ratas	57
4	Efeitos induzidos pela administração <i>per os</i> de EEC e FAEC (100, 200 ou 400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) sobre o volume, pH e áreas de lesões gástricas (zonas hemorrágicas) induzidas por etanol absoluto.....	64
5	Efeitos da administração <i>per os</i> de EEC e FAEC (400, 800 ou 1200 mg/kg), sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) sobre o pH e áreas de lesões gástricas (zonas hemorrágicas) induzidas por indometacina (40 mg/kg).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMC	Carboximetilcelulose
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
CSE	Cistationa-γ-liase
DL ₅₀	Dose letal 50
EC	Célula enterocromafim
ECE-1	Enzima conversora de endotelina 1
ECL	Célula do tipo enterocromafim
EEC	Extrato etanólico de <i>Campomanesia lineatifolia</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAEC	Fração acetato de etila do extrato de <i>Campomanesia lineatifolia</i>
FSM	Fluxo sanguíneo da mucosa
HCl	Ácido clorídrico
HSP-72	Proteína de choque térmico 72
GHS	<i>Globally Harmonised System</i> (Sistema Global Harmonizado)
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GSH	Glutathione
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IBP	Inibidor de bomba de próton
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
I.M.	Índice de muco
<i>i.v.</i>	Via intravenosa
MT	Melatonina
NO	Óxido Nítrico
ODC	Ornitina descarboxilase
OECD	<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACAP	Peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PF	Ponto de fusão
PG	Prostaglandina
PGE ₁	Prostaglandina E ₁

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
<i>p.o.</i>	<i>per os , gavage</i>
p/V	Relação peso por volume
RL	Radical livre
SINETOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SP	Proteína de estresse
SST	Somatostatina
SUS	Sistema Único de Saúde
TFF	Fator trefoil de baixa massa molecular da família de peptídeos
TGF- α	Fator de crescimento-alfa
TGI	Trato gastrintesninal
UP	Úlcera péptica
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 A família Myrtaceae	18
2.2 O gênero <i>Campomanesia</i>	19
2.3 Anatomia funcional do estômago	24
2.4 Mecanismos da secreção ácida	25
2.5 Úlcera péptica	28
2.6 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica e citoproteção	29
2.7 Lesão da mucosa gástrica induzida por AINES	31
2.8 Lesão da mucosa gástrica induzida por etanol	34
2.9 Farmacoterapia	35
<u>2.9.1 Antiácidos</u>	35
<u>2.9.2 Antagonistas de receptor H₂</u>	36
<u>2.9.3 Inibidores de bomba de prótons (IBPs)</u>	36
<u>2.9.4 Misoprostol</u>	37
<u>2.9.5 Sucralfato</u>	38
<u>2.9.6 Erradicação da <i>Helicobacter pylori</i></u>	38
<u>2.9.7 Medicina tradicional</u>	39
2.10 Toxicidade de drogas vegetais e fitoterápicos	40
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Material Vegetal	45
4.2 Drogas e reagentes	46
4.3 Animais	46
4.4 Toxicidade aguda	47

<u>4.4.1 Tratamento e desenho experimental</u>	47
4.5 Atividade farmacológica	50
<u>4.5.1 Tratamento e desenho experimental</u>	50
<u>4.5.2 Modelo de lesões gástricas induzidas por etanol</u>	51
<u>4.5.3 Modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina</u>	52
4.6 Volume e pH gástricos	52
4.7 Avaliação macroscópica das lesões gástricas	53
4.8 Análise histopatológica e morfométrica	53
<u>4.8.1 Análise quantitativa das zonas de necrose superficiais (erosões) e úlceras na mucosa gástrica</u>	54
<u>4.8.2 Análise quantitativa da área de muco gástrico</u>	54
4.9 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Toxicidade aguda	56
5.2 Modelo de lesões gástricas induzidas por etanol	61
5.3 Modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina	71
5.4 Análise comparativa entre modelos	79
6 DISCUSSÃO	82
6.1 Toxicidade aguda	82
6.2 Atividade farmacológica	84
7 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICE A	110
APÊNDICE B	112
APÊNDICE D	113
APÊNDICE E	114
APÊNDICE F	115
ANEXO A	116

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, as condições patológicas do trato gastrintestinal (TGI) como gastrite, úlcera péptica, refluxo gastroesofágico, síndrome do intestino irritado e colite têm provocado grande impacto nas questões envolvendo saúde pública. Isto se deve principalmente às mudanças do modo de vida das populações como condições de estresse emocional, dieta inadequada, além do aumento do consumo de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e outros medicamentos, cujos efeitos adversos incluem sinais e sintomas gastrintestinais, tais como dispepsia, dor abdominal, náusea, sangramentos gastrintestinais, ulcerações, vômitos e diarreia (LAINE *et al.*, 2008; WALLACE e FERRAZ, 2010).

Diversos estudos publicados recentemente têm como objetivo melhorar a compreensão da etiologia dessas condições patológicas, bem como a busca de novos agentes bioativos e tratamentos que possam trazer benefícios, menor risco e melhor acesso aos pacientes (SCHUBERT e PEURA, 2008; DUDEJA *et al.*, 2009; MUSUMBA *et al.*, 2009; MICHELFELDER *et al.*, 2010; SULEYMAN *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a pesquisa de plantas medicinais e produtos naturais têm fundamental importância (ITOKAWA *et al.*, 2008; ZAMORA *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2009; BHARTI *et al.*, 2010). Estima-se que 25% dos fármacos prescritos em todo mundo sejam oriundas de plantas utilizadas na medicina tradicional. Do total de 252 fármacos contidos na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal (SAHOO *et al.*, 2010).

Além disso, o mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos, não somente pela aceitabilidade cultural, como também pela comprovação científica de eficácia e segurança de algumas espécies vegetais. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos Estados Unidos e US\$ 8,5 bilhões na Europa (PINTO *et al.*, 2002). Já no Brasil, o faturamento do segmento de fitoterápicos, no período de novembro de 2003 a outubro de 2006, foi cerca de R\$ 1,8 bilhões e também vem crescendo (FREITAS, 2007). O interesse das indústrias farmacêutica e cosmética pode ainda ser demonstrado pela concessão e licenciamento de patentes, em vários países,

compreendendo formulações composições e usos terapêuticos de extratos vegetais (BANERJEE *et al.*; ESPOSITO *et al.*; KIM; WANG *et al.*).

No Brasil, inúmeras espécies de plantas medicinais vêm sendo utilizadas por décadas pelas populações com base no conhecimento tradicional. No entanto, as informações obtidas por farmacovigilância e toxicovigilância ainda são restritas (BRASIL, 2010). Como forma de aperfeiçoar o marco regulatório, inserido no contexto da cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos, a legislação sanitária brasileira que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos foi recentemente atualizada, sendo publicada na forma de Resolução de RDC nº. 14/2010, permitindo o acompanhamento do desenvolvimento científico e tecnológico, e possibilitando a ampliação do acesso da população aos medicamentos (BRASIL, 2010). Além disso, os esforços governamentais para a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b), entre outras políticas públicas, tais como a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006b) e o Programa Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2008) refletem o incentivo que é dado à pesquisa do potencial terapêutico da flora brasileira.

Existem registros do uso tradicional do gênero *Campomanesia* para problemas associados ao TGI há mais de 50 anos (PIO CORRÊA, 1952 *apud* DICKEL *et al.*, 2007). No entanto, ainda são poucos os estudos na literatura em que foram avaliadas a segurança e atividade biológica, especialmente da espécie *Campomanesia lineatifolia*.

Portanto, a avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* em roedores, contribui para que os dados etnofarmacológicos possam ser validados e a planta e seus derivados possam, por sua vez, serem incluídos como uma alternativa terapêutica segura e eficaz no tratamento da úlcera gástrica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A família Myrtaceae

A família Myrtaceae compreende em torno de 140 gêneros e mais de 3.000 espécies, o que a posiciona como a maior família de Myrtales. As espécies dessa família têm folhas simples, com glândulas oleíferas, flores polistêmones, ovário mediano a ínfero, floema interno e pontuações ornamentadas nos vasos do xilema (GOMES *et al.*, 2009).

Representada por aproximadamente 1.000 espécies, Myrtaceae é uma das famílias mais importantes do Brasil destacando-se, com mais de uma centena de espécies, os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calypttranthes*, enquanto o restante dos gêneros possui menos de 60 espécies brasileiras (LANDRUM e KAWASAKI, 1997).

Entre as mirtáceas brasileiras, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente, como a *Psidium guajava* (goiabeira), a *Myrciaria cauliflora* (jabuticabeira) e a *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) (GRESSLER *et al.*, 2006). Também há espécies de importância medicinal cujas atividades biológicas incluem: antioxidativa (*Eugenia caryophyllata*, *Eugenia involucrata*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Psidium cattleianum*) (HALDER *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2008), antimicrobiana (*Eugenia jambolana*, *Syzygium aromaticum*) (JASMINE *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2010), hipoglicemiante (*Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia jambolana*) (BIAVATTI *et al.*, 2004; HARI *et al.*, 2010), anti-inflamatória e antinociceptiva (*Eugenia discifera*, *Eugenia candolleana*) (MARIDASS, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2009), bem como imunomodulatória (*Syzygium aromaticum*) (CARRASCO *et al.*, 2009) e hepatoprotetora (*Eugenia jambolana*) (SISODIA e BHATNAGAR, 2009).

Infelizmente, algumas espécies dessa família estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia ou se tenha qualquer estudo de seu perfil fitoquímico ou eficácia farmacológica (GRESSLER *et al.*, 2006).

2.2 O gênero *Campomanesia*

O gênero *Campomanesia Ruiz & Pav.* compreende aproximadamente 80 espécies das quais 11 são frutíferas. A *Campomanesia lineatifolia Ruiz & Pav.* (**Figura 1**) é originária da região oeste da Amazônia e sua distribuição geográfica compreende o estado brasileiro do Amazonas, leste da Colômbia e Peru, parte da Bolívia amazônica além de regiões não inundadas de clima quente e úmido e solos argilosos pouco drenados, podendo ser também encontrada nos vales interandinos (D'EECKENBRUGGE e FERLA, 2000).

A *C. lineatifolia* é uma espécie arbórea que pode atingir de 8 a 10 metros de altura. É conhecida popularmente como gabioba, gavioba, champa, palillo, guayaba de leche ou guayaba de mono. O nome gabioba, em guarani, significa “árvore com casca ácida”. Os frutos são comestíveis e bastante apreciados, sendo utilizados no preparo de doces, sucos e licores (D'EECKENBRUGGE e FERLA, 2000). Outras espécies do gênero *Campomanesia* são nativas da região sudeste e sul brasileira, do Uruguai e Argentina (*Campomanesia xanthocarpa* e *C. reticulata*) e do bioma brasileiro conhecido por Cerrado (*Campomanesia adamantium* e *C. pubescens*), apresentando como principal diferença o tamanho (LORENZI *et al.*, 2006).

As folhas e cascas do caule de *Campomanesia ssp.* são utilizadas na medicina tradicional como decocto ou infuso para tratamento de distúrbios gastrintestinais como diarreia e dores estomacais, segundo Pio Corrêa (1952 *apud* DICKEL *et al.*, 2007) e Cravo (1994 *apud* MARKMAN *et al.*, 2004); para regulação do fluxo intestinal e tratamento de uretrites e cistites, segundo D'Avila (1910 *apud* DICKEL *et al.*, 2007) e desordens hepáticas, segundo Moraes (1881 *apud* Dickel *et al.*, 2007). Também é relatado seu uso popular para controle da glicemia, colesterol e como adjuvante no tratamento de obesidade (DICKEL *et al.*, 2007).

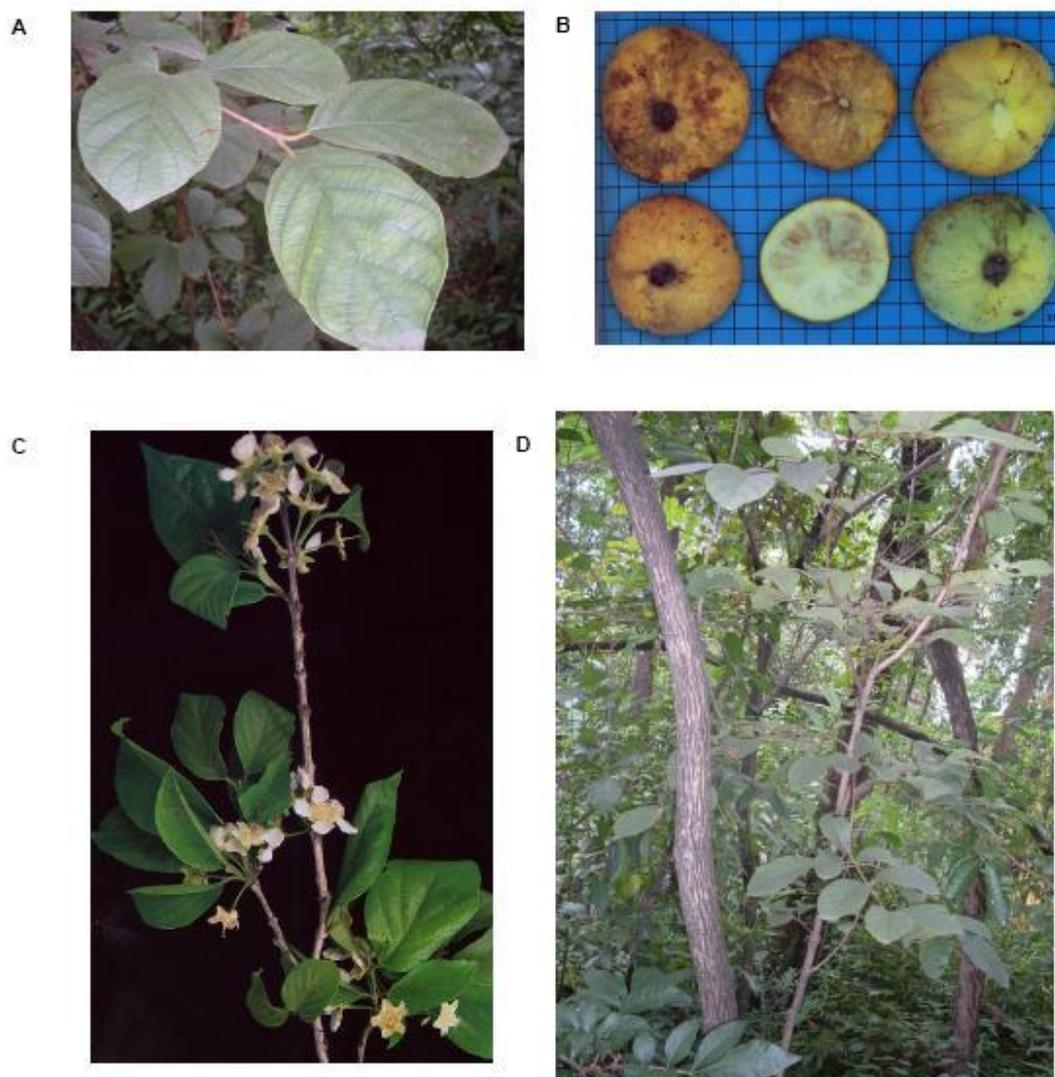


Figura 1 - *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav.: A) Folhas; B) Frutos; C) Flores; D) tronco e folhas. Fonte: (LORENZI, 2006; BARBOSA, 2009)

Recentemente, foram publicados estudos com espécies do gênero *Campomanesia* indicando diferentes atividades biológicas (**Tabela 1**) que são atribuídas, principalmente, à presença de metabólitos especiais, como terpenos, flavonoides, champanonas, taninos e saponinas. Várias dessas substâncias já foram identificadas e isoladas (**Tabela 2, Figura 2**). Os flavonoides são derivados de fenilcromonas que pertencem a um vasto grupo de componentes amplamente distribuídos nas plantas vasculares. Além de suas propriedades antioxidantes, há evidências de que essas substâncias podem afetar diversas funções biológicas como a permeabilidade capilar, processos secretórios envolvidos na resposta

inflamatória e a atividade de enzimas, receptores ou carreadores (NOROOZI *et al.*, 1998; HODEK *et al.*, 2002; MOTA *et al.*, 2009).

TABELA 1 - Atividade biológica de espécies do gênero *Campomanesia*

Espécie	Atividade biológica e toxicidade	Material vegetal	Referência
<i>C. xanthocarpa</i>	Antiulcerogênica em ratos Toxicidade aguda com ratos indicando segurança nas doses testadas	Extrato hidroalcolico (folhas)	(MARKMAN <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. xanthocarpa</i>	Redução do colesterol total (TC) e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos Antioxidante e inibitória da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase <i>in vitro</i> .	Extrato seco (folhas)	(KTAJKE <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. xanthocarpa</i>	Redução do ganho de massa corporal e redução da glicemia em ratos submetidos à dieta hipercalórica.	Extrato aquoso (folhas)	(BIAVATTI <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. adamantium</i>	Atividade anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Extrato (frutos) – fração acetato de etila	(PAVAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i>	Antioxidante e antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	Óleo essencial	(COUTINHO <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. pubescens</i>	Antioxidante Toxicidade aguda com microcrustáceo indicando segurança nas doses testadas	Extrato hexânico (folhas)	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. pubescens</i> <i>C. adamantium</i>	Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida albicans</i>	Extrato hexânico (frutos)	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. lineatifolia</i>	Antioxidante	Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas)	(BARBOSA, 2009)

TABELA 2 – Substâncias isoladas de espécies do gênero *Campomanesia*

Espécie	Substâncias identificadas e/ou isoladas	Técnica	Material vegetal	Referência
<i>C. lineatifolia</i>	Champanonas A,B,C.	UV, RMN IV	Extrato metanólico (sementes)	(BONILLA <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. lineatifolia</i>	Componentes voláteis terpenoides, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, C13-norisoprenoides, Compostos furânicos β -tricetonas e champanonas(150 compostos)	CG CG-EM	Extrato pentano: diclorometano(1:1) (fruto, sementes, folhas)	(OSORIO <i>et al.</i> , 2006)
<i>C. lineatifolia</i>	Quercitrina, catequina, flavonoides, taninos	CLAE UV, RMN	Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas)	(BARBOSA, 2009)
<i>C. xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas, taninos	CCD	Extrato hidroalcolico (folhas)	(MARKMAN <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas, taninos	CCD	Extrato seco (folhas)	(KTAFKE <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. xanthocarpa</i> , <i>C. guazumifolia</i> <i>C. pubescens</i>	Quercitrina, miricetina 3-O-raminoglicosídeo, miricetina, rutina.	CLAE	Extrato (folhas)	(SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995)
<i>C. adamantium</i>	Flavanonas e chalconas (6 compostos)	CLAE-DAD-UV	Extrato (frutos) – fração acetato de etila	(PAVAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i>	Monoterpenos (limoneno, α -pineno and β -pineno e sesquiterpenos (biciclogermacreno e globulol)	CG-EM	Óleo essencial	(COUTINHO <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. pubescens</i>	Sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados (23 compostos) e β -sitosterol	CG-EM	Extrato hexânico (folhas)	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2008)

Nota: CCD: cromatografia em camada delgada; CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência, DAD: detector de arranjo de diodos; IV: espectrofotometria no infravermelho; RMN: ressonância Magnética nuclear UV: espectrofotometria no ultravioleta.

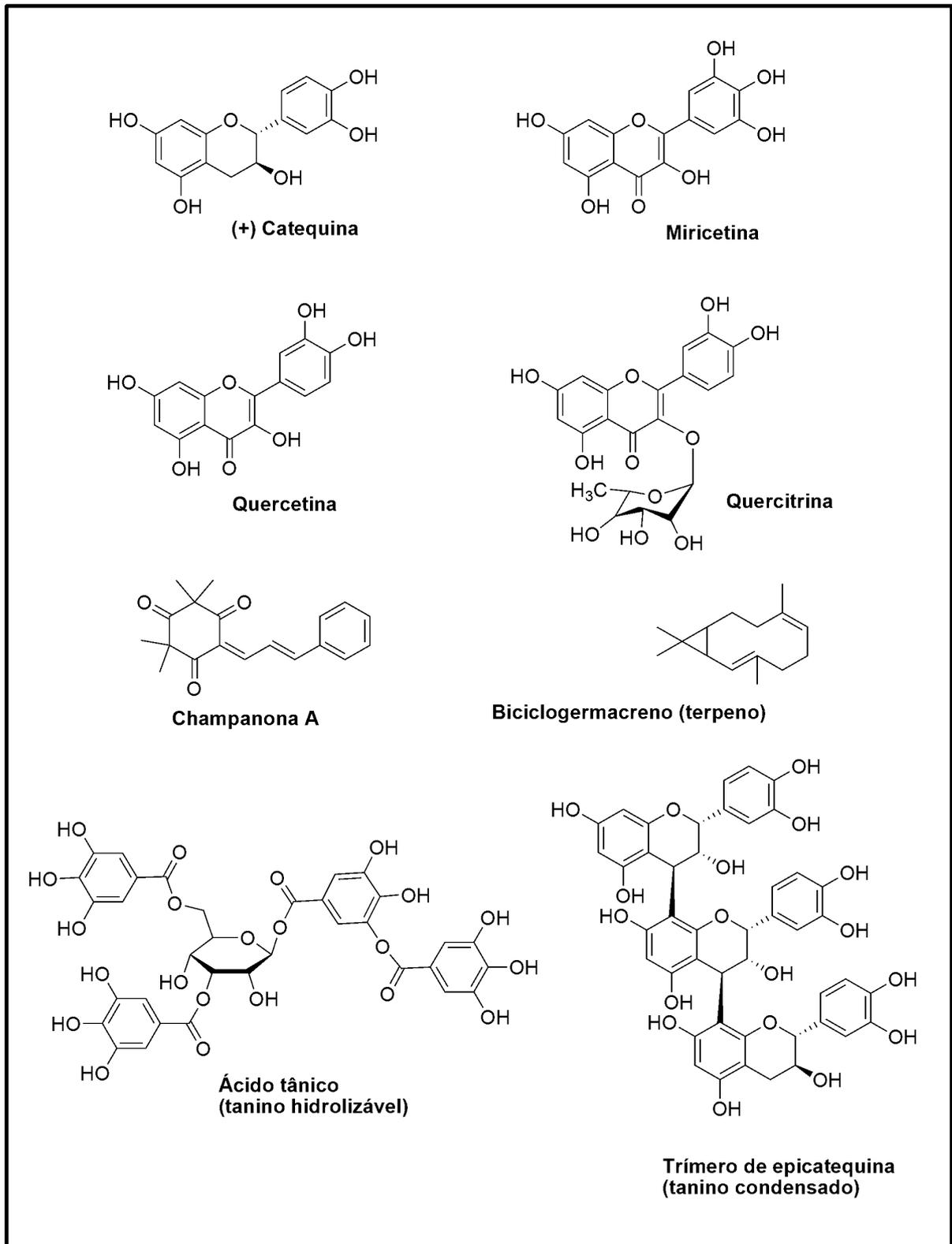


Figura 2 – Estrutura química de substâncias que podem ser encontradas em espécies do gênero *Campomanesia*. Substâncias flavonoídicas: catequina, miricetina, quercetina e quercitrina (glicosídeo). Fonte: DEWICK, 2002; BONILLA *et al.*, 2005; COUTINHO *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2009 (adaptado).

2.3 Anatomia funcional do estômago

Anatomicamente, o estômago humano pode ser dividido nas regiões cárdica, corpo, fundo e antropilórica. No que se refere à histologia gástrica, podem ser observadas várias camadas concêntricas de tecido: a mucosa, que recobre o lúmen estomacal; uma fina camada de músculo liso, conhecida como muscular da mucosa; a submucosa, que consiste em tecido conjuntivo e vasos sanguíneos; a túnica muscular, composta várias camadas de músculo liso e a serosa, que faz o limite do estômago com a cavidade peritonial (**Figura 3**) (JOHNSON *et al.*, 2006).

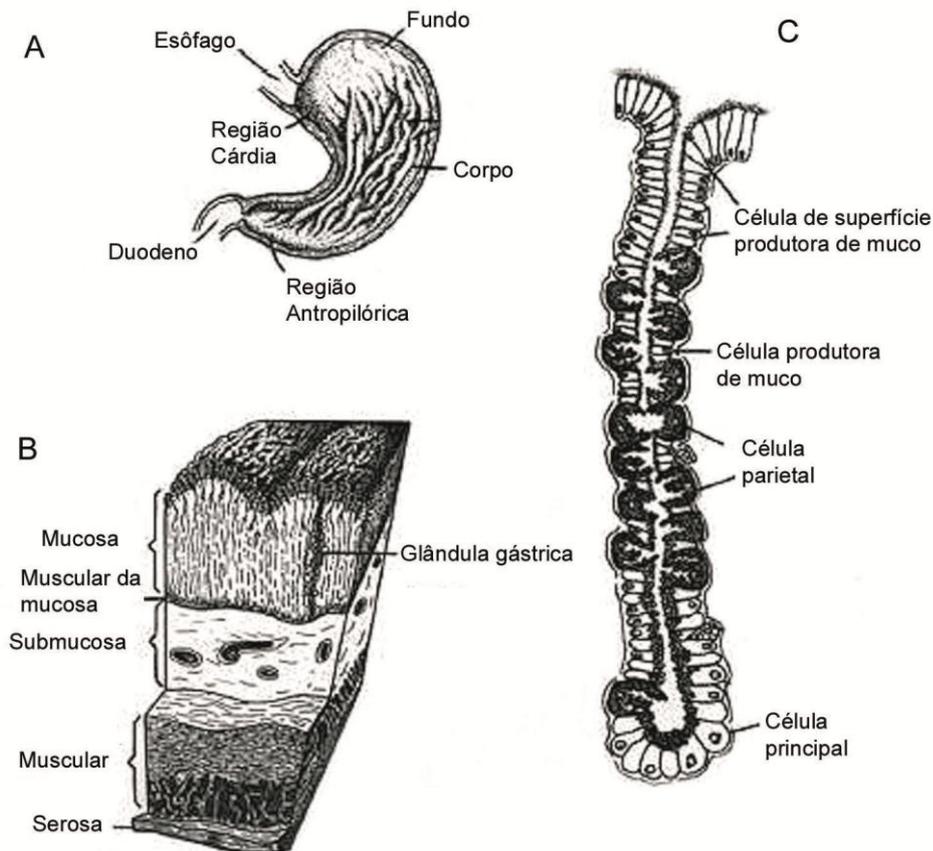


Figura 3 – Estômago e glândulas gástricas. A) As regiões anatômicas do estômago são indicadas. A densidade de células parietais e a secreção ácida geralmente predominam no corpo, mas existem variações entre espécies; B) Um corte da parede gástrica indicando as glândulas gástricas na mucosa e várias camadas de tecido; C) Esquema da glândula gástrica indicando alguns tipos celulares presentes no epitélio gástrico. Fonte: JOHNSON *et al.*, 2006 (adaptado).

A mucosa gástrica é composta de diversas células epiteliais que compõem o empacotamento denso das glândulas tubulares. Do ponto de vista funcional, identificam-se três regiões distintas de mucosa: a região cárdica, situada logo abaixo da transição esôfago-gástrica; a região oxíntica (75 a 85% da superfície do estômago); e a região antro-pilórica (15 a 25%). Na mucosa cárdica são encontradas, principalmente, células que produzem muco e lisozima (enzima que destrói a parede de bactérias). A mucosa oxíntica é a mais extensa, abrangendo o corpo e o fundo. As glândulas oxínticas são caracterizadas pela presença de células parietais, produtoras de ácido clorídrico (HCl); células principais ou zimogênicas, produtoras de pepsinogênio; células D, produtoras de somatostatina e células do tipo enterocromafins (ECL), produtoras de histamina. A superfície luminal é também recoberta por uma camada de células produtoras de muco e bicarbonato que exercem função protetora da superfície quanto à exposição direta do ácido. As glândulas da mucosa pilórica se caracterizam pela presença de células G, produtoras de gastrina, além de apresentarem os mesmos tipos celulares das glândulas oxínticas, porém sem a presença de células parietais e principais (DANI e CASTRO, 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As células epiteliais gástricas estão em constante estado de renovação. Há uma população de pequenas células tronco pluripotentes que representam as células progenitoras para todo o epitélio gástrico. Em um estudo de incorporação de ^3H -timidina em estômago de camundongo, Karam e Leblond (1995) estimaram o tempo médio de renovação celular. Nesse estudo, foi observado que as células epiteliais da superfície têm um tempo de vida relativamente curto, de aproximadamente três dias, devido à exposição luminal. Já as células parietais apresentaram tempo de renovação de 71 dias.

2.4 Mecanismos da secreção ácida

A secreção ácida é um processo fisiológico importante, pois induz a ativação do pepsinogênio na digestão, além de garantir um ambiente intragástrico estável, eliminando bactérias e outros microrganismos (JAIN *et al.*, 2007).

A secreção ácida está sob um complexo sistema de controle regulado de maneira hormonal e neural e parácrina (age na célula vizinha) que pode ser ilustrado conforme a **Figura 4** (SCHUBERT e PEURA, 2008).

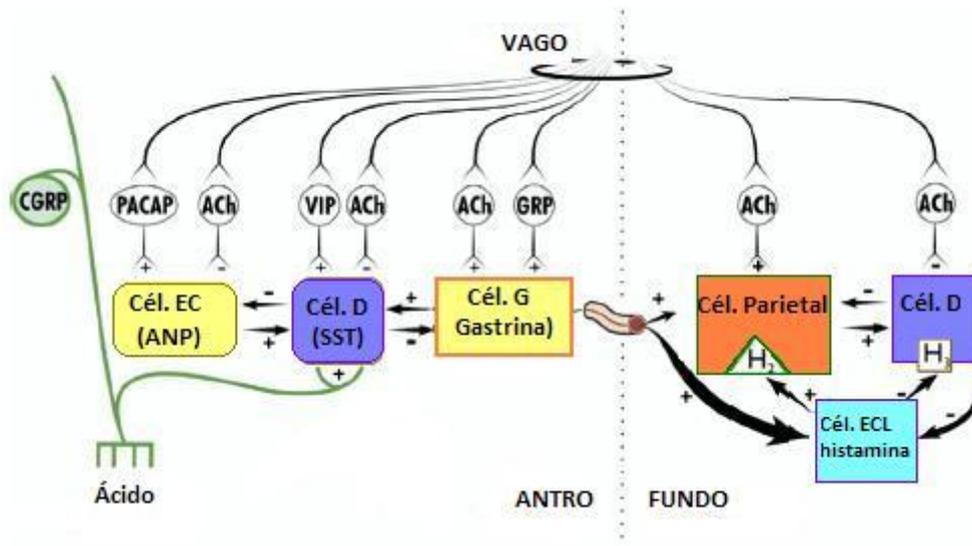


Figura 4 – Modelo ilustrando a regulação da secreção ácida neural, parácrina e hormonal. Fonte: SCHUBERT E PEURA, 2008 (adaptado).

Sinais sensoriais como o paladar, o cheiro, sensação ou visualização dos alimentos ativam neurônios do sistema nervoso central (SNC). Os impulsos gerados são transmitidos, via nervo vago, a neurônios intramurais gástricos sendo três tipos não colinérgicos: peptídeo liberador de gastrina (GRP), também conhecida como bombesina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitárias (PACAP); e um neurônio do tipo colinérgico, para o qual é atribuída a liberação de acetilcolina (ACh). A ACh exerce estimulação direta na secreção ácida ao atuar em receptores muscarínicos (tipo M₃) localizados na membrana basolateral das células parietais. Além disso, a estimulação parassimpática resulta na liberação de histamina por células ECL, localizadas no fundo gástrico. A histamina se liga a receptores H₂ presentes na célula parietal, induzindo a liberação do ácido. Já sua ligação em receptores H₃, acoplados em células D, inibe a secreção de somatostatina (SST), aumentando de maneira indireta a secreção ácida.

A ACh também estimula a liberação de gastrina por células G localizadas no antro pilórico. Esse hormônio atinge posteriormente a circulação sanguínea e estimula a secreção ácida ao se ligar a receptores de gastrina localizados na célula parietal. A gastrina também tem ação indireta ao estimular a liberação de histamina partir de células ECL (JAIN *et al.*, 2007; SCHUBERT e PEURA, 2008).

A distensão local do estômago com a chegada de alimentos ativa reflexos parassimpáticos que têm um efeito estimulatório direto nas glândulas gástricas. As concentrações celulares aumentadas de Ca^{2+} , por gastrina/ACh, e de AMPc, por histamina, convergem para a última etapa da secreção ácida mediada pela H^+/K^+ -ATPase, presente na célula parietal, também conhecida como bomba de prótons.

Com o esvaziamento gástrico, a presença de aminoácidos provenientes da digestão e de íons H^+ na luz intestinal inibe a secreção ácida por três ações simultâneas. Primeiramente, impulsos nervosos são gerados de maneira a reduzir a estimulação parassimpática nas glândulas gástricas. Em seguida, iniciam-se reflexos locais que, ao serem produzidos por neurônios da mucosa do intestino, diminuem a secreção ácida. Por último, ocorre o restabelecimento da secreção de SST produzida por células D, localizadas no fundo e antro. A SST é a principal substância inibitória da secreção ácida e seu efeito é estabelecido por meio de um mecanismo parácrino (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Várias substâncias endógenas e exógenas podem atuar na atividade gástrica interferindo em uma ou mais vias. Enquanto gastrina, grelina, fator de crescimento-alfa ($\text{TGF-}\alpha$), PACAP e VIP, estimulam a secreção de histamina, SST, prostaglandinas, peptídeo YY e galanina inibem sua secreção. Enquanto ACh, GRP, secretina, agonistas β_2/β_3 adrenérgicos e cálcio estimulam a secreção de gastrina, SST, galanina e adenosina inibem sua secreção.

2.5 Úlcera péptica

A úlcera péptica (UP) é uma classificação ampla que compreende as úlceras gástricas e duodenais e pode ser caracterizada clinicamente pela presença de uma ou mais lesões erosivas na mucosa do TGI em consequências da digestão ácido-péptica dos tecidos (BOGLIOLO, 2006; MALFERTHEINER *et al.*, 2009). É uma doença de origem multifatorial que atinge um considerável número de pessoas em todo o mundo e cujos fatores etiológicos incluem estresse emocional, dieta inadequada, fatores genéticos e, principalmente, uso contínuo ou indiscriminado de AINEs e infecção por *Helicobacter pylori* (JAIN *et al.*, 2007; MUSUMBA *et al.*, 2009).

Estima-se que aproximadamente 10% da população do mundo ocidental tenha, ou venha a ter, pelo menos, um episódio de UP em algum momento de sua vida. Os indivíduos acometidos podem apresentar uma variedade de sintomas como dispepsia, dor epigástrica, desconforto abdominal, vômitos e sintomas de refluxo. Além disso, a UP é a causa mais comum de condições mais complicadas, como a hemorragia e a úlcera perfurativa que, por sua vez, está associada com alta mortalidade e morbidade (BARKUN e LEONTIADIS, 2010).

Barkun e Leontiadis (2010) realizaram um estudo sistemático de artigos publicados em bases referenciais no período de 1966 a 2007 relativos à UP. Quanto à avaliação da qualidade de vida, os pacientes com a doença apresentaram valores significativamente mais baixos que a população geral, medida pelo índice psicológico geral de bem estar ($p < 0,05$; sete estudos) e questionários ($p < 0,05$; 2 estudos). Os custos diretos do tratamento da UP foram de 163 a 866 dólares por paciente, por ano. Já os custos anuais do tratamento da úlcera hemorrágica, que envolvem internação e medicação, foram bem mais altos, 1883 a 25.444 dólares por paciente (estimativas baseadas em valores médios nacionais provenientes de vários países). Além disso, existem os custos indiretos, que envolvem a perda de dias trabalhados e de produtividade no trabalho. Um estudo realizado na Suécia revelou que o total dos custos indiretos associados à UP e à dispepsia foi de 251 a 351 milhões de dólares, no ano de 1997 (BARKUN e LEONTIADIS, 2010).

Nas últimas décadas, observa-se o aumento do uso de fármacos que podem ter como efeito adverso maior incidência de UP como AINEs, agentes antiplaquetários em doses baixas (ex: ácido acetilsalicílico) e inibidores seletivos de recaptação de serotonina. Outro agravante é que o risco associado à doença pode ser particularmente relevante em pacientes com idade avançada (> 65 anos) e com histórico de complicações no TGI, dentre outros fatores de risco, como o tabagismo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas (MALFERTHEINER *et al.*, 2009; BARKUN e LEONTIADIS, 2010).

2.6 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica e citoproteção

Leões na mucosa gástrica podem ocorrer quando fatores nocivos prevalecem aos mecanismos de defesa que mantêm a mucosa gástrica intacta ou quando esses mecanismos estão debilitados (SIVRI, 2004; MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

O primeiro mecanismo de defesa local da mucosa gástrica é uma barreira que recobre toda a sua superfície, formada de uma camada de gel de muco, bicarbonato e fosfolípides surfactantes (LAINE *et al.*, 2008). O muco gástrico é composto de aproximadamente 95% de água e 5% de glicoproteínas, denominadas mucinas (REPETTO e LLESUY, 2002). Devido à sua aderência e estabilidade, é capaz de reter o bicarbonato secretado pelas células epiteliais superficiais do estômago e duodeno, mantendo um microambiente neutro (pH~7,0) que previne a penetração de pepsina e a digestão proteolítica. Estimulam a produção do muco os hormônios gastrintestinais gastrina e secretina, a prostaglandina E₂ (PGE₂) e agentes colinérgicos (LAINE *et al.*, 2008). Outro elemento importante é o fator trefoil de baixa massa molecular da família de peptídeos (TFF), que é cosecretado com o gel de muco. Essa substância integra as vesículas secretoras de muco e participa da assimilação intracelular e/ou empacotamento das mucinas (NEWTON *et al.*, 2000).

Depois da camada de muco, a próxima linha de defesa da mucosa é constituída pela camada contínua de células epiteliais. Essas células são de natureza hidrofóbica devido à presença de fosfolípides. Além disso, são intimamente interligadas por junções, o que permite a formação de uma barreira de defesa. As células epiteliais

secretam muco, bicarbonato, prostaglandinas (PGs), TFFs e proteínas de choque térmico. As últimas são geradas em resposta ao estresse, como aumento de temperatura, estresse oxidativo e agentes citotóxicos. Elas previnem a desnaturação proteica e o dano celular. Com isso, as TFFs regulam a reepitelização e exercem efeito protetor (LAINE *et al.*, 2008).

Outra característica que contribui para a manutenção da integridade da mucosa gástrica é o fato das células progenitoras estarem em contínua renovação. A proliferação dessas células é controlada por fatores de crescimento. O principal receptor de fator de crescimento expresso pelas células progenitoras gástricas é o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) (LAINE *et al.*, 2008).

A microcirculação gástrica é essencial para a liberação de oxigênio e nutrientes e remoção de agentes tóxicos. Os microvasos das células epiteliais geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), que protegem a mucosa de lesões e se opõem ao dano causado por vasoconstritores como leucotrieno C₄, tromboxano A₂ e endotelina. A PGI₂ e o NO mantêm a viabilidade das células endoteliais e previnem a aderência de plaquetas e leucócitos que poderiam comprometer a microcirculação gástrica. O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é outro composto endógeno que exerce efeito protetor da mucosa similar ao NO, o qual reduz a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), diminui a aderência de leucócitos e inibe lesões induzidas por AINEs (LAINE *et al.*, 2008).

A contínua produção de PGE₂ e PGI₂ é crucial para a manutenção da integridade da mucosa gástrica frente a agentes ulcerogênicos e necrotizantes. Praticamente todos os mecanismos de defesa da mucosa são estimulados ou facilitados por PGs. As PGs inibem secreção de ácido, estimulam secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, aumentam a circulação sanguínea e a restituição do epitélio, além de inibirem a ativação de mastócitos e aderência de leucócitos e plaquetas ao epitélio vascular. (WALLACE, 2008; LAINE *et al.*, 2008).

Além de fatores locais, a defesa da mucosa gástrica ainda é regulada, pelo menos em parte, pelo SNC e fatores hormonais. Mecanismos centrais contribuem para as alterações induzidas por estresse na motilidade do trato gastrointestinal e na função

da mucosa. A ativação de receptores centrais opioides diminui a motilidade e aumenta a defesa da mucosa gástrica (GYIRES *et al.*, 2001; HERMAN *et al.*, 2010). Também podem atuar como gastroprotetores os esteroides adrenais produzidos na resposta hormonal ao estresse (FILARETOVA *et al.*, 1998).

2.7 Lesão da mucosa gástrica induzida por AINEs

Uma das principais preocupações clínicas com relação à utilização de AINEs é a indução de efeitos adversos no TGI. Segundo estudos observacionais, o risco de complicações no TGI superior é aproximadamente quatro vezes maior em usuários de AINEs quando comparado a pacientes que não fizeram uso dessa classe de medicamentos (HERNANDEZ-DIAZ e RODRIGUEZ, 2002). A análise dos resultados de quatro estudos prospectivos em pacientes com artrite que faziam uso de AINEs tradicionais revelou incidência anual de efeitos adversos relacionados ao TGI de 2,7% a 4,5% (SILVERSTEIN e GEIS, 1996; BOMBARDIER *et al.*, 2000; SILVERSTEIN *et al.*, 2000; SCHNITZER *et al.*, 2004).

Os AINEs provocam lesões na mucosa gástrica por diversos mecanismos que se encontram resumidos na **Figura 5**. O efeito local direto pode ser atribuído à exposição local após administração oral e também, de maneira secundária, à excreção biliar no TGI. Os efeitos sistêmicos são manifestados após a passagem por todas as vias de absorção, oral, intravenosa, retal, entre outras (MUSUMBA *et al.*, 2009).

Apesar da lipossolubilidade e o grau de ionização dos AINEs ácidos contribuir para sua toxicidade no TGI, foi sugerido que o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial e inibição da cadeia transportadora de elétrons podem ser eventos patogênicos iniciais do efeito tóxico local direto dessa classe de medicamentos (KHAZAEINIA e JAMALI, 2004). A depleção de ATP e o aumento do Ca^{2+} intracelular resultam na formação de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, interagem com fosfolípidos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos levando ao dano ou disfunção celular. Esses eventos podem afetar as cascatas de sinalização que levam a apoptose ou necrose, dando início a processo de morte celular (MUSUMBA *et al.*, 2009).

Tomisato *et al.* (2001) demonstraram indução de apoptose ou necrose induzida por AINEs em cultura de células primárias de mucosa gástrica de porcos-da-índia dependendo das condições de tratamento. Tratamento curto com alta concentração de AINE e tratamento longo com menores concentrações induziram necrose e apoptose, respectivamente.

Os efeitos sistêmicos podem ser produzidos por mecanismos dependentes de PGs (por meio de inibição de enzimas cicloxigenase, COX-1 e COX-2) ou mecanismos independentes dessas (ex.: inibição de NO, H₂S e poliaminas). A manutenção da integridade da mucosa gástrica depende da contínua produção de PGE₂ e PGI₂ ao nível basal (MUSUMBA *et al.*, 2009). Diversos estudos suportam a teoria que tanto COX-1 como COX-2 estão envolvidas na manutenção da integridade da mucosa gástrica, pois em situações onde a síntese de PGs por COX-1 está diminuída, a COX-2 tem sua expressão aumentada na tentativa de suprir essa deficiência (TAKEUCHI *et al.*, 2001; KATO *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2002).

Sugere-se que a hipermotilidade gástrica, mediada por inibição de COX-1, possa reduzir a amplitude de contração microvascular resultando em dano por hipóxia, ativação de neutrófilos endoteliais, além da diminuição da resistência da mucosa. A retrodifusão de ácido através da mucosa debilitada participa efetivamente na conversão de erosões superficiais a necrose profunda ou úlcera, ao alterar a resposta proliferativa (MUSUMBA *et al.*, 2009).

A maior concentração de ácido pode, inclusive, aumentar indiretamente o dano à mucosa ao propiciar maior absorção de AINEs ácidos. A resposta protetora hiperêmica com liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P e vasodilatação subsequente (mediada por NO) também é mediada por PGs, melhorando, dessa forma, o fluxo sanguíneo na submucosa (MUSUMBA *et al.*, 2009).

Entre os mecanismos independentes de PGs, podem ser citados a hiper-regulação da produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-8 (IL-8) e fator ativador de plaquetas (PAF) que ocorre após

administração de AINEs e a diminuição da produção de substâncias importantes para manutenção da integridade da mucosa como poliaminas, NO e de H₂S. As duas últimas são bem conhecidas por possuírem propriedades antiapoptóticas e antinecróticas (MUSUMBA *et al.*, 2009). As proteínas de estresse, incluindo a proteína de choque térmico 72 (HSP-72), parecem ter importante papel na citoproteção adaptativa induzida por AINEs quando a produção de PGs está suprimida (DUDEJA *et al.*, 2009).

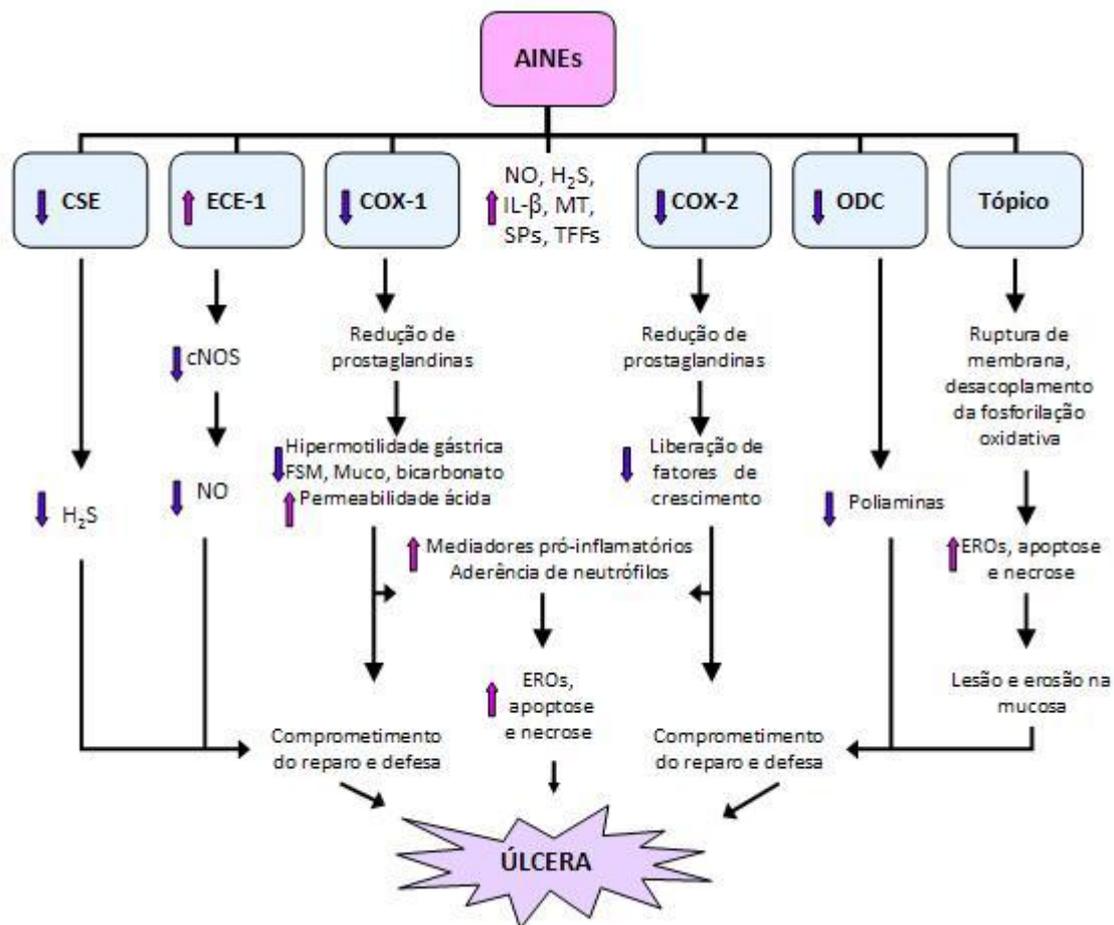


Figura 5 – Patogênese celular e molecular de úlceras induzidas por AINE: AINEs causam úlcera por um conjunto de mecanismos dependentes ou não de PGs. A depleção de PGs induz aumento compensatório em outros mediadores de defesa da mucosa gástrica. As úlceras se desenvolvem quando esses mecanismos são sobrepujados. CSE: cistationa- γ -liase; ECE-1: enzima conversora de endotelina-1; COX-1: cicloxigenase-1; COX-2: cicloxigenase-2; ODC: ornitina descarboxilase; NO: óxido nítrico; H₂S: sulfeto de hidrogênio; IL1- β : interleucina 1 β ; MT: melatonina; SPs: proteínas de estresse; TFFs: fatores trefoil; cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva; FSM: fluxo sanguíneo da mucosa; EROs: espécies reativas de oxigênio. Fonte: MUSUMBA *et al.*, 2009 (adaptado).

2.8 Lesão da mucosa gástrica induzida por etanol

A quantificação de lesões gástricas induzida por administração oral de etanol, entre outros agentes necrotizantes em ratos, é amplamente utilizada para a avaliação da atividade gastroprotetora e gastrotoxicidade de inúmeras substâncias (SAIRAM *et al.*, 2001; CHANDRANATH *et al.*, 2002; AL MOFLEH *et al.*, 2007). A medida das zonas hemorrágicas foi base para o descobrimento de mecanismos e conceitos importantes que se referem à maneira com a qual a mucosa gástrica se comporta e reage frente a agentes agressores. Para isso, os primeiros trabalhos desenvolveram métodos semiquantitativos, como a determinação do índice de ulceração calculado a partir da intensidade e medida do maior diâmetro de lesão (mm), sendo essas aferidas manualmente com auxílio de um paquímetro por um observador treinado que desconhecia os tratamentos (ROBERTS *et al.*; 1983). Apesar da validade desse método, na última década, o maior acesso a ferramentas e sistemas informatizados possibilitou melhor precisão e exatidão das medidas, sendo possível atualmente efetuar uma análise quantitativa da área total lesionada com menor subjetividade e erro, principalmente associado à medição.

O tratamento agudo com etanol induz estresse oxidativo intracelular, alterações na permeabilidade mitocondrial e despolarização que precedem à morte celular observada nas células da mucosa gástrica. Além disso, observa-se dano ao DNA, aumento da peroxidação lipídica, da atividade de xantina oxidase, bem como a diminuição do conteúdo de glutatona (GSH) nas células da mucosa gástrica (REPETTO e LLESUY, 2002).

Após a administração oral de etanol, a enzima xantina desidrogenase pode ser convertida em xantina oxidase por proteases liberadas da superfície de células da mucosa, danificadas diretamente pelo etanol. Além disso, o acetaldeído produzido no processo de oxidação do etanol serve de substrato para a enzima e radicais hidroxila são formados, iniciando, então, a peroxidação lipídica (KAHRAMAN *et al.*, 2003).

Pode-se sugerir também o envolvimento de radicais superóxido na patogênese das lesões induzidas por etanol, considerando-se que a administração intragástrica de

superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) tem efeito protetor nesse modelo (POTRICH *et al.*, 2010). Outro aspecto relevante é o efeito constritor exercido pelo etanol nos vasos sanguíneos existentes na mucosa gástrica, produzindo congestão, inflamação e dano tecidual. Os danos vasculares provavelmente têm importante papel no desenvolvimento das intensas zonas de erosão hemorrágicas que podem observadas após o tratamento com o etanol (REPETTO e LLESUY, 2002).

2.9 Farmacoterapia

Os tratamentos das doenças ácido-pépticas (gastrites, úlcera gástrica, síndrome do intestino irritado, dispepsia e síndrome Zollinger-Ellison) podem estar direcionados tanto à redução dos agentes agressores, como ao fortalecimento dos mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal (JAIN *et al.*, 2007). Muitas doenças gastrintestinais ainda são pouco responsivas às terapias e, mesmo nos casos em que existe grande variedade de fármacos efetivos, ainda há espaço para o aprimoramento e pesquisa (WALLACE e FERRAZ, 2010). As estratégias e agentes terapêuticos atualmente utilizados incluem:

2.9.1 Antiácidos

Os antiácidos compreendem carbonatos, sais de bismuto, hidróxidos de alumínio e magnésio ou associações. São substâncias amplamente utilizadas cujo mecanismo de ação consiste na neutralização ácida. Apesar de serem efetivos e de baixo custo (DRUGDDEX, 2010a), podem reduzir a biodisponibilidade oral de um grande número de fármacos e de minerais presentes em suplementos alimentares (SRINIVAS, 2009; TAYLOR *et al.*, 2010). Os efeitos adversos comuns incluem náusea, distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação (JAIN *et al.*, 2007).

2.9.2 Antagonistas de receptor H₂

Compreendem agentes como a cimetidina, ranitidina e famotidina, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da secreção ácida atingida por antagonismo reversível de receptores de histamina H₂ presentes na membrana basolateral das células parietais. Com a introdução da cimetidina no mercado farmacêutico, em 1976, reduziu-se consideravelmente a necessidade de procedimentos cirúrgicos em doenças gastrintestinais. São fármacos rapidamente absorvidos e eliminados após administração oral. Sendo assim, apresentam curta duração de ação, o que, muitas vezes, reduz a adesão do paciente ao tratamento (JAIN *et al.*, 2007).

Uma vez que os antagonistas de receptor H₂ elevam o pH gástrico, inibem o sistema enzimático hepático do citocromo P-450 e sofrem secreção tubular renal, é possível que ocorram interações medicamentosas com outros fármacos que compartilham essas mesmas vias. Algumas dessas interações são clinicamente relevantes, como é o caso da interação que ocorre com a teofilina e a varfarina, quando o sistema enzimático do citocromo P-450 é inibido pela cimetidina e ranitidina, situação na qual é necessário monitoramento terapêutico (SAX, 1987).

Embora relativamente seguros, Os efeitos adversos mais comumente relatados são dermatites, fotossensibilidade, alteração de funções hepáticas como o aumento das concentrações de alanina aminotransferase (NÄRHI *et al.*, 2005).

2.9.3 Inibidores de bomba de prótons (IBPs)

Compreendem agentes como omeprazol, lansoprazol, rabeprazol e pantoprazol, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da secreção ácida em seu último estágio, por inibição irreversível da H⁺/K⁺-ATPase na membrana canicular das células parietais. Esses fármacos apresentam boa especificidade e atividade, sendo considerados, em estudos clínicos, superiores aos antagonistas de receptor-H₂ em doses padrão (BROWN *et al.*, 2006; LEONTIADIS *et al.*, 2007; MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

Desde o lançamento do omeprazol, em 1988 (JAIN *et al.*, 2007), os IBPs atingiram enorme sucesso comercial, sendo considerados os fármacos mais efetivos no tratamento de doenças ácido-pépticas. Contudo, existem limitações como a necessidade de sua administração antes de uma refeição para que o efeito máximo seja atingido. Para que a inibição ocorra, as bombas de prótons precisam ser expressas nas células parietais, e essa expressão só ocorre quando essas células estão ativamente secretando o ácido, por exemplo, antes de uma refeição. Essa limitação pode ter efeito significativo na adesão do paciente ao tratamento (WALLACE e FERRAZ, 2010).

Além disso, os IBPs são degradados em meio ácido e, por isso, são administrados em formulações que protegem o fármaco até seu local de absorção, o duodeno. A essa característica se atribui a ausência do início rápido do efeito, que é uma propriedade desejável no alívio sintomático (WALLACE e FERRAZ, 2010).

Embora sejam considerados relativamente seguros (TOLIA e BOYER, 2008; THOMSON *et al.*, 2010), os fármacos antissecretores podem apresentar como inconveniente a supressão ácida extrema. A baixa concentração de ácido pode desencadear infecções entéricas como febre tifoide, cólera e disenteria (JAIN *et al.*, 2007). Alguns estudos ainda sugerem que a hipoacidez, associada ao uso prolongado de IBPs, pode aumentar o risco de fraturas ósseas em pacientes idosos com baixo consumo de cálcio (YU *et al.*, 2008). Também são descritos como efeitos adversos do uso prolongado a hipergastrinemia, aumento da hiperplasia de pólipos gástricos e adenocarcinoma em pacientes susceptíveis, além de efeito “rebote” na secreção ácida quando o tratamento é interrompido (MCCARTHY, 2010).

2.9.4 Misoprostol

O misoprostol é um análogo sintético de prostaglandina E₁ (PGE₁) utilizado como agente citoprotetor. Foi demonstrado que o misoprostol é efetivo na profilaxia da ulcera gástrica em pacientes submetidos a tratamentos com AINEs (BALLINGER, 1994; LAINE *et al.*, 2008). No entanto, esse fármaco apresenta efeitos adversos

como diarreia e cólicas abdominais, sendo seu uso restrito principalmente devido ao seu efeito abortivo (JAIN *et al.*, 2007).

2.9.5 Sucralfato

O sucralfato é um complexo de hidróxido de alumínio e sacarose que exerce efeito protetor direto na mucosa gástrica ao inibir a hidrólise proteica mediada por pepsina. Também foram propostos como mecanismos de citoproteção a estimulação da síntese de PGs, absorção de pepsina e estimulação da produção local de EGF (JAIN *et al.*, 2007).

O sucralfato apresenta boa efetividade no tratamento de úlceras gástrica; no entanto, quanto ao alívio da dor, é inferior aos antagonistas-H₂ e aos IBPs. Como o sucralfato não é absorvido, é considerado relativamente seguro apesar de poder interferir na absorção de outros fármacos (ex.: varfarina, fenitoína, tetraciclina). (DRUGDEX, 2010b).

2.9.6 Erradicação da *Helicobacter pylori*

A erradicação da *H. pylori* constitui importante estratégia terapêutica, considerando-se que grande parte das UPs pode estar associada a essa infecção (JAIN *et al.*, 2007). A infecção por *H. pylori* pode levar à redução da produção de SST que resulta no aumento da secreção ácida juntamente com a redução da produção de bicarbonato. Além disso, a infecção interfere na regulação da liberação de gastrina e induz à resposta inflamatória na mucosa gástrica com liberação de citocinas. O tratamento consiste basicamente na associação de antibióticos e agentes antissecretores (MALFERTHEINER *et al.*, 2009).

2.9.7 Medicina tradicional

O uso de produtos naturais para tratamento de doenças gastrintestinais é bastante difundido e, por séculos, praticado em diferentes culturas. Um texto egípcio, datado de 1550 a.C., já continha a indicação de óleo de rícino e sena para constipação e um decocto de cominho, gordura de ganso e leite para problemas estomacais. Diversas plantas medicinais podem ser encontradas também em textos antigos mesopotâmicos e hindus. A origem transcultural e séculos de continuidade de uso são um indicativo do valor terapêutico dos constituintes vegetais para essa finalidade (LANGMEAD e RAMPTON, 2001).

Estudos realizados nos Estados Unidos no período entre 1990 e 1997 revelaram que aproximadamente 10% de toda a medicina alternativa foram direcionados para tratamento de distúrbios relacionados ao TGI (EISENBERG *et al.*, 1998). Outro estudo realizado na Alemanha indica que aproximadamente 50% dos pacientes com síndrome do intestino inflamado já utilizaram tratamentos alternativos, sendo a homeopatia e a fitoterapia os mais comuns (LANGHORST *et al.*, 2005).

Os extratos vegetais têm características distintas das drogas sintéticas. Geralmente, contêm uma série de compostos e, muitas vezes, o(s) princípio(s) ativo(s) é(são) desconhecido(s) (SAHOO *et al.*, 2010). Estudos clínicos já comprovaram a eficácia de alguns produtos naturais para o tratamento de doenças gastrintestinais. Por exemplo, a capsaicina (derivada de pimentas do gênero *Capsicum*) protegeu a mucosa gástrica em voluntários saudáveis que fizeram uso de ácido acetilsalicílico (YEOH *et al.*, 1995). O extrato de *Curcuma domestica* demonstrou ser eficiente para o alívio da dispepsia em um estudo duplo-cego com 116 pacientes (THAMLIKITKUL *et al.*, 1989). Já pacientes tratados com extrato de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) por 28 dias apresentaram melhora significativa, em relação ao grupo placebo, no que diz respeito à sintomatologia dispéptica global, e principalmente nos sintomas de azia e gastralgia (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A atividade gastroprotetora das plantas medicinais é atribuída à presença de flavonoides, cumarinas, alcaloides, terpenos, taninos, ácidos fenólicos e micronutrientes, como Cu, Mn e Zn. Os mecanismos de ação são variados, podendo

ser aditivos ou sinérgicos. São descritas atividade antissecretora, anti-*H. pylori*, anti-inflamatória, antioxidante, aumento da produção de muco e do fluxo sanguíneo local, estímulo de síntese de fatores de crescimento, PGs e NO dentre outros efeitos relacionados com o aumento da defesa da mucosa gástrica (MOTA *et al.*, 2009).

Em face dos inconvenientes dos tratamentos expostos, novas alternativas vêm sendo atualmente investigadas. Entre elas, a coterapia utilizando diferentes classes de agentes, sejam gastroprotetores ou antissecretores; estudo de IBPs competitivos; agentes pró-cinéticos; AINEs estruturalmente modificados, com menor gastrotoxicidade, como os ligados a NO, metais ou H₂S; além da pesquisa de plantas medicinais ainda pouco estudadas, como é o caso da *Campomanesia lineatifolia*.

2.10 Toxicidade de drogas vegetais e fitoterápicos

Apesar do amplo uso de medicamentos sintéticos no mercado mundial, a utilização de produtos naturais vem aumentando de forma significativa, não somente pela aceitabilidade cultural, como também pela comprovação científica de eficácia de algumas espécies vegetais. Contudo, várias plantas da medicina tradicional ainda não foram submetidas a algum tipo de avaliação toxicológica, como é o caso da *C. lineatifolia*, podendo, dessa forma, representar risco tóxico ao usuário (PAL e SHUKLA, 2003; DA SILVEIRA *et al.*, 2008).

A partir do final do século XX, as plantas medicinais passaram a ser veiculadas nos meios de comunicação como produtos associados a um modo alternativo de vida. Com o objetivo de atingir o público-alvo dos adeptos do estilo de “vida natural”, a propaganda camuflou os riscos da utilização das plantas medicinais, atribuindo-lhes uma fisionomia “não agressora” e passando para o paciente toda responsabilidade e autonomia de seu consumo (TAGLIATI e FÉRES, 2009). Atualmente, a crença na “naturalidade inócua” das plantas medicinais continua a ser um mito que deve ser enfrentado. Trata-se de um conceito popular equivocado de que os produtos naturais seriam isentos de efeitos indesejáveis ou desprovidos de toxicidade (DA SILVEIRA *et al.*, 2008).

Como forma de contrastar essa afirmação, podem-se citar várias espécies vegetais como a *Datura suaveolens* (trombeteira) e a *Conium maculatum* (cicuta), que são bem conhecidas por sua capacidade de produzir risco à saúde humana. Outras, ainda que de amplo uso na medicina popular, tiveram seu potencial tóxico também reconhecido após serem submetidas aos testes de segurança, como foi o caso do efeito hepatotóxico verificado para a *Symphytum officinale* (confrei), hoje restrita ao uso tópico (TAGLIATI e FÉRES, 2009). Por outro lado, a utilização inadequada de um produto, mesmo que de baixa toxicidade, pode induzir a problemas graves desde que existam outros fatores de risco, tais como contraindicações, uso prolongado ou concomitante de outros medicamentos, sintéticos ou naturais (DOS REIS e DE SOUZA, 2006).

Por isso, a determinação da segurança de um medicamento, independentemente de sua origem, é fundamental para a promoção da saúde (KLEIN *et al.*, 2009). É com essa preocupação que as agências regulamentadoras de vários países têm preconizado a realização de estudos que comprovem a eficácia e segurança das drogas vegetais e fitoterápicos (SAHOO *et al.*, 2010). Essas diretrizes compreendem os estudos toxicológicos pré-clínicos e ensaios clínicos, bem como ensaios de controle de qualidade que comprovem a inexistência de contaminantes nocivos à saúde (metais pesados, agrotóxicos, microorganismos, aflotoxinas e produtos de degradação) ou sua existência dentro dos limites considerados seguros (KLEIN *et al.*, 2009).

No Brasil, os testes de toxicidade pré-clínica exigidos para registro e renovação de registro de fitoterápicos são estipulados pelo “GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicado pela Resolução RE 90/04. Nesse guia, constam os ensaios de toxicidade aguda e o de doses repetidas (longa duração); genotoxicidade, que deve ser efetuada quando há indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos; sensibilização dérmica, irritação cutânea e ocular, no caso de medicamentos fitoterápicos de uso tópico. Nos estudos agudos, o guia não especifica o método a ser utilizado, mas sugere a utilização de doses suficientes para se observarem efeitos tóxicos e/ou adversos. No caso da não

observação destes, recomenda-se a utilização da maior dose possível (BRASIL, 2004).

A toxicidade aguda, anteriormente conhecida como dose letal 50 (DL₅₀), é o primeiro teste pré-clínico a ser realizado. A DL₅₀ expressa a toxicidade relativa da substância, ou seja, é a dose capaz de levar 50% da população em estudo à morte. Na década de 1970, esse teste foi aceito como base de comparação e classificação de toxicidades de substâncias químicas, inclusive de extratos vegetais. Gradualmente, a DL₅₀ tornou-se teste requerido por várias entidades regulatórias para registro de novas drogas, aditivos alimentares e pesticidas. Atualmente, o termo DL₅₀ está dando lugar ao termo “toxicidade aguda”, pois os protocolos não se baseiam na morte de 50% dos animais (BOTHAM, 2004; GUBBELS-VAN HAL *et al.*, 2005; TAGLIATI e FÉRES, 2009).

O ensaio de toxicidade aguda oral avalia a exposição a uma dose única ou fracionada no período de 24 horas em roedores (geralmente ratas). O uso de apenas um sexo de animais, usualmente fêmeas, é defendido pelo Guia 423 da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD). A análise estatística de resultados provenientes de diversos testes convencionais de toxicidade aguda (determinação da DL₅₀), com animais de ambos os sexos, demonstrou que, embora a diferença de sensibilidade entre os sexos seja pequena, nos casos em que está presente, observa-se que as fêmeas são ligeiramente mais sensíveis (OECD, 2001b). O Guia 423 veio como alternativa ao Guia 401 (OECD, 1981), teste convencional da toxicidade aguda, eliminado em 2002 por razões éticas com animais. Por já preestabelecer, no máximo cinco doses diferentes a serem utilizadas, o método de classes (Guia 423) prima pela utilização de pequena quantidade de animais. Em princípio, o método não é direcionado para o cálculo preciso da DL₅₀, mas permite determinar faixas de exposição em que se esperaria a letalidade, uma vez que a proporção de animais mortos continua sendo o principal ponto final desse teste (OECD, 2001b).

Existem outros métodos atualmente aceitos para estudo de toxicidade aguda oral. Entre eles, pode-se citar o Guia 420, método de dose fixa (OECD, 2001a) e o Guia 425, processo modificado *Up-and-Down*. Este, como o nome sugere, objetiva

estimar o valor da DL₅₀ testando sequencialmente animais individuais, com a dose sendo ajustada para cada animal, para cima ou para baixo, dependendo do resultado obtido com o animal anterior (OECD, 2006). Com o intuito de se atingir os objetivos pretendidos e minimizar a dor e sofrimento dos animais, é necessário coletar o maior número possível de informações acerca da substância que será submetida aos testes de toxicidade. Nesse sentido, a execução de estudos-pilotos, a busca de informações de estudos anteriores com substâncias similares e o desenvolvimento e validação de métodos *in vitro*, como a toxicidade basal de uma ou mais linhagens de célula, têm sido incentivados. Tais dados podem auxiliar na definição da dose inicial dos testes *in vivo*, reduzindo o número de animais utilizados em até 30% e atendendo, dessa forma, o princípio dos três Rs (*Reducing, Refinement, Replacement* – redução, refinamento e substituição) (OECD, 2000; NIEHS, 2001).

Com o estudo de toxicidade aguda oral é possível evidenciar risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (KLEIN *et al.*, 2009). No Brasil, 1728 casos de intoxicações foram registrados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINTOX) devido ao uso indevido de plantas medicinais (ano-base 2002) (DA SILVEIRA *et al.*, 2008). Os resultados obtidos no ensaio agudo também dão suporte à escolha das doses para os demais testes de toxicidade (KLEIN *et al.*, 2009). Portanto, as informações obtidas por meio do estudo de toxicidade aguda oral são de crucial importância na avaliação da segurança de substâncias químicas para uso humano e animal, entre as quais também se encontram as drogas vegetais e fitoterápicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda e a atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Campomanesia lineatifolia* (EEC) e da fração acetato de etila (FAEC) em ratas Wistar;
- b) Avaliar o efeito induzido pela administração *per os* de EEC e FAEC em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina em ratos Wistar;
- c) Correlacionar os resultados obtidos a fim de inferir possíveis mecanismos de ação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A coleta das folhas de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. foi realizada em um remanescente de mata, no *campus* da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG (GPS 19° 52' 9.87" S; 43° 58' 12.04" W), em abril de 2007. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Marcos Sobral e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número BHCB 150606.

Após coleta, as folhas de *C. lineatifolia* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar e temperatura de 40 °C, por 72 horas. As folhas secas foram então trituradas em moinho de facas. Posteriormente, o material vegetal foi extraído por percolação com etanol 96° GL e concentrado até resíduo em evaporador rotatório com temperatura máxima de 50° C. O extrato etanólico obtido (EEC) foi transferido para cápsula de porcelana mantida em dessecador, sob vácuo, até completa eliminação do solvente (BARBOSA, 2009).

EEC, em suspensão com água, foi submetido a partições sucessivas com hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. As frações obtidas foram secas em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 50° C. Posteriormente, essas frações foram transferidas para cápsulas de porcelana mantidas em dessecador sob vácuo até completa evaporação dos solventes (BARBOSA, 2009).

Os derivados da droga vegetal, EEC e FAEC, utilizados neste estudo foram fornecidos pela Professora Rachel Oliveira Castilho do laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Em todos os experimentos, utilizou-se o mesmo lote do material vegetal.

O rendimento extrativo foi de 23,6% para EEC, a partir do pó das folhas, e de 14,0% para FAEC, a partir de EEC. Os extratos foram previamente caracterizados por perfil fitoquímico, doseamento de taninos [EEC (18,7 ± 0,1)%; FAEC (16,5 ± 0,3)%] e flavonoides totais [EEC (4,0 ± 0,1)%; FAEC (9,3 ± 0,3)%], sendo também isolados e

identificados dois marcadores: catequina (flavanol) e quercitrina (glicosídeo de flavonol) (BARBOSA, 2009).

4.2 Drogas e reagentes

Foram utilizados indometacina (Merck, Sharp & Dohme, Brasil), cimetidina (SKF, Brasil) e sucralfato (Natures Plus Farm Ltda, Brasil). Os demais reagentes utilizados no estudo foram obtidos comercialmente, todos de grau analítico.

4.3 Animais

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar), adultos, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Para o estudo de toxicidade aguda, foram utilizadas fêmeas com idade de 8 a 12 semanas com variação máxima de massa corporal de aproximadamente 20% (OECD, 2001b). Para os estudos farmacológicos, foram utilizados ratos machos, com massa variando entre 200 e 240g.

Durante o estudo, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro-escuro de 12 horas (7:00 – 19:00h) e temperatura de (22 ± 3) °C, em gabinete Vidy®. Ração comercial em pellet (Nuvilab®) e água potável foram disponibilizados *ad libitum*. Após subdivisão, os animais foram mantidos em suas gaiolas por um período mínimo de cinco dias antes do início dos experimentos para aclimação às condições laboratoriais. A opção pela linhagem Wistar foi relacionada à experiência prévia de outros autores que realizaram estudos semelhantes (ROZZA *et al.*, 2011; UMAMAHESWARI *et al.*, 2007; POLAT *et al.*, 2010).

Os protocolos experimentais estão de acordo com as normas nacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA) (protocolo nº 52/2010) (Anexo A).

4.4 Toxicidade aguda

Para a avaliação da toxicidade aguda *in vivo* do EEC e FAEC, foi utilizado o método de classes (Protocolo 423) descrito nas diretrizes da OECD (OECD, 2001b), observando-se também os itens descritos no “GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS” da ANVISA, publicado pela Resolução RE 90/04 (BRASIL, 2004).

4.4.1 Tratamento e desenho experimental

As ratas foram subdivididas aleatoriamente em três grupos de três animais cada e submetidas a jejum de oito horas. Após esse período, as massas dos animais foram determinadas e foi administrado nos grupos testes EEC ou FAEC na dose inicial de 2000 mg/kg por gavage (*per os*) conforme fluxograma (**Figura 6**). As ratas do grupo controle receberam somente veículo, solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5% p/V (CMC 0,5%), em mesmo volume e via da solução teste. O alimento foi restituído três a quatro horas após a administração das drogas vegetais. O consumo de água foi *ad libitum*.

Durante as primeiras 24 horas, as ratas foram observadas quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade nos períodos de 0, 15, 30, 60 minutos, 2, 3, 4, 8, 24 horas e diariamente durante catorze dias após administração. A variação de massa corporal, consumo de água e alimento foram avaliados semanalmente.

Os sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade foram registrados para cada animal em ficha de *screening* toxicológico (**Apêndice A**). Foram observados parâmetros que permitiram avaliar alterações em:

- I. Estado consciente, disposição e comportamento: Atividade geral, irritabilidade, vocalização, recumbência, posição lateral, *grooming*, comportamento compulsivo, auto-mutilação, permanência em canto de gaiola.

- II. Atividade motora e tônus muscular: Resposta ao aperto de cauda, endireitamento, força para agarrar, tônus muscular, ataxia.
- III. Reflexos: corneal, auricular.
- IV. Sistema nervoso central (SNC): Tremores, convulsão, fenômeno de *Straub*, hipnose.
- V. Sistema nervoso autônomo (SNA): lacrimejamento, salivação, micção, defecação, piloereção, respiração.
- VI. Outras alterações: hipotermia, rigidez abdominal, edema, prurido, alterações na pele, sangramento de orifícios, diarreia e número de animais mortos ou eutanasiados mediante morte iminente (estado moribundo), quando for o caso.

As observações registradas foram tabuladas numa escala que depende da ausência ou presença do evento no início do estudo (“animal normal”). Nos casos em que o evento foi ausente (ex: convulsão, tremor, comportamento compulsivo), foi atribuído a pontuação 0 (zero) ao valor “normal” e considerou-se a escala de 0 a 4 correspondendo, respectivamente, a ausente, raro, pouco, moderado, intenso. Nos casos em que o evento foi inicialmente presente (ex: tônus muscular, respiração, defecação), foi atribuído a pontuação 4 (quatro) ao valor “normal” e considerou-se a escala de 0 a 8 correspondendo, respectivamente, a ausente, raro, pouco, diminuído, presente (normal), aumentado, moderado, elevado, intenso (LUCIO *et al.*, 2000).

Ao fim do período de observação, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e necropsiados. Os órgãos foram removidos e inspecionados macroscopicamente quanto a alterações teciduais e fixados em formaldeído 10% tamponado (pH 7,2) para análise microscópica em casos justificados.

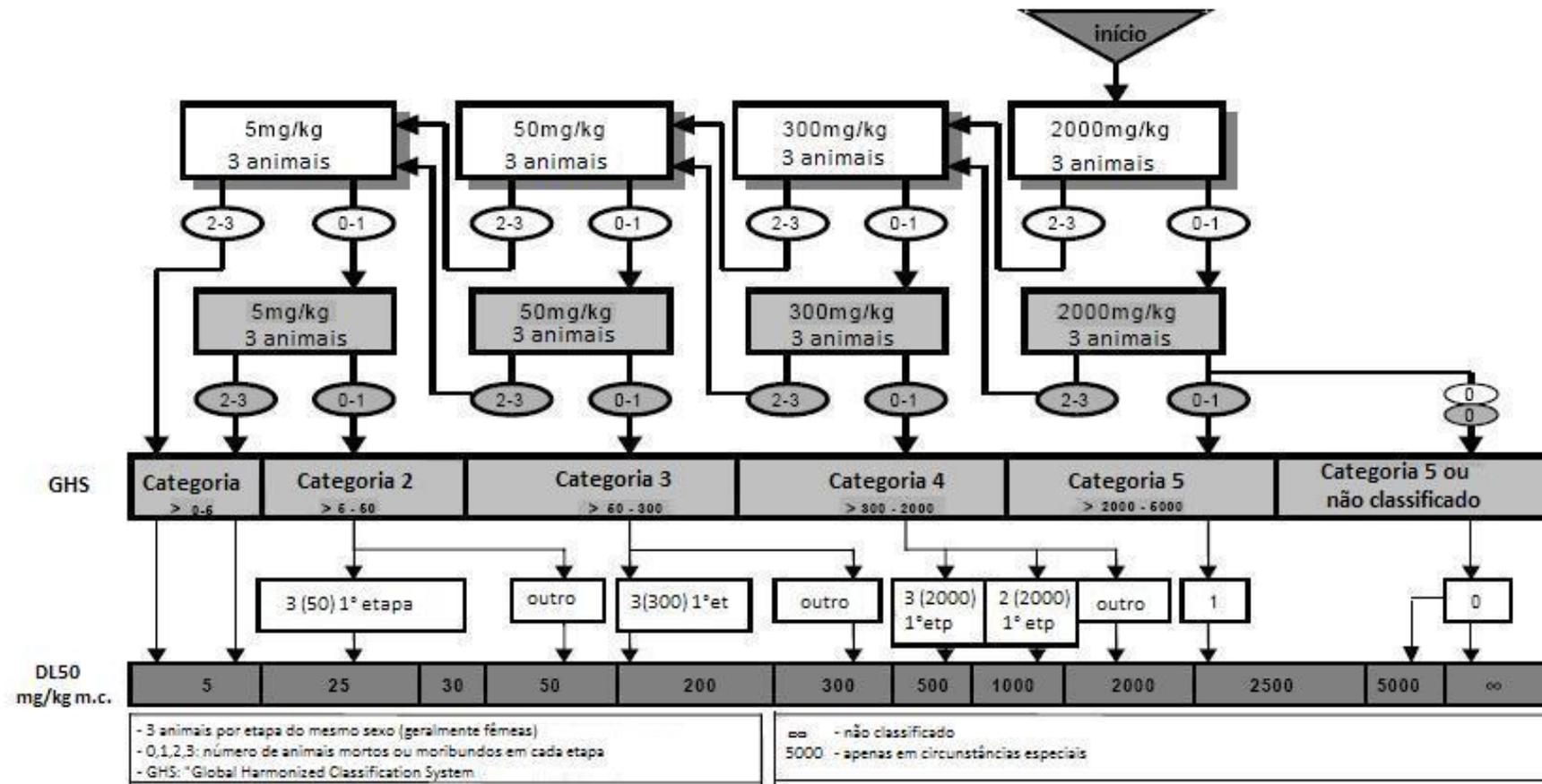


Figura 6 – Procedimento para execução do teste de toxicidade aguda oral pelo método de classes com a dose inicial de 2000 mg/kg. FONTE: OECD, 2001 (adaptado)

4.5 Atividade farmacológica

4.5.1 Tratamento e desenho experimental

Para avaliação da atividade do EEC e da FAEC em modelo de lesões da mucosa gástrica, os ratos foram subdivididos aleatoriamente em grupos de seis animais cada e submetidos a jejum sólido de 24 horas em gaiola de contenção, para evitar a cropofagia (ingestão das fezes). Durante as primeiras doze horas, tiveram livre acesso à água e solução aquosa de leite condensado (proporção de 5:1) e somente à água nas doze horas subsequentes até uma hora antes da primeira administração.

Em todos os casos, os experimentos foram conduzidos aproximadamente na mesma hora do dia, para que não houvesse variações decorrentes de alterações no ritmo diurno na regulação das funções gastrintestinais (HEEBA *et al.*, 2009). Todas as suspensões dos extratos ou das drogas indometacina, cimetidina ou sucralfato foram preparadas imediatamente antes da administração, utilizando como veículo CMC 0,5%. As concentrações das suspensões administradas *per os* foram ajustadas de maneira que o volume administrado fosse o mesmo para todos os animais (0,5 mL/100g), respeitando-se o limite máximo recomendável de 1 mL/100g de massa corporal do animal (OECD, 2001). As suspensões foram agitadas vigorosamente antes de cada administração.

As doses selecionadas para o presente estudo, tanto de etanol (UMAMAHESWARI *et al.*, 2007) e indometacina (NAGAI *et al.*, 2009), como dos controles positivos sucralfato e cimetidina (JORGE *et al.*, 2004; ROZZA *et al.*, 2011), estão de acordo com estudos publicados e com experiências anteriores do grupo de pesquisa.

Em estudo-piloto, foi verificado que no modelo de indução de lesões por indometacina, na dose de 40 mg/kg (*p.o.*), foram necessárias doses maiores de EEC e FAEC para que o efeito pudesse ser observado, quando comparado ao modelo de lesões induzidas por etanol absoluto (5 mL/kg). Sendo assim, EEC e FAEC foram avaliados nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, no modelo do etanol, e nas doses de 400, 800 e 1200 mg/kg no modelo de indometacina. As doses dos controles

positivos foram ajustadas para os diferentes modelos sendo também maiores para o modelo da indometacina (sucralfato, 400 mg/kg e cimetidina, 100 mg/kg) e menores para o modelo do etanol (sucralfato, 200 mg/kg e cimetidina, 50 mg/kg).

Foi incluído no estudo um grupo controle não tratado (intacto) cujos animais receberam somente CMC 0,5% após o período de jejum e não foram submetidos à indução de lesões, seja por etanol ou indometacina. O grupo intacto foi utilizado com a finalidade de se avaliar os parâmetros fisiológicos (pH, características histológicas e volume gástrico) na ausência de qualquer tratamento, nas mesmas condições experimentais. Os demais grupos tiveram lesões gástricas induzidas por etanol ou indometacina conforme descrito em 4.5.2 e 4.5.3.

4.5.2 Modelo de lesões gástricas induzidas por etanol

Para a avaliação da atividade do EEC e da FAEC no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol, foram utilizados seis grupos testes nos quais os animais receberam EEC ou FAEC nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (*p.o.*). Paralelamente, foi utilizado um grupo controle, no qual os animais receberam pré-tratamento somente com o veículo (CMC 0,5%), e dois grupos controles positivos, nos quais os animais receberam sucralfato na dose de 200 mg/kg (*p.o.*) ou cimetidina na dose de 50 mg/kg (*p.o.*).

Para a avaliação do efeito protetor cumulativo, foram utilizados dois grupos adicionais que receberam EEC ou FAEC na dose de 200 mg/kg (*p.o.*), uma vez ao dia, durante os três dias que antecederam a indução das lesões.

Uma hora após os pré-tratamentos, foram administrados 5 mL/kg de etanol absoluto (*p.o.*) em cada rato (ROBERT *et al.*, 1983). Uma hora após a administração do etanol, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, os estômagos foram removidos, abertos ao longo da grande curvatura e lavados suavemente com solução salina (cloreto de sódio 0,9% em água). A mucosa gástrica foi esticada, com auxílio de alfinetes, sobre plataforma de isopor de espessura de 15 mm. As plataformas contendo os estômagos foram armazenadas temporariamente

em recipiente plástico contendo solução de formaldeído 10% tamponado (pH 7,2) para fixação e posterior avaliação das lesões e análise histopatológica.

4.5.3 Modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina

Para a avaliação da atividade do EEC e da FAEC no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina, foram utilizados seis grupos teste nos quais os animais receberam EEC ou FAEC nas doses de 400, 800 ou 1200 mg/kg (*p.o.*). Paralelamente, foi utilizado um grupo controle, no qual os animais receberam pré-tratamento somente com o veículo (CMC 0,5%), e dois grupos controles positivos, cujos animais receberam sucralfato na dose de 400 mg/kg (*p.o.*) ou cimetidina na dose de 100 mg/kg (*p.o.*).

Uma hora após os pré-tratamentos acima descritos, foi administrada suspensão de indometacina 40 mg/kg (*p.o.*) em cada rato. Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram eutanasiados (GUIDOBONO *et al.*, 1997), sendo realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.5.2.

4.6 Volume e pH gástricos

Após a retirada dos estômagos, foi realizada uma pequena incisão próxima ao piloro para a coleta do conteúdo gástrico e posterior determinação de volume utilizando proveta graduada de 10 mL. Para a determinação de pH, foram utilizadas fitas indicadoras Merck® imediatamente após a abertura dos órgãos (JORGE *et al.*, 2004).

4.7 Avaliação macroscópica das lesões gástricas

Após o período de fixação, os estômagos foram fotografados por meio da câmera digital Sony® DSC-H50 9.1 megapixels, a uma distância de 5,7 cm da mucosa gástrica e com a função zoom desativada. A área das estrias e focos hemorrágicos (zonas hemorrágicas) (ARISAWA *et al.*, 2006) presentes na mucosa gástrica foi obtida por intermédio do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (*Oberkochen, Germany*). Os pixels com tons de marrom, referentes às zonas hemorrágicas, foram selecionados para a criação de uma imagem binária e obtenção da área (mm²).

A porcentagem de proteção foi calculada utilizando-se a área total das zonas hemorrágicas quantificadas (mm²) após cada tratamento, por meio da seguinte fórmula (SULEYMAN *et al.*, 2009):

$$\% \text{ de proteção do tratamento} = 1 - \left\{ \frac{\text{ATL-t (mm}^2\text{)}}{\text{mATL-c (mm}^2\text{)}} \right\} \times 100$$

Onde,

ALT-t: área total de zonas hemorrágicas no animal do grupo teste (ou controle positivo);

mATL-c: média da área total de zonas hemorrágicas obtida com o grupo controle

4.8 Análise histopatológica e morfométrica

A porção glandular da mucosa gástrica foi dividida em quatro fatias paralelas à linha longitudinal que limita a porção glandular e não glandular de mucosa gástrica dos ratos. Os fragmentos obtidos foram desidratados em série crescente de alcoóis 70, 80, 90 e 100%, diafanizados em xilol, parafinizados e incluídos em parafina histológica purificada (PF 56-58 °C). Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação manual (*American Optical*), com espessura de 4 µm e os quatro cortes histológicos foram corados pela técnica de Ácido periódico de Schiff (PAS).

4.8.1 Análise quantitativa das zonas de necrose superficiais (erosões) e úlceras na mucosa gástrica

Todas as zonas de necrose, das mais superficiais às mais profundas, foram quantificadas nos quatro cortes histológicos de cada estômago. Tais lesões foram visualizadas através da objetiva de 4X e digitalizadas com o uso da microcâmara JVC TK-1270/RGB (*Tokyo, Japan*). As áreas de necrose (μm^2) dos quatro cortes histológicos foram quantificadas por meio do programa KS300 e somadas para a obtenção da área total de necrose (μm^2) por animal.

A área total dos cortes histológicos (área de parede gástrica) foi determinada através da digitalização das lâminas em *scanner (HP scanjet 2400)*, na resolução de 300 dpi, da seleção dos pixels, criação da imagem real e cálculo da área por meio do programa KS300 (FAHEL *et al.*, 2010). Para que pudessem ser comparadas, todas as áreas de necrose (μm^2) foram normalizadas pela menor área de parede gástrica detectada ($45,3006 \text{ mm}^2$). Também foi determinada a porcentagem de necrose por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ necrose} = \frac{\text{média da área total de necrose } (\mu\text{m}^2) \times 100}{\text{média da área do corte histológico } (\text{mm}^2) \times 10^6}$$

4.8.2 Análise quantitativa da área de muco gástrico

Todos os cortes histológicos de cada estômago, corados pelo PAS, foram visualizados através da objetiva de 10X para a digitalização de 32 imagens aleatórias (oito de cada corte) utilizando-se a mesma microcâmara. A área PAS positiva foi calculada utilizando-se o mesmo analisador de imagens mencionado acima. Em cada imagem, todos os pixels com tons de bonina das regiões coradas pelo PAS foram selecionados para a criação de uma imagem binária e obtenção da área em μm^2 . Posteriormente, na mesma imagem, todos os pixels da mucosa

gástrica foram selecionados para a obtenção da área total de mucosa (μm^2). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliarì (1997).

A quantidade de muco na mucosa gástrica foi estimada com a análise da razão entre a área PAS+ e a área de mucosa (UMEGAKI et al., 2010). Determinou-se o índice de muco para cada animal por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de muco (I.M.)} = \frac{\text{média de área PAS+ nas 32 imagens } (\mu\text{m}^2)}{\text{média da área de mucosa nas 32 imagens } (\mu\text{m}^2)}$$

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Graph Prism 5.0*. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. A comparação entre dois grupos foi realizada empregando-se o teste T de *Student* não pareado. Para a comparação de mais de dois grupos, empregou-se o teste one way ANOVA seguido de teste para comparações múltiplas de pequenas amostras. A escolha desses testes foi realizada de acordo com a dispersão relativa dos dados na estatística descritiva. Dessa forma, foram utilizados os testes de *Tukey*, quando o coeficiente de variação (CV) < 25%, e o teste de *Newman-keuls* quando CV > 25%. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade aguda

A dose de 2000 mg/kg, tanto do EEC como da FAEC, não ocasionou óbito às ratas Wistar durante o estudo de toxicidade aguda pelo método de classes. Sinais de toxicidade como perda de massa corporal, inibição do crescimento, alterações comportamentais e clínicas graves não foram observadas.

Observou-se leve redução da atividade geral na primeira hora para o grupo que recebeu FAEC, porém essa redução foi reversível no período de observação subsequente (duas horas). Após oito horas da administração de ambos os extratos, foi detectada constipação leve, com redução da defecação, quando comparados ao grupo controle. Tal alteração foi reversível após 24 horas. Demais sinais de toxicidade não foram encontrados nas observações diárias realizadas nos treze dias subsequentes do *screening* toxicológico (**Tabela 3**). Sendo assim, o período de observação não precisou ser prolongado.

Ao se avaliar a variação da massa corporal, percebeu-se ligeira redução de ganho de massa na primeira semana nas ratas que receberam FAEC, quando comparadas aos outros grupos (EEC e controle) (**Figura 7**). No entanto, essa diferença foi revertida ao término do experimento (catorze dias). Após os catorze dias, houve ganho de massa em todos os grupos e não houve diferenças significativas entre as massas médias finais (**Figura 8**).

Quanto ao consumo de água e alimentos, nenhuma alteração foi detectada, tanto na primeira como na segunda semana. Foi registrado aumento do consumo de água e ração para EEC, FAEC e controle de maneira semelhante (**Figura 9 e 10**).

TABELA 3 – Sinais observados no teste de toxicidade aguda oral (dose única) de EEC e FAEC em ratas.

Grupo	Dose (mg/kg)	T/M	Período de	Sinais de toxicidade observados
			observação dos sinais	
EEC	0	3/0	5' - 14 ^o dia	Sem sinais de toxicidade
	2000	3/0	5' – 8h	Sem sinais de toxicidade
			8h – 24h	Defecação (3)
			24h - 14 ^o dia	Sem sinais de toxicidade
2000	3/0	5' – 8h	Aspectos normais	
		8h – 24h	Defecação (3)	
		24h - 14 ^o dia	Sem sinais de toxicidade	
FAEC	0	3/0	5' - 14 ^o dia	Sem sinais de toxicidade
	2000	3/0	10' – 1h	Atividade geral (3)
			2h – 8h	Sem sinais de toxicidade
			8h – 24h	Defecação (3)
			24h - 14 ^o dia	Sem sinais de toxicidade
	2000	3/0	10' – 1h	Atividade geral (3)
			2h – 8h	Sem sinais de toxicidade
			8h – 24h	Defecação (3)
24h - 14 ^o dia			Sem sinais de toxicidade	

Nota: T/M = número de ratos tratados / número de mortes. Observações após administração = 5 min, 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 8, 24 hora, e diariamente até o 14^o dia. Escore normal: atividade geral (4), defecação (4).

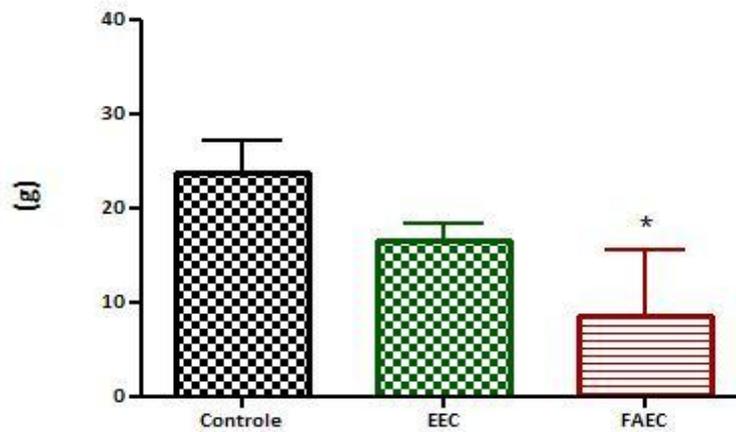


Figura 7 – Ganho de massa corporal de ratas após sete dias no teste de toxicidade aguda. Os grupos testes receberam dose única de 2000 mg/kg de EEC e FAEC e o grupo controle recebeu o veículo (CMC 0,5%). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo) * significativamente diferente do grupo controle. Teste *Tukey's* ($p < 0,05$).

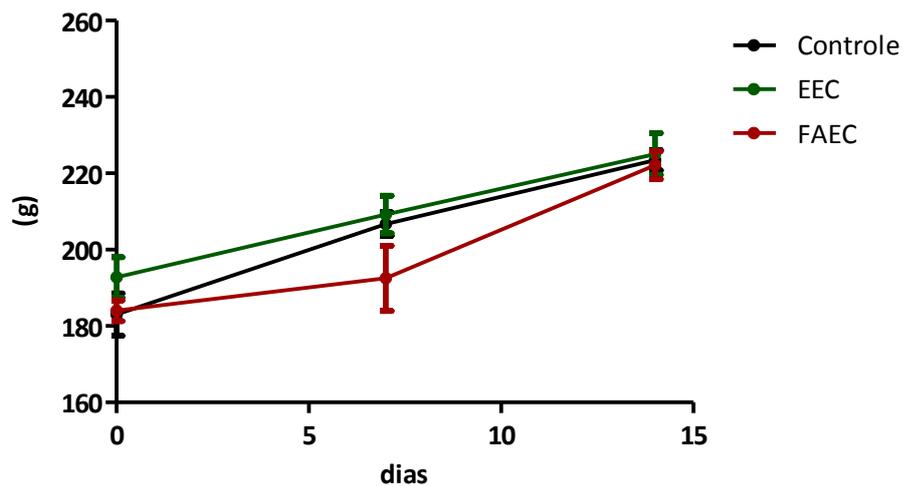


Figura 8 – Variação da massa corporal de ratas durante catorze dias no teste de toxicidade aguda. Os grupos teste receberam dose única de 2000 mg/kg de EEC e FAEC e o grupo controle recebeu o veículo (CMC 0,5%). Cada ponto representa a média de seis animais. As barras representam o erro padrão da média.

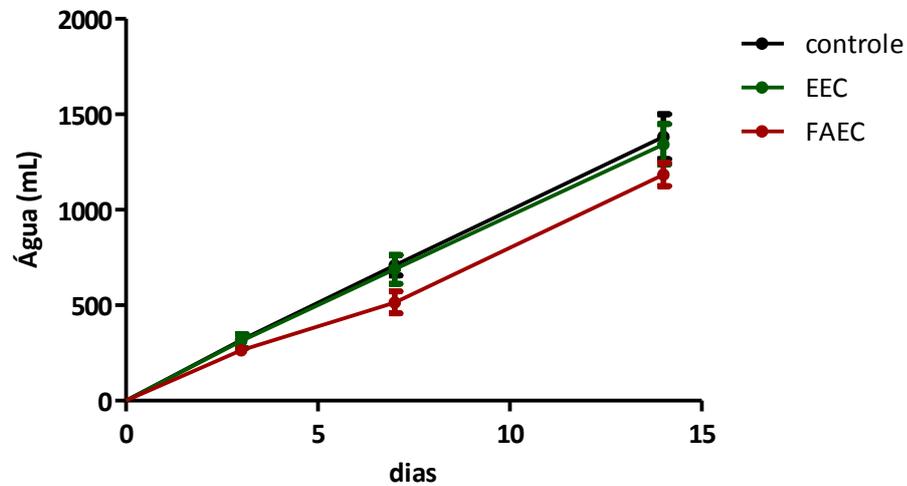


Figura 9 – Consumo de água por ratos durante catorze dias no teste de toxicidade aguda. Os grupos teste receberam dose única de 2000 mg/kg de EEC e FAEC e o grupo controle recebeu o veículo (CMC 0,5%). Cada ponto representa a média de seis animais. As barras representam o erro padrão da média.

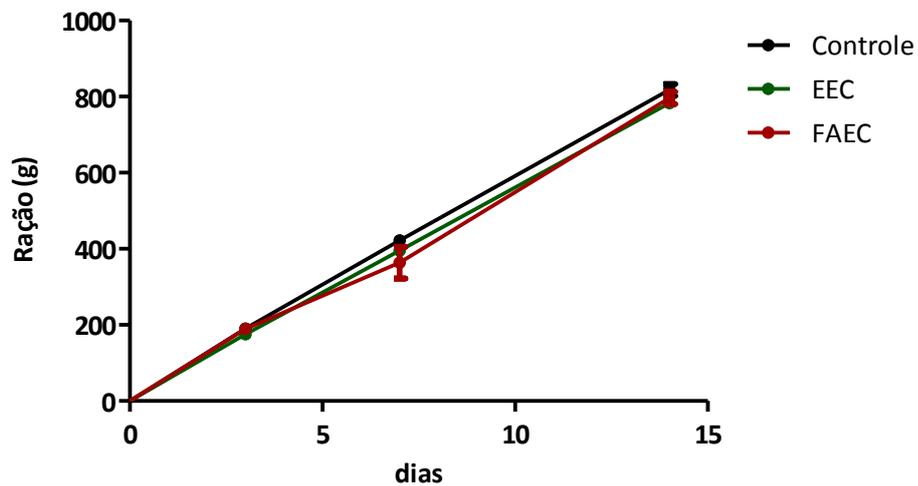


Figura 10 – Consumo de ração por ratos durante catorze dias no teste de toxicidade aguda. Os grupos teste receberam dose única de 2000 mg/kg de EEC e FAEC e o grupo controle recebeu o veículo (CMC 0,5%). Cada ponto representa a média de seis animais. As barras representam o erro padrão da média.

Como os extratos não ocasionaram óbito aos animais, ao fim do período de observação de catorze dias os mesmos foram eutanasiados. Os órgãos de todos os animais dos grupos EEC e FAEC submetidos à eutanásia apresentaram os mesmos aspectos morfológicos macroscópicos daqueles do grupo controle. Não foram detectadas alterações na estrutura, rigidez ou coloração das superfícies dos órgãos avaliados macroscopicamente.

Para que as massas dos órgãos pudessem ser comparadas, as massas relativas (peso do órgão para 200g de animal) foram calculadas e se encontram descritas no **Apêndice B**. Não foram detectadas diferenças significativas entre as massas do baço, rins, estômago, coração e cérebro dos grupos tratados com EEC e FAEC quando comparados ao grupo controle (**Figura 11 e 12**). Já as massas relativas do fígado e dos pulmões foram ligeiramente menores para ambos os grupos. Intestinos, pâncreas, aparelho reprodutor e esôfago não tiveram as massas determinadas, pois foi coletado apenas um segmento desses órgãos.

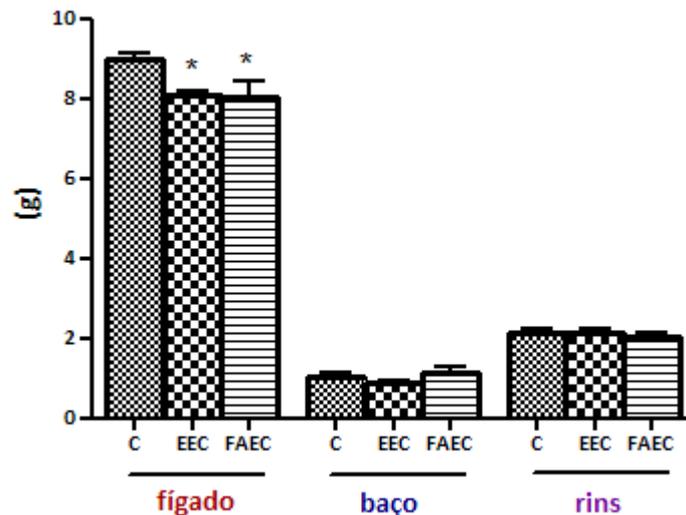


Figura 11 – Avaliação da massa do fígado, baço e rins (g/200g animal) de ratas após catorze dias, no teste de toxicidade aguda. Os grupos teste receberam dose única de 2000 mg/kg de EEC e FAEC e o grupo controle (C) recebeu o veículo (CMC 0,5%). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo) * significativamente diferente do grupo controle. Teste *Tukey's* ($p < 0,05$).

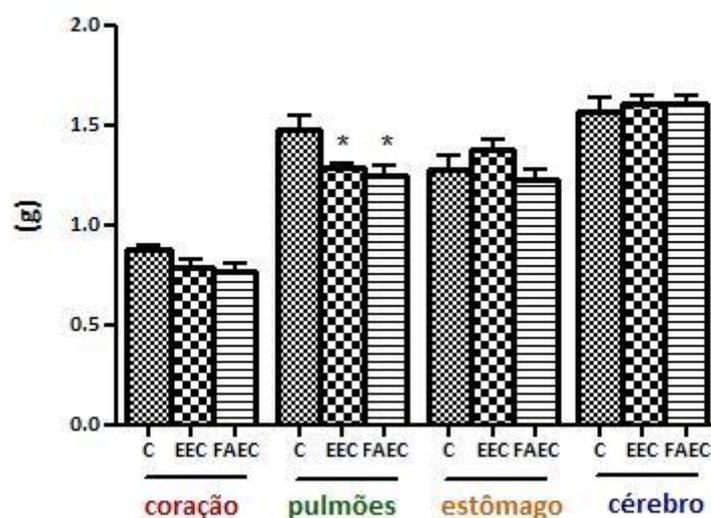


Figura 12 – Avaliação da massa do coração, pulmões, estômago e cérebro (g/200g animal) de ratas após catorze dias, no teste de toxicidade aguda. Os grupos teste receberam dose única de 2000 mg/kg de EEC e FAEC e o grupo controle (C) recebeu o veículo (CMC 0,5%). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). * significativamente diferente do grupo controle. Teste *Tukey's* ($p < 0,05$).

5.2 Modelo de lesões gástricas induzidas por etanol

A administração oral de etanol absoluto produziu lesões na mucosa gástrica dos ratos do grupo controle que puderam ser visualizadas macroscopicamente como estrias hemorrágicas. Não foram observadas alterações na zona cárdica ou córnea. Esta apresentou aspecto morfológico macroscópico translúcido e cor levemente acinzentada tanto para o grupo controle como para os demais grupos (**Figura 13**). A atividade protetora de EEC e FAEC foi evidenciada pela redução significativa da área de lesão (**Tabela 4, Figura 14**). O efeito observado foi dose-dependente.

Neste modelo, as porcentagens de proteção induzida por EEC e FAEC, na dose de 100 mg/kg, foram de 68,8% e 90,9%, respectivamente. As doses de 200 e 400 mg/kg produziram proteção superior a 93%. A proteção induzida pela dose de 400 mg/kg foi de 99,6% para EEC e 99,9% para FAEC (**Tabela 4**). Em alguns animais desse mesmo grupo não foram encontradas lesões macroscópicas que pudessem ser quantificadas, embora a mucosa gástrica apresentasse aspecto levemente

hiperemiado com petéquias em toda sua extensão, visualizadas logo após a necropsia. Nos grupos que receberam as doses de 400 mg/kg de EEC e FAEC, puderam ser observadas manchas decorrentes da própria coloração dos extratos (verde escuro).

De maneira semelhante, a administração *per os* de sucralfato 200 mg/kg ou cimetidina 50 mg/kg diminuiu o dano gástrico, e a proteção exercida foi de 98,6% e 47,7%, respectivamente (**Tabela 4**).

Os tratamentos com EEC 200 mg/kg ou com FAEC 200 mg/kg por três dias consecutivos antecedendo a indução das lesões por etanol (dose única diária) não apresentaram vantagem terapêutica quando comparados aos tratamentos com dose única, uma hora antes da administração do etanol (**Figura 15**).

Não houve diferença significativa entre o pH gástrico do grupo intacto (pH 3,1) e os grupos tratados com sucralfato 200 mg/kg, EEC ou FAEC. Foi verificado aumento para os animais do grupo controle (pH 5,8) ou tratados com cimetidina 50 mg/kg (pH 7,7) (**Tabela 4**).

Os animais tratados com EEC 400 mg/kg e FAEC 200 e 400 mg/kg apresentaram volumes gástricos equiparáveis aos animais intactos (1,3 mL). Verificou-se aumento para os animais do grupo controle (2,6 mL) ou demais tratamentos (**Tabela 4**).

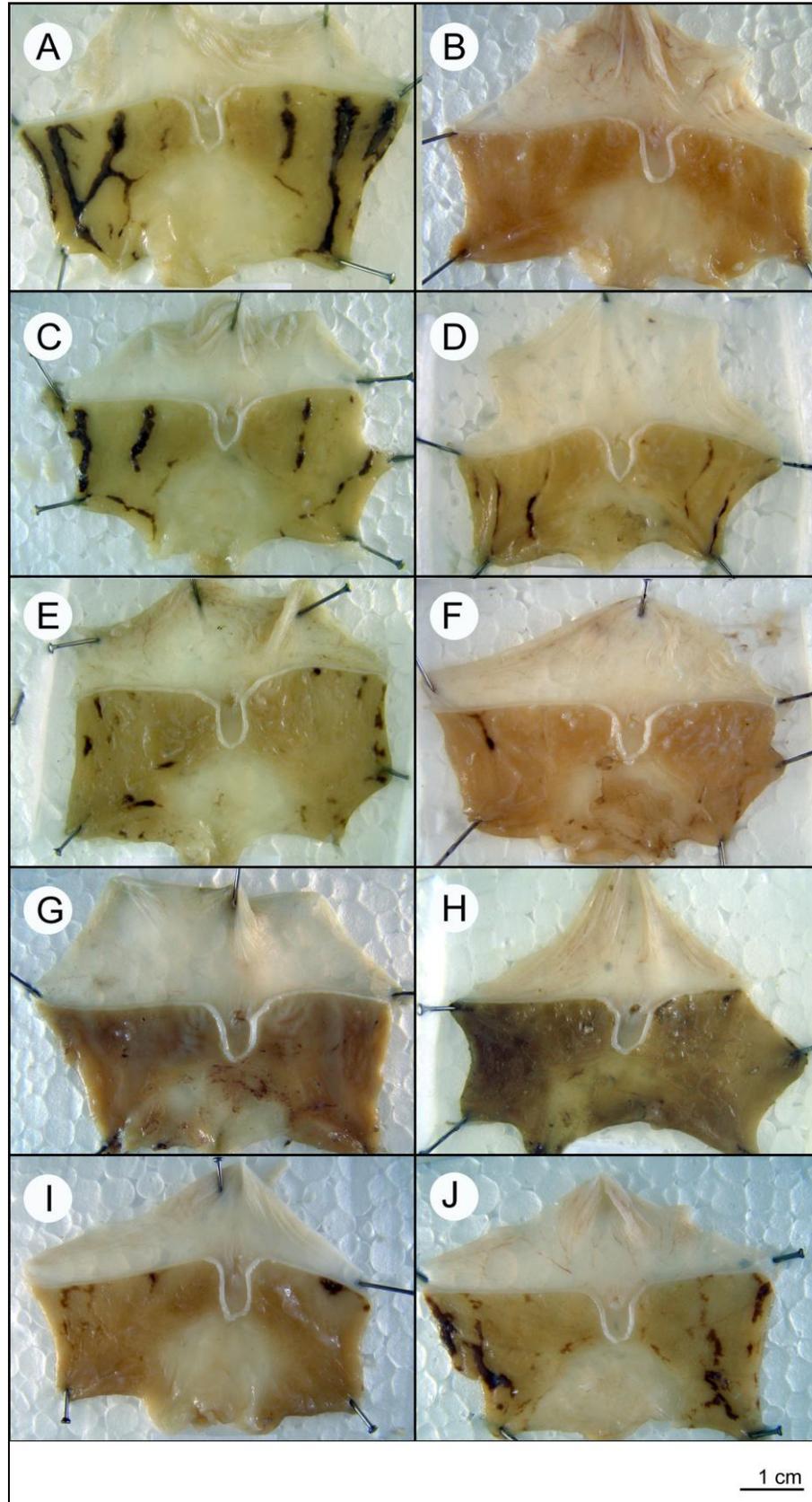


Figura 13 – Aspecto macroscópico dos estômagos dos ratos. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por etanol. (A) grupo controle, veículo (CMC 0,5%); (B) grupo intacto, não recebeu etanol; (C) EEC, 100 mg/kg; (D) FAEC, 100 mg/kg; (E) EEC, 200 mg/kg; (F) FAEC, 200 mg/kg; (G) EEC 400 mg/kg; (H) FAEC 400 mg/kg; (I) sucralfato, 200 mg/kg, (J) cimetidina 50 mg/kg.

TABELA 4 - Efeitos induzidos pela administração *per os* de EEC e FAEC (100, 200 ou 400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) sobre o volume, pH e áreas de lesões gástricas (zonas hemorrágicas) induzidas por etanol absoluto.

Grupo	Dose (mg/kg)	Área de lesão (mm ²)	Proteção (%)	pH	Volume gástrico (mL)
Intacto	-	-	-	3,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Controle	-	90,7 ± 8,6 ^a	-	5,8 ± 0,5 [§]	2,6 ± 0,1 [§]
EEC	100	28,3 ± 2,7 ^b	68,8	4,4 ± 0,7	3,0 ± 0,2 [§]
FAEC	100	8,3 ± 0,5 ^c	90,9	3,8 ± 0,8	2,5 ± 0,2 [§]
EEC	200	5,7 ± 2,7 ^c	93,7	4,2 ± 0,7	2,4 ± 0,2 [§]
FAEC	200	4,8 ± 1,2 ^c	94,7	4,3 ± 0,9	1,9 ± 0,3
EEC	400	0,41 ± 0,22 ^c	99,6	4,3 ± 0,6	1,9 ± 0,3
FAEC	400	0,06 ± 0,04 ^c	99,9	2,8 ± 0,5	1,9 ± 0,1
Sucralfato	200	1,30 ± 0,71 ^c	98,6	4,2 ± 0,6	2,4 ± 0,1 [§]
Cimetidina	50	47,4 ± 8,6 ^b	47,7	7,7 ± 0,2 [§]	2,7 ± 0,3 [§]

Nota: Os valores representam média ± erro padrão da média. Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente; [§] significativamente diferente do grupo intacto (que não recebeu etanol). Teste *Newman-Keus* (p<0,05) (N=6 animais por grupo)

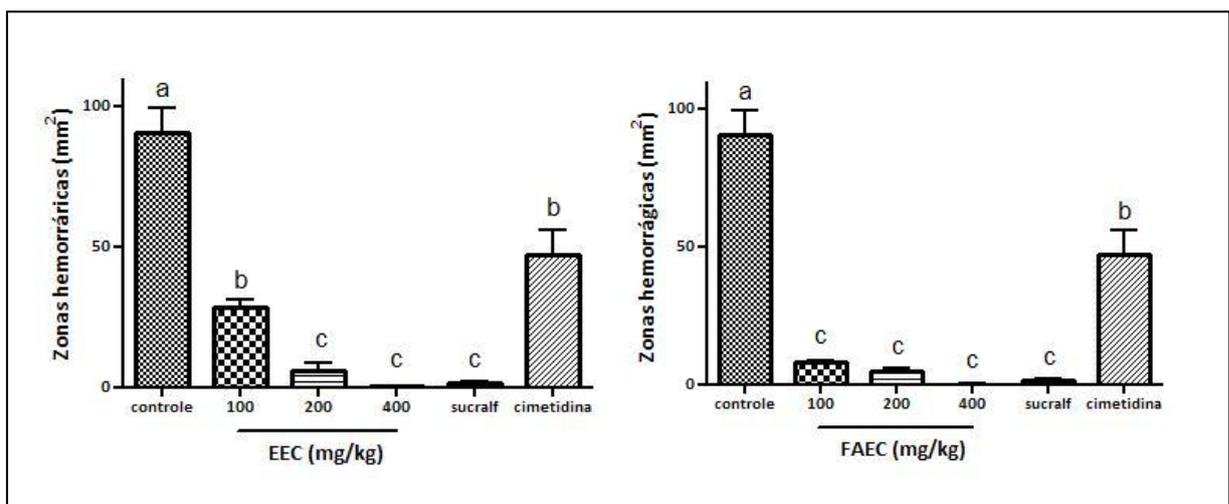


Figura 14 – Área de zonas hemorrágicas (mm²) em estômago de ratos submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração *p.o.* de EEC e FAEC nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Letras minúsculas distintas diferem estatisticamente - teste *Newman-Keus* (p<0,05).

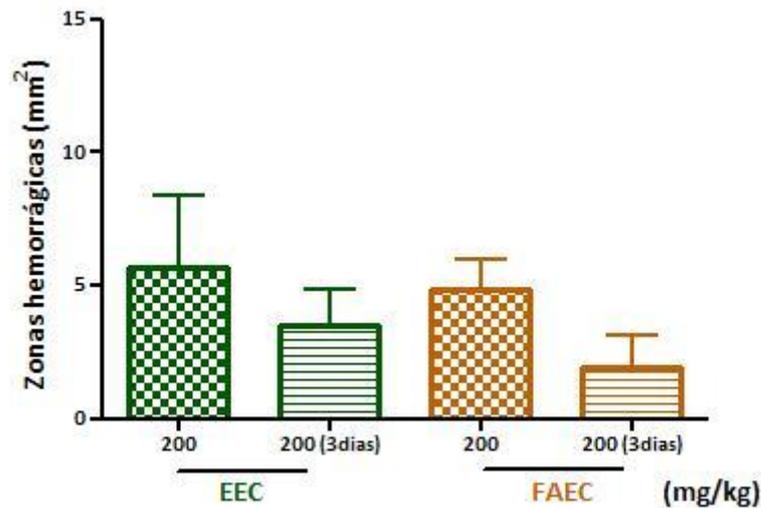


Figura 15 – Área de zonas hemorrágicas (mm²) em estômago de ratos submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração *p.o.* de EEC e FAEC na dose de 200 mg/kg, em dose única diária ou por três dias consecutivos, antecedendo a indução das lesões. As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos – teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

Os resultados da avaliação macroscópica foram consistentes com a avaliação microscópica. Foram observadas regiões extensas de necrose na porção glandular da mucosa gástrica dos ratos do grupo controle. Em algumas regiões, zonas de necrose profundas puderam ser detectadas, nas quais houve comprometimento do tecido até a camada submucosa ou muscular da mucosa com perda da arquitetura tecidual (**Figura 16**).

As áreas e porcentagem de necrose e áreas de parede gástrica foram quantificadas e se encontram descritas no **Apêndice C**. A proteção gástrica induzida por sucralfato, cimetidina, EEC e FAEC foi perceptível também em nível microscópico, sendo observada redução significativa da área de necrose em todos os grupos (**Figura 17**). A porcentagem de necrose na parede gástrica foi de 4,95% para os animais do grupo controle e de 2,09% e para os animais tratados com EEC na dose de 100 mg/kg e de 0,52% quando tratados com FAEC, nessa mesma dose. Já a administração *per os* de EEC e FAEC na dose de 400 mg/kg, reduziu a porcentagem de necrose para 0,25 e 0,02%, respectivamente. Nos ratos tratados com cimetidina e sucralfato, foi de verificado, respectivamente, 2,50% e 0,16% de necrose.

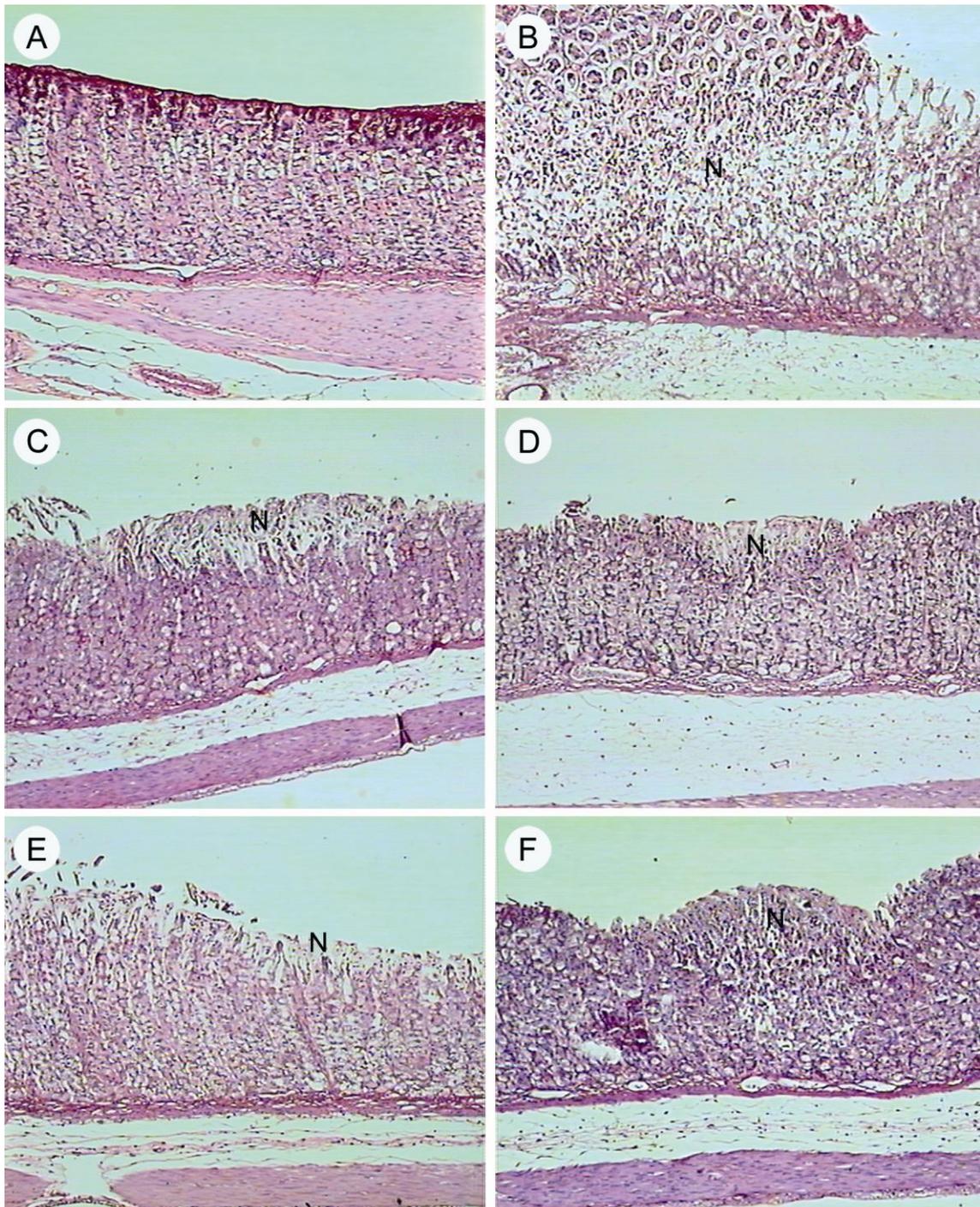


Figura 16 – Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando região de necrose. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por etanol. (N) Necrose. (A) grupo intacto, não recebeu etanol; (B) grupo controle, veículo (CMC 0,5%); (C) EEC, 100 mg/kg; (D) FAEC, 100 mg/kg; (E) sucralfato, 200 mg/kg; (F) cimetidina, 50 mg/kg. (PAS, 100x)

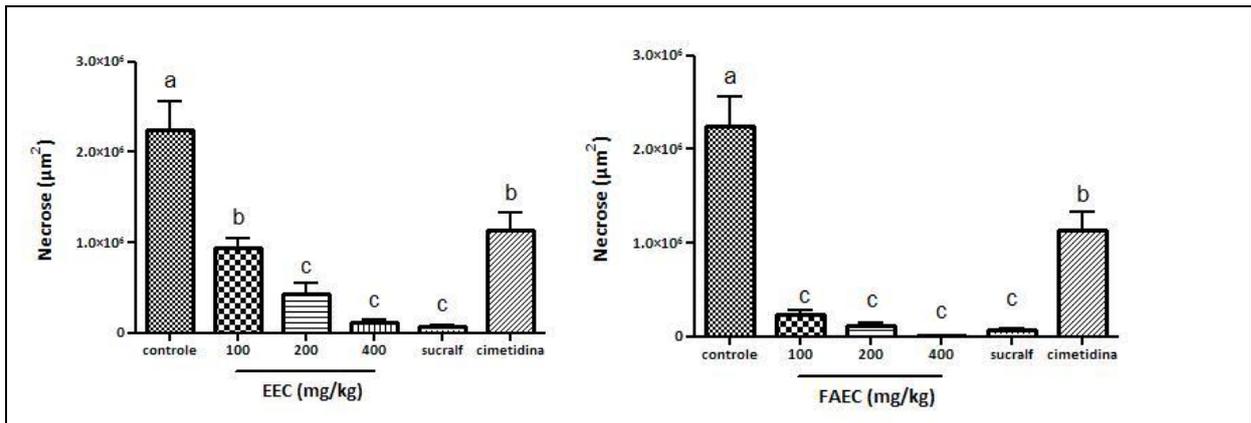


Figura 17 – Área de necrose (μm^2) na mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de lesões por etanol, após administração *p.o.* de EEC e FAEC nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, sucralfato (200mg/kg), cimetidina (50mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Letras minúsculas distintas diferem estatisticamente - teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

Na análise microscópica, verificou-se a diminuição da área total de mucosa gástrica em todos os grupos de animais que receberam etanol quando comparados ao grupo de animais intactos. Não houve diferenças entre os grupos controle e tratados com EEC, FAEC, sucralfato ou cimetidina (**Figura 18, Apêndice D**).

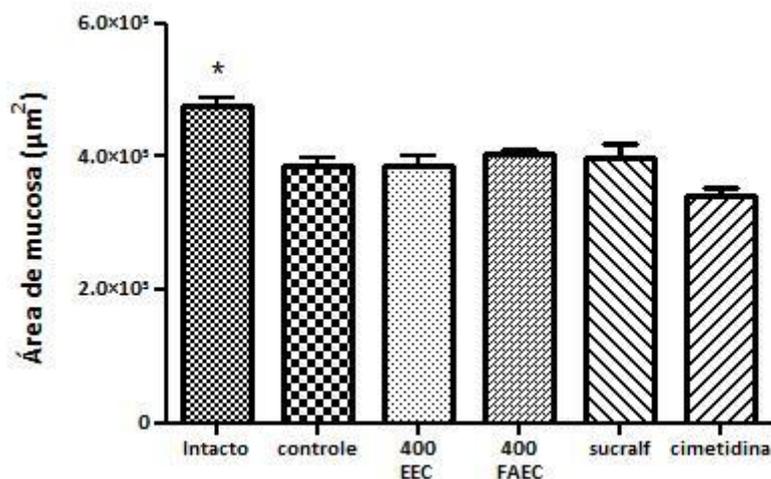


Figura 18 – Área de mucosa gástrica (μm^2) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões por etanol, após administração *p.o.* de EEC e FAEC (400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). *significativamente diferente do grupo controle – teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

O muco gástrico pode ser observado em tons de bonina, por meio da coloração PAS (**Figura 19**). A quantificação das áreas de mucossubstâncias coradas pelo PAS (PAS+) se encontra descrita no **Apêndice D**. Observa-se diminuição significativa para o grupo controle quando comparado ao grupo intacto. Com exceção de FAEC 400 mg/kg, a administração dos demais tratamentos, inclusive dos controles positivos, não foi capaz de reverter essa diminuição. O I.M. foi maior para intacto e FAEC 400 mg/kg e similar para controle, sucralfato, cimetidina e EEC (todas as doses) e FAEC (100 e 200 mg/kg) (**Figura 20 e 21**).

Ao se analisar comparativamente a distribuição da coloração PAS+ nas fatias dos cortes histológicos, pode ser percebida diferença significativa entre a primeira e quarta fatia dos animais do grupo intacto e do grupo que recebeu FAEC 400 mg/kg. Apesar disso, os valores de I.M. foram comparáveis para esses grupos. Foi encontrada diminuição da porcentagem de coloração PAS+ na primeira fatia dos animais tratados com FAEC 400 mg/kg quando comparado ao grupo intacto. Essa diminuição foi compensada por aumento na quarta fatia (**Figura 22**), de modo que as médias do total de áreas coradas pelo PAS foram similares. Não houve diferenças significativas entre a segunda e terceira fatia dos grupos de animais intactos e tratados com FAEC 400 mg/kg.

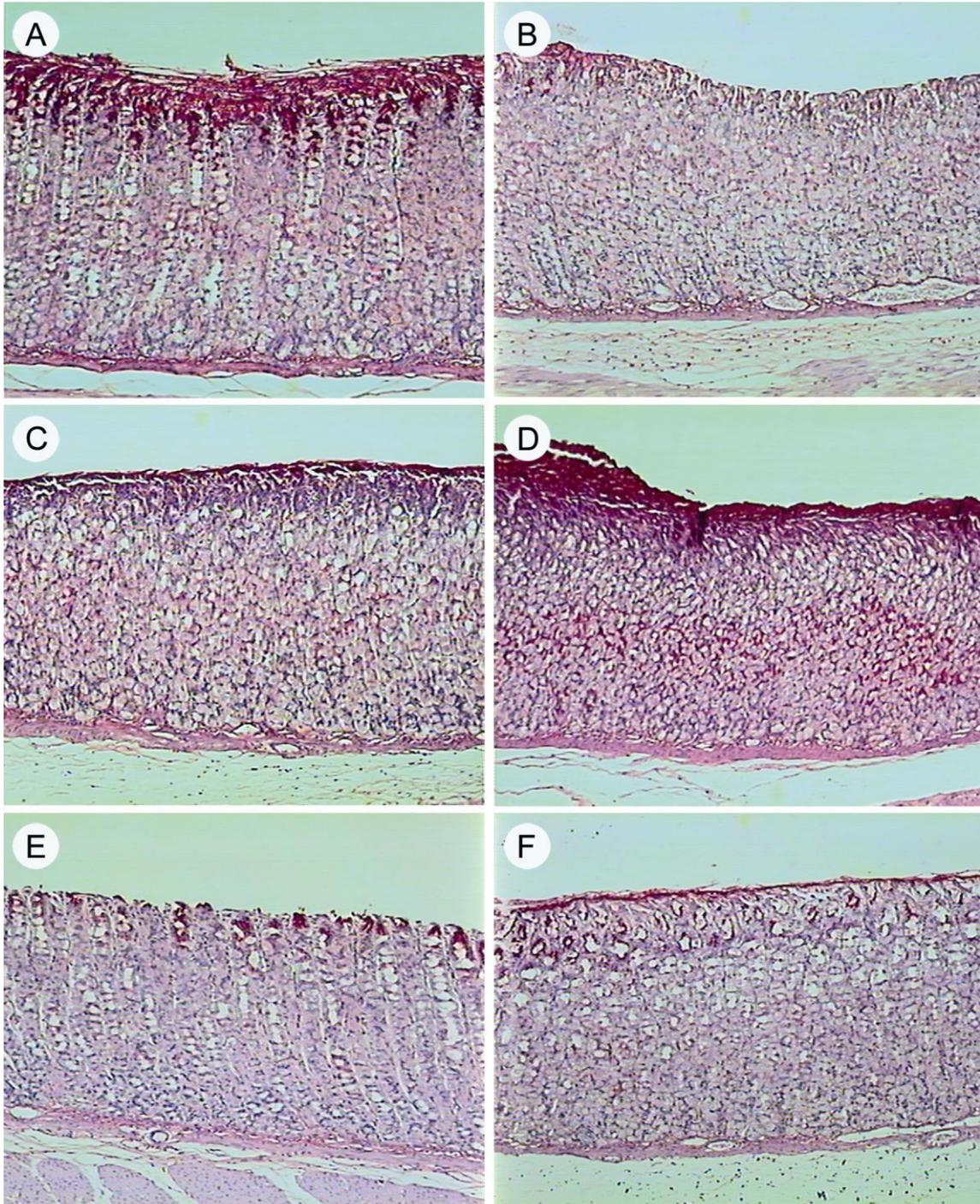


Figura 19 – Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando o efeito sobre o muco gástrico, corado pelo PAS. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por etanol. (A) grupo intacto, não recebeu etanol; (B) grupo controle, veículo (CMC 0,5%); (C) EEC, 400 mg/kg; (D) FAEC, 400 mg/kg; (E) sucralfato, 200 mg/kg; (F) cimetidina 50 mg/kg. (PAS, 100x)

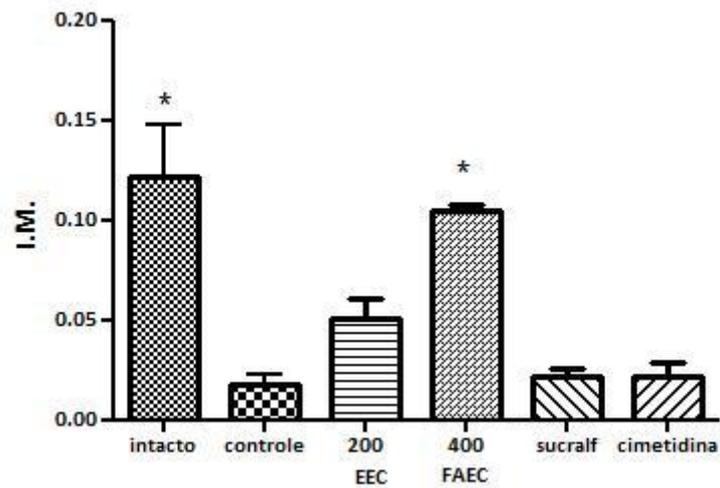


Figura 20 – Índice de muco (I.M.) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração *p.o.* de EEC (200 mg/kg), FAEC (400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). *significativamente diferente do grupo controle – teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

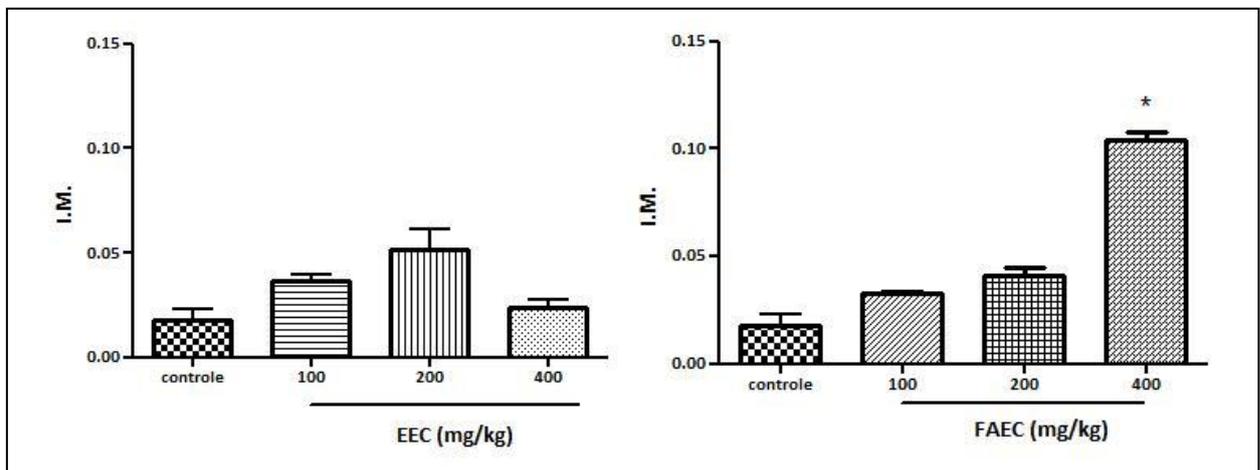


Figura 21 – Índice de muco (I.M.) de ratos submetidos à indução de lesões gástricas por etanol, após administração *p.o.* de EEC ou FAEC nas dose de 100, 200 ou 400 mg/kg ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). *significativamente diferente do grupo controle – teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

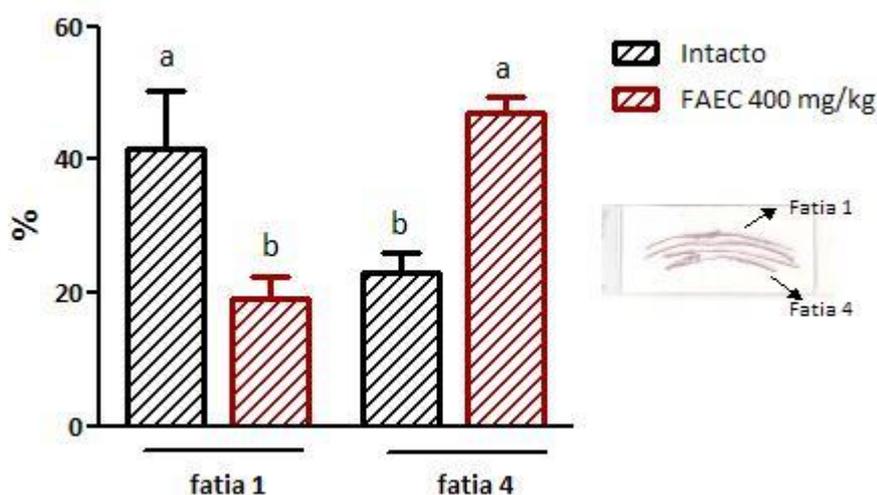


Figura 22 – Distribuição da coloração PAS+ nas fatias 1 e 4 da mucosa gástrica de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões por etanol, após administração *p.o.* de FAEC na dose 400 mg/kg. 100% = área total corada por PAS. As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Letras minúsculas distintas diferem estatisticamente - teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$) (n=6 animais por grupo).

5.3 Modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina

A administração *per os* de indometacina 40 mg/kg induziu lesões gástricas nos ratos do grupo controle que puderam ser visualizadas macroscopicamente como focos hemorrágicos distribuídos em toda a extensão da mucosa. Também não foram observadas alterações na zona cárdica ou córnea (**Figura 23**).

A atividade protetora de EEC e FAEC foi evidenciada pela redução significativa da área de zonas hemorrágicas (**Tabela 5, Figura 24**). O efeito observado foi dose-dependente. Nesse modelo, a porcentagem de proteção induzida por EEC e FAEC foi respectivamente de 67,0% e 32,3% (400 mg/kg); 89,2% e 74,7% (800 mg/kg) e 98,8% e 98,1% (1200 mg/kg). Os tratamentos com administração *per os* de sucralfato (400mg/kg) e cimetidina (100mg/kg) também diminuíram o dano gástrico e a proteção exercida foi de 81,3% e 95,0%, respectivamente (**Tabela 5**).

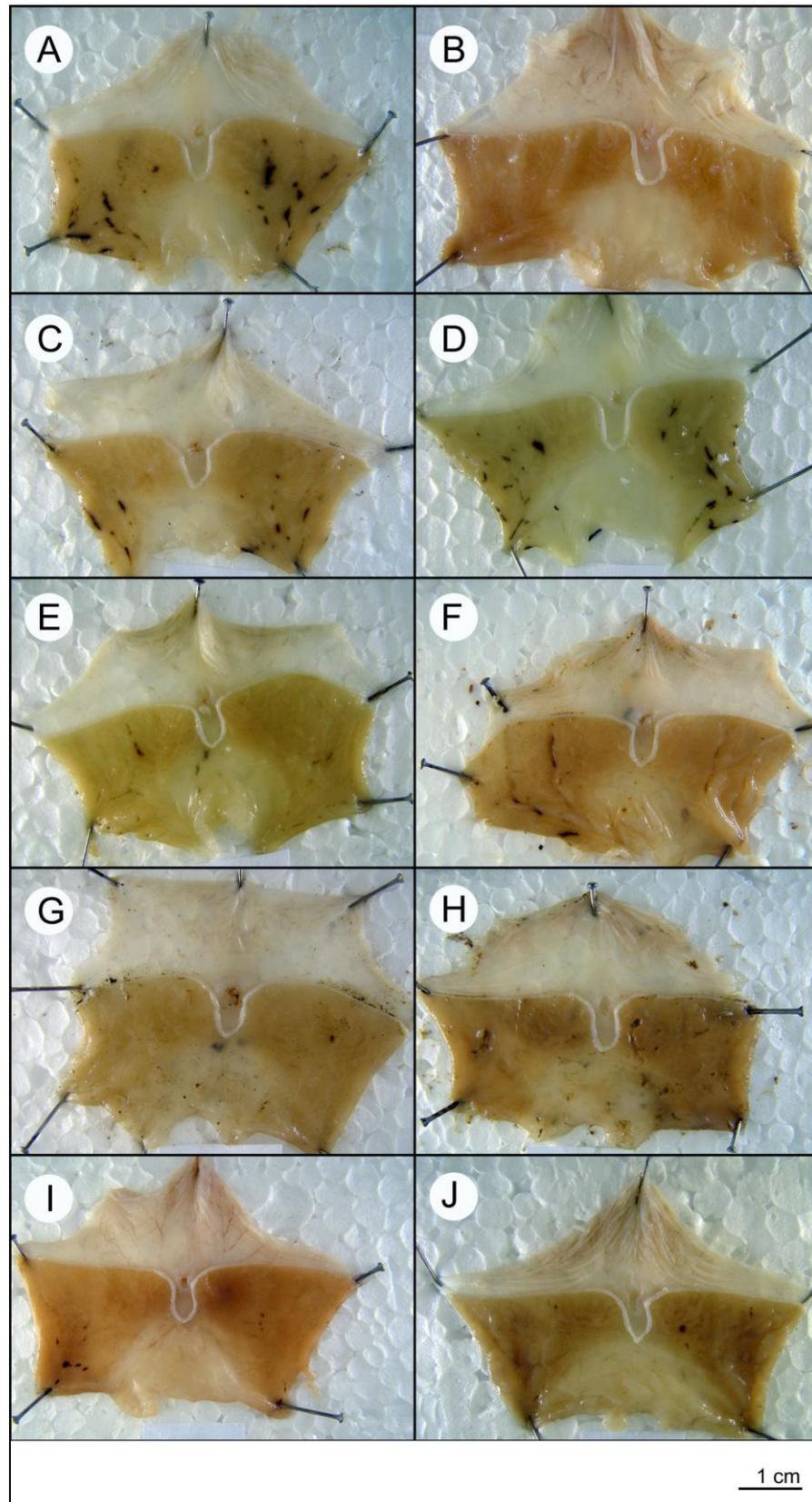


Figura 23 – Aspecto macroscópico dos estômagos dos ratos. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg *p.o.*. (A) grupo controle, veículo (CMC 0,5%); (B) grupo intacto, não recebeu indometacina; (C) EEC, 400 mg/kg; (D) FAEC, 400 mg/kg; (E) EEC, 800 mg/kg; (F) FAEC, 800 mg/kg; (G) EEC, 1200 mg/kg; (H) FAEC, 1200 mg/kg; (I) sucralfato, 400 mg/kg, (J) cimetidina 100 mg/kg.

TABELA 5 - Efeitos da administração *per os* de EEC e FAEC (400, 800 ou 1200 mg/kg), sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) sobre o pH e áreas de lesões gástricas (zonas hemorrágicas) induzidas por indometacina (40 mg/kg).

Grupo	Dose (mg/kg)	Área de lesão (mm ²)	Proteção (%)	pH
Intacto	-	-	-	3,1 ± 0,1
Controle	-	11,78 ± 1,14 ^a	-	3,4 ± 0,2
EEC	400	3,89 ± 0,52 ^c	67,0	3,0 ± 0,4
FAEC	400	7,98 ± 0,96 ^b	32,3	3,9 ± 0,2
EEC	800	1,27 ± 0,4 ^d	89,2	3,5 ± 0,2
FAEC	800	2,98 ± 1,2 ^{cd}	74,7	4,5 ± 0,2 [§]
EEC	1200	0,14 ± 0,09 ^d	98,8	4,2 ± 0,2
FAEC	1200	0,22 ± 0,16 ^d	98,1	4,5 ± 0,2 [§]
Sucralfato	400	2,21 ± 0,74 ^{cd}	81,2	4,2 ± 0,3
Cimetidina	100	0,59 ± 0,30 ^d	95,0	4,9 ± 0,5 [§]

Nota: Os valores representam média ± erro padrão da média. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente. (N=6 animais por grupo); [§] significativamente diferente do grupo intacto (que não recebeu indometacina). teste *Newman-Keus* (p<0,05)

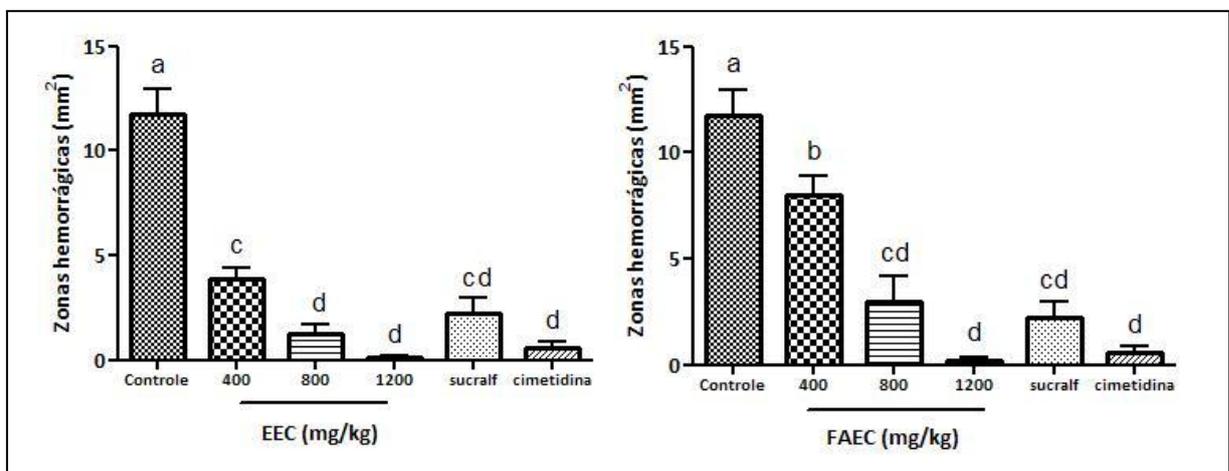


Figura 24 – Área de zonas hemorrágicas (mm²) na mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de lesões por indometacina 40 mg/kg *p.o.*, após administração *p.o.* de EEC ou FAEC nas doses de 400, 800 ou 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Letras minúsculas distintas diferem estatisticamente - teste *Newman-Keus* (p<0,05).

Quanto à avaliação do pH gástrico, foi verificado discreto aumento para os animais tratados com cimetidina 100 mg/kg (pH 4,9) e com FAEC nas doses de 800 mg/kg (pH 4,5) e 1200 mg/kg (pH 4,5), diferindo estatisticamente do grupo intacto (pH 3,1). Os demais grupos apresentaram pH gástrico similar ao grupo intacto (**Tabela 5**). No presente modelo, o volume gástrico não foi aferido, pois os animais tiveram livre acesso à água uma hora após a indução das lesões.

Na análise microscópica, foram observadas regiões de necrose e erosões desde moderadas a profundas na porção glandular da mucosa gástrica dos ratos do grupo controle. Na análise histopatológica, foi possível visualizar a perda da arquitetura tecidual, com destacamento do tecido (**Figura 25**).

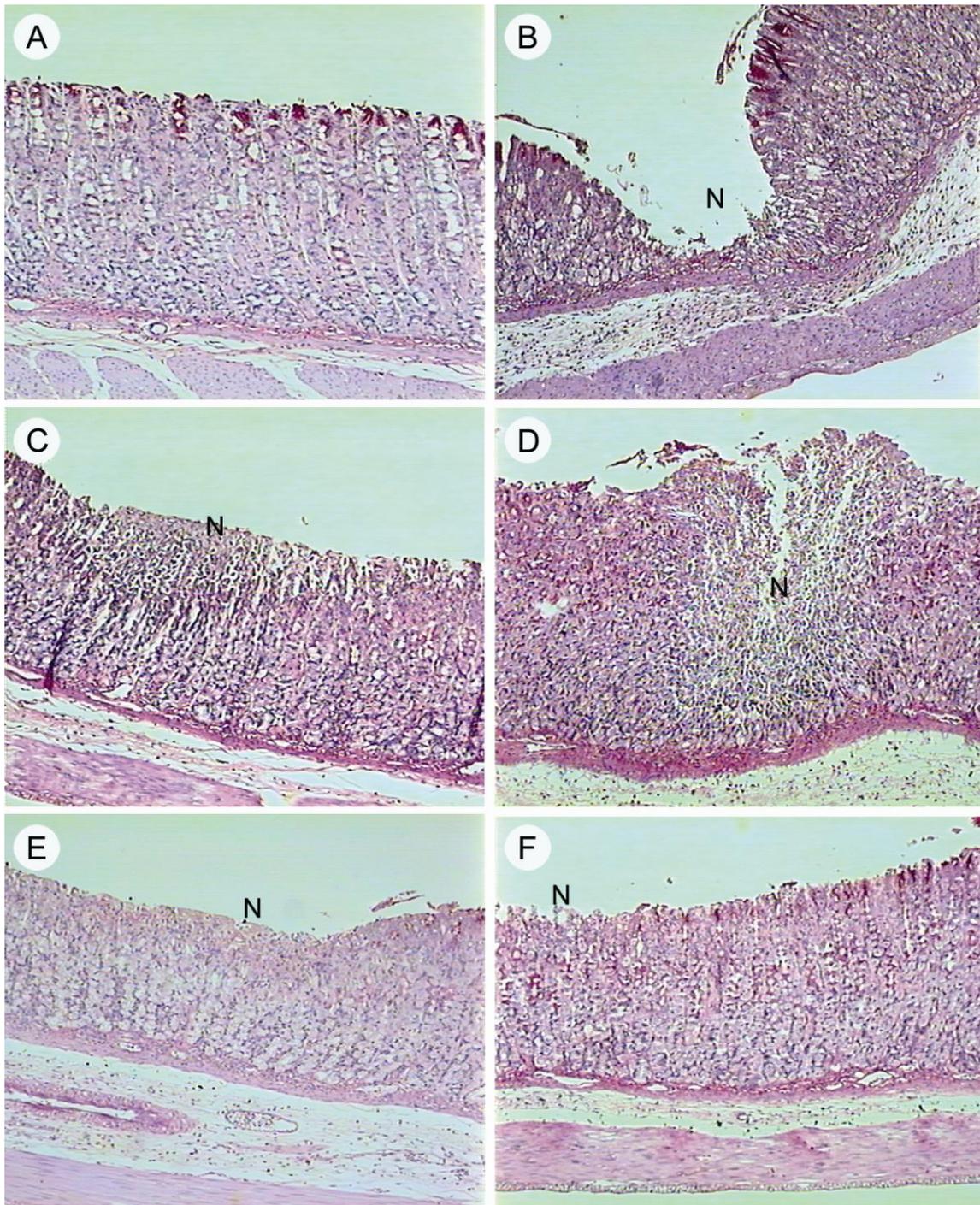


Figura 25 – Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando região de necrose. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg *p.o.*. (N) Necrose. (A) grupo intacto, não recebeu etanol; (B) grupo controle, veículo (CMC 0,5%); (C) EEC, 400 mg/kg; (D) FAEC, 400 mg/kg; (E) sucralfato, 400 mg/kg; (F) cimetidina, 100 mg/kg. (PAS, 100x)

Os resultados da avaliação macroscópica foram consistentes com a avaliação microscópicas. A proteção gástrica foi perceptível também em nível microscópico ao se comparar a redução das áreas de necrose tecidual (**Figura 26**).

As áreas e porcentagem de necrose e áreas de parede gástrica foram quantificadas e se encontram descritas no **Apêndice E**.

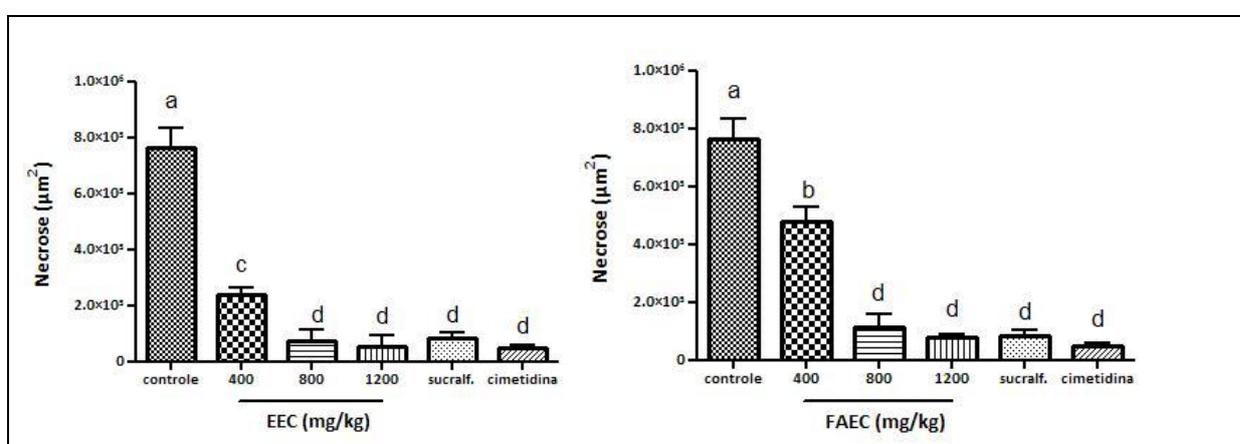


Figura 26 – Área de necrose (μm^2) na mucosa gástrica de ratos submetidos à indução de lesões por indometacina 40 mg/kg *p.o.* após administração *p.o.* de EEC ou FAEC (400, 800 ou 1200 mg/kg), sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Letras minúsculas distintas diferem estatisticamente - teste *Newman-Keus* ($p < 0,05$).

O muco gástrico pode ser observado em tons de bonina, por meio da coloração PAS (**Figura 27**). A administração *per os* de indometacina induziu redução da área de mucossubstâncias coradas pelo PAS (PAS+) em todos os grupos tratados e controles, quando comparados ao grupo de animais intactos (**Apêndice F**). As administrações *per os* de EEC e FAEC nas doses de 400, 800 ou 1200 mg/kg, bem como de sucralfato (400 mg/kg) ou cimetidina (100 mg/kg) não induziram efeito sobre I.M. (**Figura 28**). Não houve diferença da área total de mucosa gástrica entre os grupos (**Figura 29**).

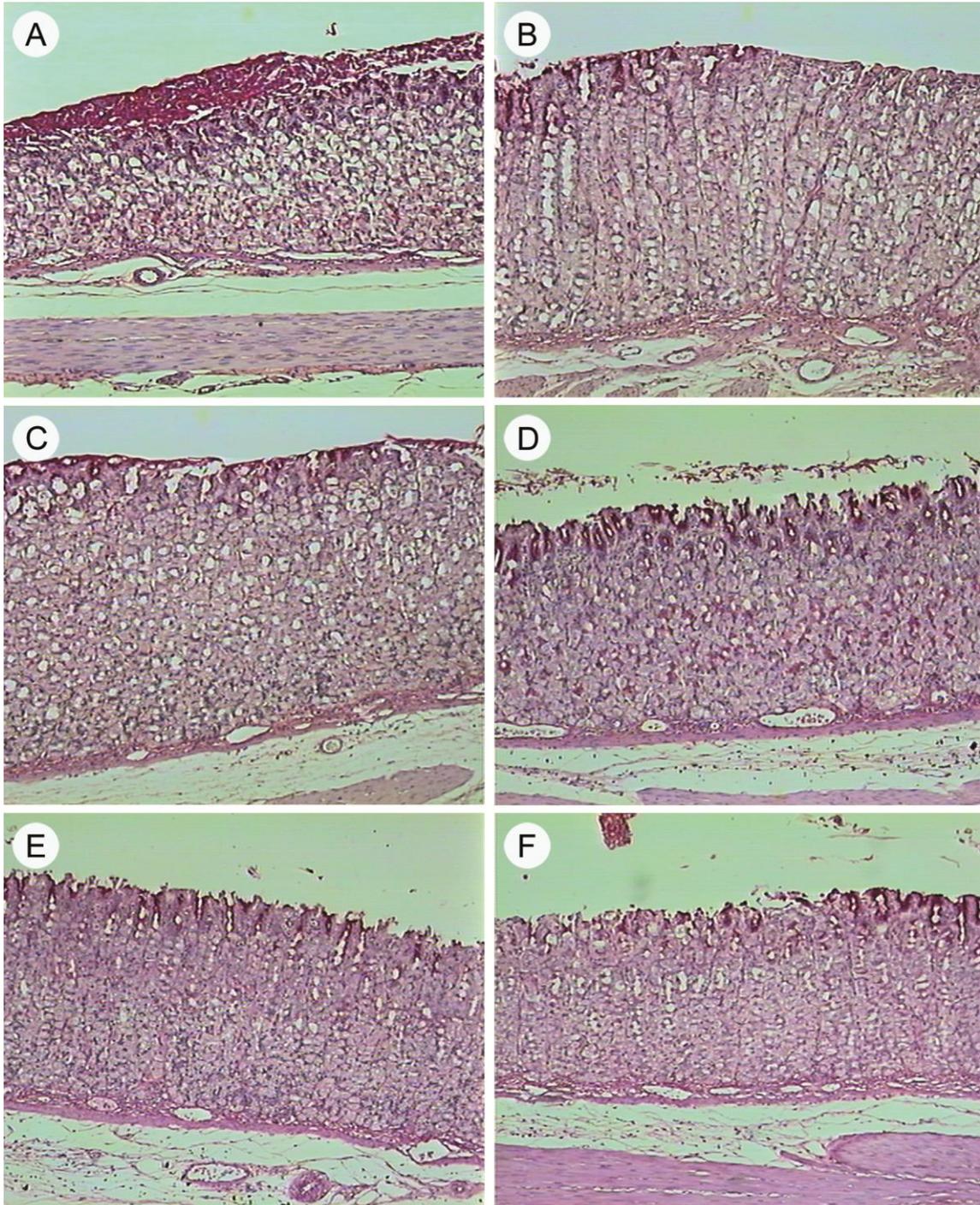


Figura 27 – Fotomicrografias da região glandular dos estômagos de ratos, evidenciando o efeito sobre o muco gástrico corado pelo PAS. Modelo experimental: lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg *p.o.* (A) grupo intacto, não recebeu etanol; (B) grupo controle, veículo (CMC 0,5%); (C) EEC, 1200 mg/kg; (D) FAEC, 1200 mg/kg; (E) sucralfato, 400 mg/kg, (F) cimetidina 100 mg/kg. (PAS, 100x)

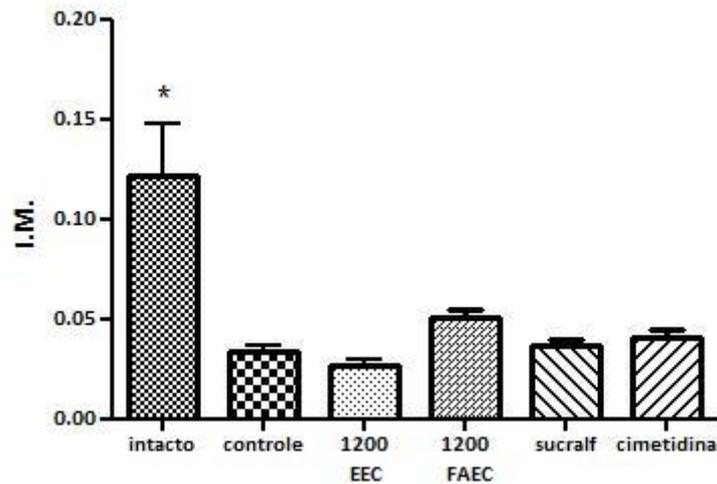


Figura 28 – Índice de muco (I.M.) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões gástricas por indometacina 40 mg/kg *p.o.* após administração *p.o.* de EEC ou FAEC na dose de 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). *significativamente diferente do grupo controle – teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

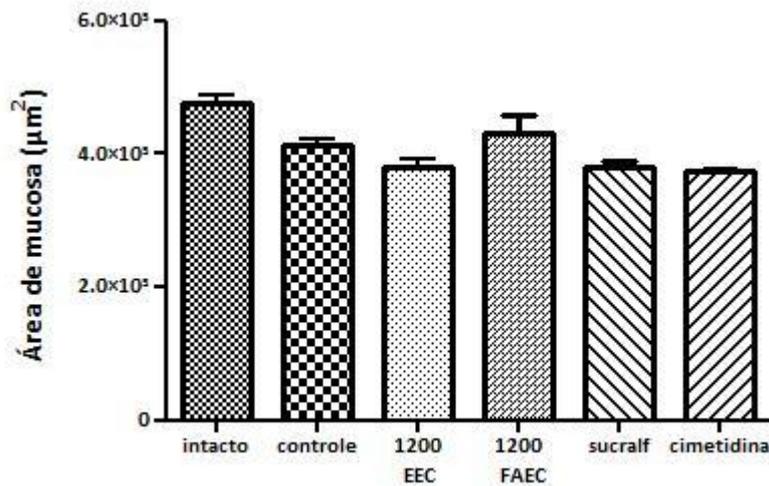


Figura 29 – Área de mucosa gástrica (µm²) de ratos não tratados (intacto) e submetidos à indução de lesões gástricas por indometacina 40 mg/kg *p.o.* após administração *p.o.* de EEC e FAEC na dose de 1200 mg/kg, sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou veículo (controle). As barras representam o erro padrão da média. (N=6 animais por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos. Teste *Newman-Keuls* ($p < 0,05$).

5.4 Análise comparativa entre modelos

A partir dos resultados obtidos na análise macroscópica, foram construídas curvas dose-resposta de EEC e FAEC, plotando-se a área das zonas hemorrágicas (mm^2) ou a porcentagem de proteção (%) *versus* log da dose para os modelos de lesões gástricas induzidas por etanol (**Figura 30**) ou indometacina (**Figura 31**).

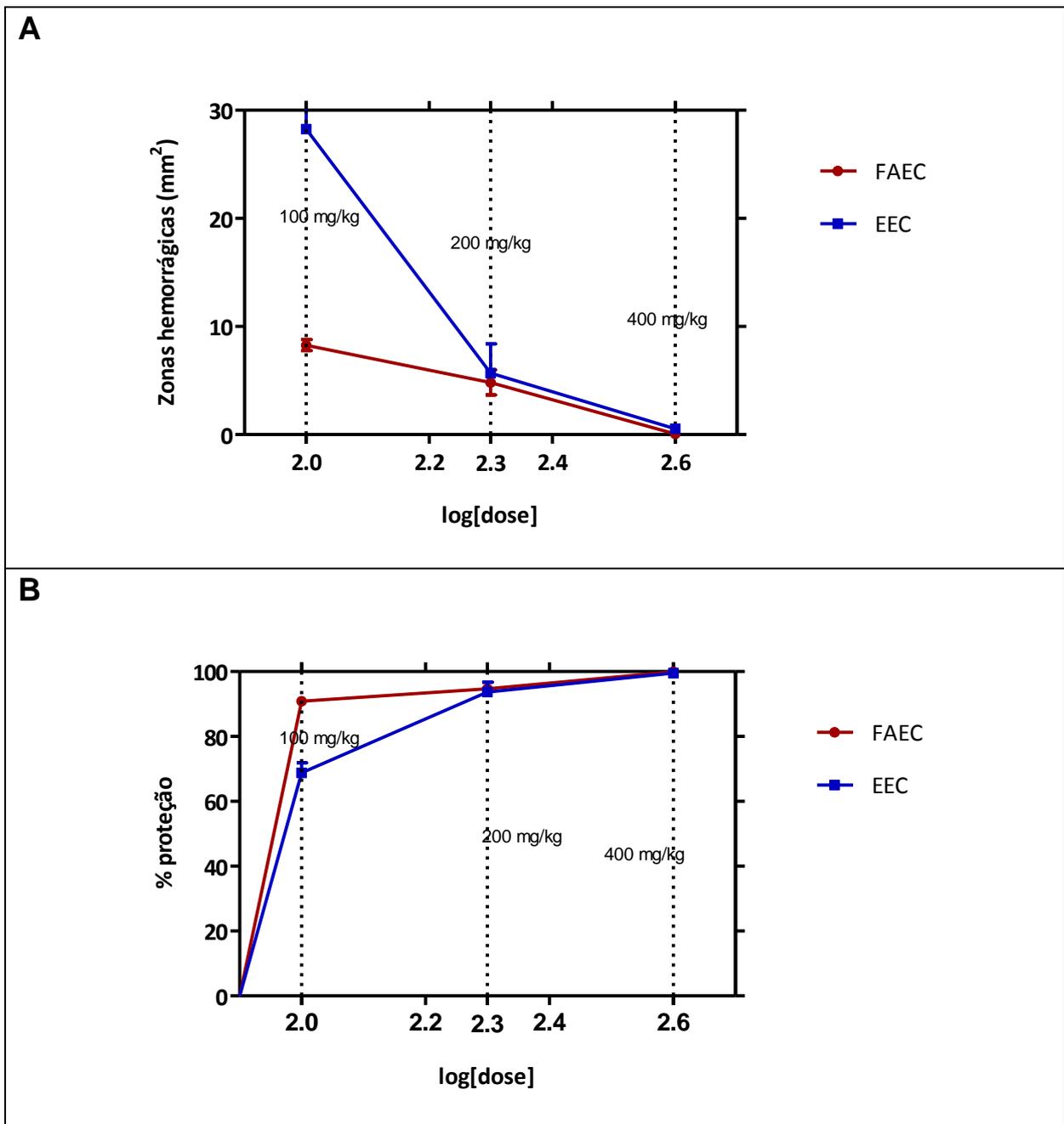


Figura 30 – Curva dose-resposta de EEC e FAEC em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol em ratos. Doses: 100, 200 ou 400 mg/kg. Resposta expressa em área de lesão em mm^2 (A) e % de proteção (B). As barras representam o erro padrão da média.

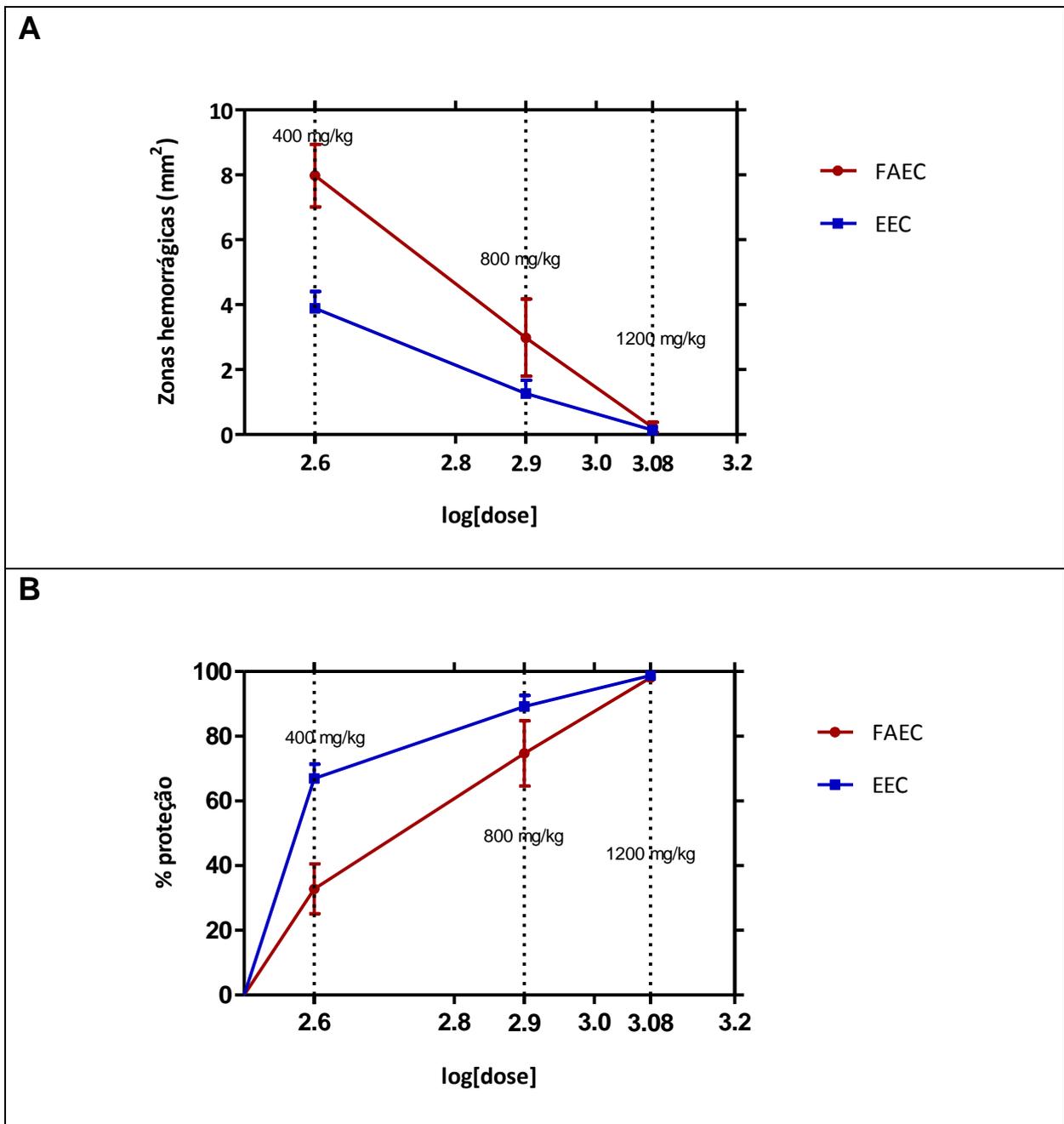


Figura 31 – Curva dose-resposta de EEC e FAEC em modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg *p.o.* em ratos. Doses: 400, 800 ou 1200 mg/kg. Resposta expressa em área de lesão em mm² (A) e % de proteção (B). As barras representam o erro padrão da média.

A diferença de proteção obtida com EEC e FAEC foi mais acentuada para as menores doses avaliadas, ou seja, 100 mg/kg, para modelo do etanol e 400 mg/kg, para modelo da indometacina. Nessas doses, verifica-se maior proteção gástrica com FAEC no modelo do etanol e com EEC no modelo da indometacina (**Figura 32**).

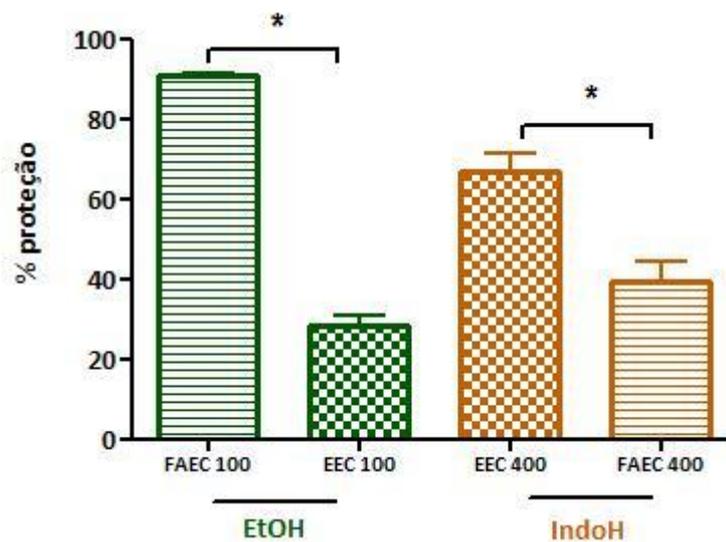


Figura 32 – Porcentagem de proteção gástrica (%) em ratos submetidos à indução de lesões por etanol e indometacina 40 mg/kg *p.o.*, após administração *p.o.* de EEC ou FAEC nas doses de 100 mg/kg ou 400 mg/kg. As barras representam o erro padrão da média (N=6 animais por grupo). *diferença significativa entre os grupos – teste *T-Student não pareado* ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Toxicidade aguda

Devido à ausência de óbito no estudo de toxicidade aguda, assim como ausência de sinais clínicos e alterações comportamentais graves ou moderadas no *screening* toxicológico, EEC e FAEC foram enquadradas na Classe 5 (droga com DL₅₀ superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerada de baixa toxicidade aguda. O uso tradicional (MARKMAN *et al.*, 2004; DICKEL *et al.*, 2007), conhecimento do perfil fitoquímico (OSORIO *et al.*, 2006; BARBOSA, 2009), ausência de substâncias potencialmente tóxicas, tais como alcaloides pirrolidínicos (BARBOSA, 2009), além do conhecimento científico de outras espécies da família Myrtaceae (UGBABE *et al.*, 2010; YELE e VEERANJANEYULU, 2010) e do gênero *Campomanesia* (MARKMAN *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2008) deram suporte à escolha da dose inicial de 2000 mg/kg para o estudo de toxicidade aguda dos extratos de *C. lineatifolia* pelo método de classes, sendo essa a dose máxima recomendada pelo Guia 423 (OECD, 2001b).

A constipação leve induzida por ambos os extratos está de acordo com o uso tradicional como antidiarreico de espécies do gênero (PIO CORREA, 1952, *apud* DICKEL *et al.*, 2007). Como essa alteração foi leve e reversível após algumas horas, não foi considerada indicativa de toxicidade aguda relevante. No entanto, seria interessante uma avaliação específica do efeito induzido pelos extratos sobre a defecação de animais sadios ou em estados patológicos. Foi revelado que a quercitrina, uma das substâncias flavonoídicas presente nos extratos, possui atividade no modelo de colite experimental em ratos, nas doses de 1 e 5 mg/kg (DEMEDINA *et al.*, 1996). A quercitrina também apresentou atividade, na dose de 50 mg/kg, em modelo de diarreia induzida por óleo de rícino e polietilenoglicol em camundongos (GALVEZ *et al.*, 1993). Dessa forma, essa pode ser uma possível nova aplicação do extrato, também relacionada ao TGI.

A redução da atividade geral, detectada na primeira hora, do grupo de animais que recebeu FAEC foi leve e reversível na segunda hora. Sendo assim, não foi considerada um sinal de toxicidade aguda relevante. A FAEC, por ser um produto

de partição de EEC, contém menor número de substâncias que, por sua vez, estão presentes em maior concentração. É possível que uma ou mais dessas substâncias possam induzir efeito sedativo leve que só possa ser observado no grupo de ratas tratadas com FAEC devido à maior dose relativa de substância ativa nessa fração em relação ao EEC. Isso possibilitaria atingir a concentração mínima efetiva, isto é, a concentração a partir da qual o efeito é observado. A atividade sedativa de glicosídeos de flavonol é uma propriedade previamente descrita na literatura. Quercitrina e isoquercitrina foram avaliadas por Kang *et al.* (2000), e ambos os compostos aumentaram o tempo de sonolência induzido por pentobarbital em camundongos de maneira dose-dependente.

No estudo de toxicidade aguda foi também observado que o grupo tratado com FAEC apresentou ligeira redução no ganho de massa corporal na primeira semana. Tal redução foi também reversível, sendo que, ao final do experimento, os animais desse grupo apresentaram massa corporal média equiparável àquela dos animais controle ou do grupo EEC. A variação de massa corporal e o consumo de água e ração são dados de fácil obtenção, mas são variáveis de extrema importância no que se refere à toxicidade. Um rato saudável pode ingerir até 20 g de alimento seco por dia, equivalente a 50 kcal. Alterações na massa e consumo de água e alimentos de modo diferente do esperado podem ser sinal do desenvolvimento de doenças e alterações tanto centrais como periféricas (SUCKOW *et al.*, 2006). Existem registros na medicina tradicional do uso de espécies do gênero *Campomanesia* para perda de peso (DICKEL *et al.*, 2007). Além disso, Biavatti *et al.* (2004) demonstraram que ratos submetidos à dieta hipercalórica e tratados com infusão aquosa de *Campomanesia xanthocarpa* por quatro semanas apresentaram menor ganho de massa quando comparados ao grupo controle.

Outro parâmetro que indica a segurança do EEC e da FAEC foi a ausência de alterações morfológicas nos órgãos avaliados. Além disso, não houve aumento da massa relativa do baço, rins, fígado, pulmões, cérebro e estômago.

A menor massa relativa dos pulmões e fígado dos animais tratados com EEC e FAEC, embora estatisticamente diferente do grupo controle, não sugere uma alteração clinicamente importante no que se refere à toxicidade aguda. Nos estudos

de toxicidade, é mais comum observar o aumento da massa relativa dos órgãos como sinal de alterações estruturais decorrentes da toxicidade da preparação avaliada (DIALLO *et al.*, 2010; BEVILACQUA *et al.*, 2011). O aumento da massa tecidual pode caracterizar uma resposta inespecífica do organismo frente à droga e pode ocorrer devido à formação de edema, nódulos ou expansão fibrosa, por exemplo (BOGLIOLO, 2006). Cabe também ressaltar que alterações pulmonares podem ser decorrentes de aspiração de partículas durante a administração intragástrica e, por isso, devem ser analisadas com cautela (BROWN *et al.*, 2000; SUCKOW *et al.*, 2006). EEC e FAEC são extratos parcialmente solúveis nas concentrações utilizadas nesse estudo, o que implica em maior número de partículas presentes nessas suspensões passíveis de aspiração pulmonar quando comparadas ao veículo somente (CMC 0,5%).

A similaridade entre a maioria dos parâmetros e variáveis avaliadas no estudo de toxicidade aguda sugere que o EEC e a FAEC possuem perfis de segurança similares.

6.2 Atividade farmacológica

A quantificação de lesões gástricas em ratos é um método amplamente utilizado para se avaliar atividade gastroprotetora tanto de substâncias sintéticas como de produtos naturais (CHANDRANATH *et al.*, 2002; ALQASOUMI *et al.*, 2009; ARAWWAWALA *et al.*, 2010). No presente estudo, o efeito gastroprotetor de EEC e FAEC foi evidenciado pela inibição significativa das áreas de zonas hemorrágicas e de necrose induzidas tanto por etanol, como por indometacina. O extrato e a fração reduziram as lesões gástricas de maneira significativa em ambos os modelos, inclusive nas doses mais baixas.

A atividade antiulcerogênica de extratos vegetais contendo flavonoides é reportada com frequência em modelos experimentais de úlcera gástrica (LEWIS *et al.*, 1999; JORGE *et al.*, 2004; ZAMORA *et al.*, 2008; ALQASOUMI *et al.*, 2009; POTRICH *et al.*, 2010). Markman *et al.* (2004) avaliaram a atividade gastroprotetora de um extrato de *Campomanesia xanthocarpa* obtido de maneira semelhante ao EEC, por

percolação com etanol e secagem em temperatura de 40 a 45 °C. Nesse estudo, o rendimento extrativo reportado para o extrato *C. xanthocarpa* foi igualmente semelhante (18,2%) ao extrato de *C. lineatifolia* utilizado no presente estudo (23,6%). Com a dose de 400 mg/kg de *C. xanthocarpa*, foi obtido 62,0% de proteção no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol (Markman *et al.*, 2004). No presente estudo, o resultado obtido com EEC, também na dose de 400 mg/kg, foi superior (99,6%), o que pode ser indicativo da maior atividade da espécie *C. lineatifolia* quando comparada à *C. xanthocarpa* nesse modelo.

No modelo de lesões gástricas induzidas por etanol, verificaram-se extensas zonas hemorrágicas e áreas de necrose na mucosa gástrica dos animais controle, o que comprova a gastrototoxicidade desse agente. Um dos principais mecanismos atribuídos para o efeito gastrotóxico do etanol é a alteração da homeostase celular gástrica com dano tecidual resultante de sua ação direta na mucosa e formação de RLs e EROs (ROZZA *et al.*, 2011.; REPETTO e LLESUY, 2002). Os RLs e EROs são produzidos por ação direta (ataque oxidativo) ou indireta (conseqüências dos mecanismos de defesa celular). Grande variedade de biomoléculas orgânicas, como vitaminas A, C e E, aminoácidos e GSH reagem com radicais produzindo um segundo radical menos reativo que o primeiro. Por isso, muitos autores consideram essas substâncias como sequestradores ou antioxidantes naturais que podem proteger o organismo contra os efeitos deletérios dos radicais decorrentes de processos patológicos (ROBERFROID e CALDERON, 1995). Os resultados obtidos no presente estudo, no modelo de lesões gástricas induzidas por etanol, estão de acordo com o potencial antioxidante *in vitro* obtido anteriormente (BARBOSA, 2009). Sugere-se que a maior proteção induzida pela FAEC (90,9%) quando comparado ao EEC (68,8%), na dose de 100 mg/kg, pode estar relacionada ao seu maior teor de flavonoides e maior potencial antioxidante (BARBOSA, 2009).

A proteção exercida por EEC (93,7%) e FAEC (94,7%) foi equivalente à proteção exercida pelo sucralfato (98,6%) na dose de 200 mg/kg. Os resultados obtidos para o sucralfato no modelo do etanol estão de acordo com os dados encontrados na literatura (ARISAWA *et al.*, 2006; ARAWWAWALA *et al.*, 2010). Foi reportado que o sucralfato exerce efeito protetor e acelera a cicatrização das lesões gástricas ao estabilizar e adsorver vários fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento

de fibroblastos (ARISAWA *et al.*, 2006). Outros mecanismos pelos quais o sucralfato exerce a citoproteção gástrica incluem a supressão de necrose *in vitro* (HOSHINO *et al.*, 2003) e a prevenção da diminuição do fluxo sanguíneo induzida pelo etanol que é mediada pelo aumento das concentrações de PGs e NO (KONTUREK *et al.*, 1992).

Para a cimetidina, na dose de 50 mg/kg, a proteção obtida (47,7%) foi menor que aquelas induzidas por todas as doses de EEC ou FAEC. De acordo com alguns estudos, as lesões induzidas por etanol são inibidas principalmente por agentes que aumentam a defesa da mucosa gástrica (MALAIRAJAN *et al.*, 2007). A cimetidina é um antagonista de receptor H₂ e produz seus efeitos principalmente por meio da inibição da secreção ácida (SCHUBERT e PEURA, 2008; GUSTAFSON e WELLING, 2010). É bem estabelecido que ácido intragástrico exerce papel importante na progressão das lesões (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Alguns trabalhos relatam a ausência de efeito induzido pelos agentes antissecretores frente à agressão por etanol. Contudo, essa ausência pode ser explicada pelo uso do etanol acidificado (EtOH-HCl) como agente agressor (ARISAWA *et al.*, 2006). Sendo assim, a cimetidina não induz efeito direto na redução das lesões induzidas por etanol, mas efeito indireto, ao impedir o agravamento das lesões formadas por diminuição da retrodifusão ácida, que é acentuada nas células danificadas. Isso explica a menor proteção exercida pela cimetidina no modelo do etanol. A boa resposta obtida por EEC e FAEC nesse mesmo modelo indica que os extratos atuam provavelmente aumentando a defesa da mucosa gástrica. Diante de características inerentes do próprio modelo experimental de lesões gástricas induzidas por etanol, como o curto período de tempo entre a administração dos agentes gastroprotetor e agressor e da eutanásia dos animais, parece claro que a ação local (tópica) de EEC e FAEC é importante.

O pré-tratamento com todas as doses de EEC e FAEC também resultou na redução substancial das lesões gástricas induzidas por indometacina. A indometacina é um AINE que se tornou de primeira escolha em modelos experimentais de úlcera gástrica devido ao seu alto potencial ulcerogênico quando comparado a outros AINEs. Embora seu mecanismo de ação ulcerogênico não esteja totalmente

esclarecido, acredita-se que a indometacina e outros AINEs induzam o dano gástrico principalmente devido aos seus efeitos sistêmicos, ou seja, ao inibir as enzimas COX-1 e COX-2, reduzindo assim as concentrações locais de PGs (SULEYMAN *et al.*, 2010).

O efeito protetor gástrico induzido pelas PGs é exercido por meio de redução da secreção ácida, aumento da produção de muco, bicarbonato e fatores de crescimento. Outros mecanismos descritos na literatura para fármacos capazes de reduzir lesões gástricas induzidas por indometacina incluem aumento de NO, inibição de granulócito elastase, abertura de canais de potássio ATP dependentes, redução das concentrações de adrenalina e proteínas de choque térmico (VANE e BOTTING, 1998; WALLACE, 2008; MUSUMBA *et al.*, 2009).

O papel dos EROs também é descrito para a toxicidade induzida pela indometacina. Duas horas após a sua administração oral, ocorre aumento agudo na produção de superóxido e peróxido de hidrogênio na mucosa gástrica (HASSAN *et al.*, 1998). Por isso, a atividade antioxidante de EEC e FAEC pode contribuir efetivamente na proteção frente ao dano induzido por indometacina. Contudo, diferentemente do modelo de lesões induzidas por etanol, a maior proteção de EEC 400 mg/kg (67,0%), quando comparado a FAEC na mesma dose (32,3%) no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina, indica que existem outras substâncias, presentes exclusivamente em EEC, que podem contribuir de maneira efetiva para a proteção gástrica por meio de mais de um mecanismo.

É possível que a proteção gástrica de EEC e FAEC seja mediada por mecanismos descritos na literatura para a quercitrina, catequina já que essas substâncias foram identificadas no perfis fitoquímicos e isoladas tanto de EEC como de FAEC (BARBOSA, 2009). Foi demonstrado que esses polifenóis relaxam a musculatura vascular e musculatura lisa, inibem a degranulação de mastócitos e protegem contra o dano gástrico causado por RLs (DOUBOVA *et al.*, 2007; RAO e VIJAYAKUMAR, 2007; CAPASSO *et al.*, 2008).

Sato *et al.* (2002) demonstraram que a catequina inibe a liberação de gastrina, SST e histamina, em ratos com lesões gástricas induzidas por estresse (SATO *et al.*,

2002) e induzem efeito vasodilatador em diferentes tecidos, incluindo estômago de rato. Nesse estudo, foi sugerido que o efeito vasodilatador da catequina é mediado por múltiplas vias, como o bloqueio do influxo de Ca^{2+} e o estímulo da produção de NO (GHAYUR *et al.*; 2007). Uma vez que a regulação da secreção ácida e o fluxo sanguíneo da mucosa são fatores essenciais para a manutenção da integridade gástrica (LAINE *et al.*, 2008) e que a catequina é uma das substâncias presentes em EEC e FAEC (Barbosa, 2009), é possível que os mecanismos hormonal e vasodilatador descritos para essa substância possam também contribuir para a atividade gastroprotetora do extrato e da fração.

Devido ao maior número de substâncias potencialmente ativas em EEC, é possível que ocorra sinergismo, o que poderia explicar, em parte, seu maior efeito no modelo de lesões induzidas por indometacina. O termo sinergia significa que a mistura de duas ou mais substâncias confere efeito biológico maior que a soma dos efeitos individuais ministrados na mesma dose. Tal efeito pode ocorrer por associação química entre as substâncias, facilitando o transporte celular e biodisponibilidade, pela contribuição de múltiplos mecanismos de ação farmacológica, pelo antagonismo de mecanismos de resistência a patógenos, entre outros fatores que permanecem obscuros. Há evidências de que extratos totais ou parciais provenientes de plantas, muitas vezes, apresentam atividade farmacológica superior à dose similar de uma substância isolada desses (WAGNER *et al.*, 2010).

Os taninos presentes em EEC e FAEC (BARBOSA, 2009) podem ser incluídos no grupo de substâncias potencialmente responsáveis pela atividade gastroprotetora demonstrada no presente estudo. Alguns taninos podem aumentar ou diminuir a atividade de enzimas e hormônios dependendo da sua concentração (OKUDA, 2005). Por exemplo, diversos taninos hidrolizados inibiram a liberação de histamina de mastócitos de rato (KANOH *et al.*, 2001). Já os ácidos cafeoilquínicos, derivados de *Lychnophora ericoides*, em baixas concentrações, reduziram as concentrações de PGE_2 , ao passo que, em concentrações mais elevadas, estimularam tanto a produção de PGE_2 como TNF- α em cultura de células (DOS SANTOS *et al.*, 2010). Alguns taninos hidrolizados e proantocianidinas induziram a expressão da cNOS (KOLODZIEJ *et al.*, 2005). Além disso, alguns autores relatam que os taninos presentes em extratos vegetais podem formar uma barreira física na mucosa

gástrica ao se ligar a proteínas do muco e, dessa forma, poderiam tanto evitar a formação de úlceras, quanto facilitar a sua cicatrização (DA SILVA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

Até o momento, não foram encontrados estudos com espécies do gênero *Campomanesia* em modelos de lesões gástricas induzidas por AINEs. Os resultados obtidos com EEC e FAEC, embora sejam provenientes de um estudo agudo, dão suporte à continuidade da linha de pesquisa dos derivados vegetais de *C. lineatifolia* como alternativa para tratamento de sintomas gástricos em pacientes usuários crônicos de AINEs.

O aumento do volume gástrico em relação aos animais intactos observado no grupo controle, EEC (100 e 200 mg/kg), FAEC (100 mg/kg), sucralfato e cimetidina pode ser atribuído ao extravasamento de líquido extracelular para o lúmen, possivelmente pelo edema causado pelo dano tecidual. Diferentemente do pH gástrico humano (1-2), o pH gástrico dos ratos em condições fisiológicas é ligeiramente mais elevado (3-4) (SUCKOW *et al.*, 2006). O maior pH verificado para o grupo tratado com cimetidina (pH 7,7) está de acordo com sua propriedade de inibir a secreção ácida (YEOMANS, 2009). O pH gástrico do grupo controle (pH 5,8) pode ser explicado considerando a extensa zona hemorrágica, ou seja, a presença de sangue no conteúdo gástrico pode ser responsável pela elevação do pH desse grupo.

No modelo da indometacina, o pH gástrico foi ligeiramente mais elevado nos grupos tratados com cimetidina (pH 4,9), FAEC nas doses de 800 mg/kg ou 1200 mg/kg, ambos com pH de 4,5; quando comparados ao grupo intacto (pH 3,1). Como esperado, o aumento do pH do grupo que recebeu cimetidina, apesar de existente, foi menos intenso que aquele observado no modelo do etanol, já que o tempo de meia-vida dessa droga é curto (JAIN *et al.*, 2007; LE TRAON *et al.*, 2009) e a medida de pH foi realizada, após seis horas da indução das lesões, enquanto, no modelo com etanol, esse tempo foi bem menor (uma hora).

O ligeiro aumento de pH induzido pelas doses mais elevadas da fração pode ser atribuído à leve atividade sobre a secreção ácida. No entanto, análises mais aprofundadas e especificamente relacionadas com a secreção ácida são

necessárias para confirmar esse dado preliminar. Alguns flavonoides, como a quercetina, inibem a histidina descarboxilase, diminuindo assim a produção de histamina, o que leva à redução da secreção ácida pelas células parietais (MOTA *et al.*, 2009). Beil *et al.* (1995) demonstraram que a quercetina induz efeito inibidor na atividade da H⁺/K⁺ ATPase, o qual foi relacionado a sua capacidade de reagir com o ATP.

A quercetina corresponde à aglicona da quercitrina, substância presente em EEC e FAEC. Grande parte dos flavonoides se encontra glicosilada nas espécies vegetais. Entretanto, estudos a respeito da farmacocinética dessas substâncias indicam que elas podem ser rapidamente absorvidas após ação de glicolisades epiteliais- β presentes no TGI. A deglicosilação é, portanto, uma etapa crítica na absorção e biodisponibilidade desses compostos (NEMETH *et al.*, 2003; GEE *et al.*, 2004). Lu *et al.* (2010) demonstraram que, após administração *per os* em ratos de glicosídeos de luteolina e apigenina, a magnitude de deglicosilação foi de 30% no estômago e intestino delgado, sendo a concentração plasmática detectada nos primeiros cinco minutos após a ingestão. Esses dados são indicativos que EEC e FAEC podem exercer efeitos tópicos e, pelo menos em parte, sistêmicos, uma vez que existem substâncias potencialmente ativas facilmente absorvidas pelo TGI.

Apesar das diferenças anatômicas e na área relativa de superfície de absorção, existem grandes similaridades morfológicas, principalmente em nível microscópico, entre o TGI de ratos e humanos (DESESSO e JACOBSON, 2001). A análise microscópica permitiu visualizar as lesões gástricas evidenciando dano tecidual, úlceras e morte celular por necrose. A distribuição das lesões foi difusa e relativamente homogênea, ou seja, as áreas de necrose ou úlcera se encontravam espalhadas por todas as regiões do corte histológico entre regiões sem alterações aparentes. Como esperado, o dano tecidual microscópico foi evidente para os grupos controles tratados tanto com etanol como com indometacina.

Morini *et al.* (1995) relataram que, após três horas de sua administração oral em ratos, a indometacina causa extensa vasoconstrição, edema na região subepitelial, erosões superficiais e marginação de leucócitos. No presente estudo, foi verificado o dano gástrico por necrose de 4,95% e 1,68% da área da parede gástrica (mucosa,

submucosa, muscular e serosa) para etanol e indometacina, respectivamente. Um estudo, também com ratos, mostrou que, após quatro horas, a indometacina, na dose de 20 mg/kg, induziu dano gástrico compreendendo 10% da área total da mucosa. Já a análise histológica da mucosa gástrica após administração intragástrica de etanol absoluto mostrou lise celular com esfoliação, células epiteliais vacuolizadas com núcleos picnóticos e citoplasma fracamente corado. O dano total foi de 13% da área da mucosa gástrica (NATALE *et al.*, 2001).

Os achados microscópicos encontrados para EEC e FAEC estão de acordo com os macroscópicos. As áreas de necrose e úlcera dos grupos tratados com EEC e FAEC também foram reduzidas de maneira dose-dependente em ambos os modelos avaliados quando comparados ao grupo que recebeu somente o agente agressor. Bharti *et al.* (2010) relataram a preservação da integridade da mucosa de ratos tratados extratos de *Calotropis procera*, e extenso dano da mucosa e submucosa com perda da integridade tecidual e estrutura glandular dos animais que receberam apenas etanol. Porém, os resultados apresentados foram qualitativos. São escassos os estudos na literatura envolvendo extratos vegetais que avaliam quantitativamente o dano microscópico em modelos de úlcera gástrica.

A análise quantitativa da área de mucosa mostrou ligeira redução em todos os grupos que receberam etanol quando comparados ao grupo intacto. Já no modelo da indometacina, não houve diferença significativa entre os grupos. A redução na área de mucosa gástrica é um sinal de toxicidade importante, uma vez que a mucosa mais fina apresenta menor resistência. O encurtamento tanto da área de superfície como no comprimento circular e longitudinal do estômago é relatado com o envelhecimento do órgão, o que o torna, pelo menos em parte, mais susceptível a manifestações patológicas (IWABUCHI, 2008). Embora estatisticamente significativa, a alteração detectada para EEC e FAEC foi pequena e, por isso, não foi considerada clinicamente relevante.

A quantificação da coloração PAS+ e determinação de I.M. é um método eficiente para se estimar o muco gástrico, uma vez que as glicoproteínas coradas pelo PAS são as mais abundantes e possivelmente as mais importantes na mucosa gástrica (DELALASTRA *et al.*, 1994). No presente estudo, foi observado que o etanol e a

indometacina induziram a depleção dos níveis de muco. Pode-se inferir que a restituição quantitativa do I.M. até valores comparáveis àqueles observados em animais intactos indica a recuperação da capacidade de defesa da mucosa frente à agressão produzida, seja por etanol ou indometacina. Esse efeito foi evidenciado com a administração da FAEC (400 mg/kg) no modelo do etanol.

A camada aderente de gel de muco que recobre toda a extensão do epitélio gástrico é amplamente descrita como importante barreira pré-epitelial frente à autodigestão da mucosa pelo ácido clorídrico e pepsina (LAINE *et al.*, 2008; WALLACE, 2008). No entanto, mesmo em condições fisiológicas, a pepsina promove lenta digestão dessa camada na superfície luminal, formando mucina degradada solúvel. Em condições patológicas, como é o caso da UP, há aumento da atividade mucolítica do suco gástrico que pode ser associado com o comprometimento da estrutura polimérica das mucinas (COPEMAN *et al.*, 1994). Foi relatado que, no estômago de pacientes *H. pylori* positivos, a camada aderente de gel de muco se torna mais fina com o envelhecimento (NEWTON *et al.*, 2000; KISHIMOTO *et al.*, 2001).

O fato da diminuição de I.M. não ter sido revertido para a maioria dos grupos tratados, inclusive com sucralfato e cimetidina, pode ser explicado pela elevada dose dos agentes agressores utilizados. Nos modelos experimentais, a agressão extrema induzida por etanol e indometacina permitiu visualizar a eficácia dos tratamentos na redução das lesões, porém essa mesma eficácia não pode ser observada no que se refere ao muco gástrico. Essa evidência dá suporte à teoria de que a camada de gel de muco é a principal barreira protetora, sendo também a primeira linha de defesa da mucosa gástrica (LAINE *et al.*, 2008). É possível que com maior tempo de tratamento ou com doses menores de agentes irritantes os efeitos sobre o muco possam ser mais perceptíveis.

Embora os tratamentos, inclusive com os controles positivos, não tenham propiciado diferença significativa no I.M., o resultado obtido para o grupo tratado com FAEC 400 mg/kg (etanol), confirma que o aumento da secreção de muco pode estar envolvido nos mecanismos de ação da *C. lineatifolia*. Nesse mesmo grupo, foi detectada diferença na distribuição do muco na mucosa gástrica, com redução da coloração PAS+, na primeira fatia, e aumento, na quarta fatia, quando comparado ao

grupo de animais intactos. A maior secreção de muco na quarta fatia se deve, provavelmente, à tentativa de compensar o dano da primeira região. Esse resultado ilustra o restabelecimento da homeostase que caracteriza o processo de defesa da mucosa gástrica amplamente descrita na literatura (SIKIRIC *et al.*, 1999; LAINE *et al.*, 2008; TULASSAY e HERSZENYI, 2010).

Mesmo a dose mais elevada de EEC e FAEC (1200 mg/kg) não foi capaz de reverter a redução de I.M. no modelo de lesões gástricas induzidas por indometacina. Nesses grupos, apesar de valores de proteção superiores a 98%, calculados a partir da área das zonas hemorrágicas e confirmados microscopicamente pela reduzida área de necrose, a perda do muco já indica sinais de toxicidade inicial, decorrentes da elevada dose de indometacina, que impediu a visualização do efeito em I.M.. Além disso, como a indometacina induz a formação de EROs preferencialmente no microambiente hidrofóbico da mucosa gástrica (camada de muco ou interface entre as células epiteliais) (UTSUMI *et al.*, 2006), sua administração pode ter efeito mais drástico que a ação por etanol no que se refere ao I.M..

Diferentemente do etanol, que induz formação imediata de RLs e EROs devido ao seu efeito tóxico direto, com a indometacina ocorre sua formação e decaimento de maneira gradual. Utsumi *et al.* (2006) verificaram a concentração máxima dessas espécies em uma hora após administração *per os* e decaimento após três horas, utilizando espectroscopia de ressonância por *spin* eletrônico. Nesse mesmo estudo, ainda foi destacado que o coeficiente de partição dos antioxidantes pode interferir de maneira significativa na proteção exercida no modelo de indometacina, enquanto em outros modelos isso não é observado.

Outro aspecto importante é que a inibição da formação de PGs induzida pela indometacina pode ter contribuído para que secreção de muco não fosse restituída a valores equivalentes ao do grupo intacto, mesmo com o aumento da dose dos extratos. Phillipson *et al.* (2008) demonstraram que a administração de indometacina na dose de 3 mg/kg (*i.v.*) diminui tanto a secreção como a espessura da camada de gel de muco em ratos. Por outro lado, a administração luminal de PGE₂ (10 µg/mL) aumentou a taxa de acúmulo de muco em mais de quatro vezes.

Nos últimos anos, os tratamentos da medicina clássica baseados em longo tempo de uso de um único fármaco, geralmente quimiosintético, tem sofrido transição gradual para uma nova abordagem multiterapêutica. Essa mudança de paradigma também pode ser caracterizada por novos tratamentos com múltiplos alvos direcionados, principalmente, para a ativação de mecanismos de defesa, proteção e reparo. Tais estratégias se baseiam em experiências clínicas e na constatação de que processos patofisiológicos complexos, como é o caso da úlcera gástrica, podem ser influenciados de forma mais efetiva e com menor incidência de efeitos adversos graves com a combinação de vários compostos ativos em baixa dosagem do que com uma alta dose de um composto isolado (WAGNER, 2005). Diante dessa afirmação, destacamos a vantagem que o extrato e a fração de *C. lineatifolia*, EEC e FAEC, poderiam oferecer quando comparados ao tratamento exclusivo com drogas referência, como o sucralfato e a cimetidina.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que o EEC e a FAEC apresentaram segurança, no estudo de toxicidade aguda, e induziram efeito gastroprotetor em roedores. Pela primeira vez foi demonstrada a atividade farmacológica *in vivo* de extratos de *C. lineatifolia*, o que contribui para a validação dos dados etnofarmacológicos dessa espécie. Após os estudos, foi verificado que o EEC representa o extrato mais promissor para o tratamento da ulcera gástrica, devido sua segurança e atividade, além do mesmo apresentar menor custo de obtenção quando comparado a FAEC.

Sendo assim:

- a) EEC e FAEC apresentaram segurança no teste de toxicidade aguda, o que viabiliza a realização de testes de toxicidade pré-clínicos de múltiplas doses;
- b) EEC e FAEC apresentaram atividade gastroprotetora em ratos, de maneira dose-dependente, nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, em modelo de lesões gástricas agudas induzidas por etanol, e nas doses de 400, 800 e 1200 mg/kg, no modelo de lesões gástricas agudas induzidas por indometacina;
- c) EEC e FAEC induzem efeito gastroprotetor, provavelmente, por mecanismos que envolvem o aumento da defesa da mucosa gástrica e atividade antioxidante devido, principalmente, à alta concentração de polifenóis;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL MOFLEH, I. A. *et al.* Aqueous suspension of anise (*Pimpinella anisum*); protects rats against chemically induced gastric ulcers. *World Journal of Gastroenterology* [S.I.], v. 13, n. 7, p. 1112-1118, Feb 2007.

ALQASOUMI, S. *et al.* "Rocket *Eruca sativa*": A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World Journal of Gastroenterology* [S.I.], v. 15, n. 16, p. 1958-1965, Apr 2009.

ARAWWAWALA, L. *et al.* Gastroprotective activity of *Trichosanthes cucumerina* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 127, n. 3, p. 750-754, Feb 2010.

ARISAWA, T. *et al.* Effects of sucralfate, cimetidine and rabeprazole on mucosal hydroxyproline content in healing of ethanol-HCl-induced gastric lesions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [S.I.], v. 33, n. 7, p. 628-632, Jul 2006.

BALLINGER, A. Cytoprotection with misoprostol – Use in treatment prevention of ulcers. *Digestive Diseases* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 37-45, Jan-Feb 1994.

BANERJEE, S. *et al.* *Pharmaceutical composition for treatment of peptic ulcer diseases, e.g. gastric ulcer, and also gastritis and gastro esophageal reflux disorder comprises compound oenothain C.* n. WO2007091165-A1; IN200600369-I1; EP1981510-A1; US2008274985-A1; AU2007319715-A1; AU2007213423-A1; CN101415430-A; JP2009526038-W, WO2007091165-A1 16 Aug 2007 A61K-031/7042 200767.

BARBOSA, J. *Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante.* Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. 133 p.

BARKUN, A.; LEONTIADIS, G. Systematic Review of the Symptom Burden, Quality of Life Impairment and Costs Associated with Peptic Ulcer Disease. *American Journal of Medicine* [S.I.], v. 123, n. 4, p. 358-U5, Apr 2010.

BEIL, W. *et al.* Effects of flavonoids on parietal-cell acid-secretion, gastric-mucosal prostaglandin production and helicobacter-pylori growth. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* [S.I.], v. 45-1, n. 6, p. 697-700, Jun 1995.

BEVILACQUA, A. H. V. *et al.* Toxicity of apolar and polar *Lantana camara* L. crude extracts in mice. *Research in Veterinary Science* [S.I.], v. 90, n. 1, p. 106-115, 2011.

BHARTI, S. *et al.* Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 440-444, Feb 2010.

BIAVATTI, M. W. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) JF Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 93, n. 2-3, p. 385-389, Aug 2004.

- BOGLIOLO, L. *Bogliolo Patologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1472p, 2006.
- BOMBARDIER, C. *et al.* Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 343, n. 21, p. 1520-1528, Nov 2000.
- BONILLA, A. *et al.* Champanones, yellow pigments from the seeds of champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry* [S.I.], v. 66, n. 14, p. 1736-1740, Jul 2005.
- BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity - prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 227-230, Apr 2004.
- BRASIL. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (DOU 18.03.04) - Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- BRASIL. Portaria Nº 971, DE 3 DE MAIO DE 2006 - Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, 2006
- BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (D.O.U. de 23.6.2006) - Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006b.
- BRASIL. PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 2.960, DE 9 DE DEZEMBRO DE 2008 - Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 2008.
- BRASIL. Consolidado de normas da Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados (COFID), Versão III. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamento/s/Publicacao+Medicamentos/ Medicamentos +fitoterápicos>> Acesso em: 30 jan. 2011.
- BROWN, A. P. *et al.* Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* [S.I.], v. 39, n. 1, p. 17-21, Jan 2000.
- BROWN, T. J. *et al.* A comparison of the cost-effectiveness of five strategies for the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal toxicity: a systematic review with economic modelling. *Health Technology Assessment* [S.I.], v. 10, n. 38, p. 1-+, Oct 2006.
- CALIARI, M.V. Princípios básicos de morfometria digital: KS 300 para iniciantes. Ed. UFMG, 149p, 1997.
- CAPASSO, R. *et al.* Inhibitory effect of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* [S.I.], v. 376, n. 6, p. 407-414, Feb 2008.
- CARDOSO, C. A. L. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 297-301, 2008.

CARDOSO, C. A. L. *et al.* Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). *Journal of Medicinal Food* [S.I.], v. 13, n. 5, p. 1273-1276, Oct 2010.

CARRASCO, F. R. *et al.* Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: Evidence for humor- and cell-mediated responses. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [S.I.], v. 61, n. 7, p. 961-967, 2009.

CHANDRANATH, S. I. *et al.* A comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in the rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 173-180, Mar 2002.

COPEMAN, M. *et al.* The gastroduodenal mucus barrier and its role in protection against luminal pepsins - The effect of 16,16-dimethyl prostaglandin-E(2), carbopol-polyacrylate, sucralfate and bismuth subsalicylate. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [S.I.], v. 9, p. S55-S59, 1994.

COUTINHO, I. D. *et al.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [S.I.], v. 45, n. 4, p. 767-776, 2009.

DANI, R. e CASTRO, L. P. *Gastroenterologia clínica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 1103p.

DA SILVA, M. S. *et al.* Abarema cochliacarpos: Gastroprotective and ulcer-healing activities. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 132, n. 1, p. 134-142, 2010.

DA SILVEIRA, P. F. *et al.* Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

D'EECKENBRUGGE G.C.; FERLA D.L. *Fruits from America: An ethnobotanical inventory* : CIRAD-FLHOR/IPGRI Project for Neotropical Fruits, 2000. Disponível em: <<http://www.cefe.cnrs.fr/ibc/pdf/coppens/Fruits%20from%20America/species%20Campomanesia.htm>> Acesso em: 26 jan. 2011.

DELALASTRA, C. A. *et al.* Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin - a gross and histologic study. *Pharmacology* [S.I.], v. 48, n. 1, p. 56-62, Jan 1994.

DEMEDINA, F. S. *et al.* Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [S.I.], v. 278, n. 2, p. 771-779, Aug 1996.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology* [S.I.], v. 39, n. 3, p. 209-228, Mar 2001.

DEWICK P.M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 515p, 2002.

DIALLO, A. *et al.* Acute and sub-chronic (28-day) oral toxicity studies of hydroalcohol leaf extract of *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [S.I.], v. 9, n. 5, p. 463-467, 2010.

DICKEL, M. L. *et al.* Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 109, n. 1, p. 60-71, Jan 2007.

DOS REIS TUROLLA, M. S.; DE SOUZA NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

DOS SANTOS, M. D. *et al.* Effects of Caffeoylquinic Acid Derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro Inflammatory Mediator Production. *Natural Product Communications* [S.I.], v. 5, n. 5, p. 733-740, May 2010.

DOUBOVA, S. V. *et al.* Effect of a *Psidium guajavae* folium extract in the treatment of primary dysmenorrhea: A randomized clinical trial. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 110, n. 2, p. 305-310, Mar 2007.

DRUGDEX® Evaluations, *Antacids* MICROMEDEX® 1.0 (Healthcare Series). Disponível em: <http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/9CEB05/DUPLICATIONSHIELDSYNC/25AEA6/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/12/ND_P/Main/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/0242/ContentSetId/31/SearchTerm/antacids/SearchOption/BeginWith> Acesso em: 31 out. 2010.

DRUGDEX® Evaluations, *Sucralfate* MICROMEDEX® 1.0 (Healthcare Series). Disponível em: <http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/9CEB05/DUPLICATIONSHIELDSYNC/25AEA6/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/7/ND_P/Main/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/0630/ContentSetId/31/SearchTerm/sucralfate%20/SearchOption/BeginWith> Acesso em: 21 dez. 2010.

DUDEJA, V. *et al.* The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases. *Gut* [S.I.], v. 58, n. 7, p. 1000-1009, 2009.

EISENBERG, D. M. *et al.* Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997 - Results of a follow-up national survey. *Jama-Journal of the American Medical Association* [S.I.], v. 280, n. 18, p. 1569-1575, Nov 1998.

ESPOSITO, D. A. *et al.* Treatment of gastrointestinal condition e.g. constipation and evacuation disorder, by administering pharmaceutical composition containing extract product of plant material of *Asclepias* plant to individual having gastrointestinal condition. n. US2009324757-A1, US2009324757-A1 31 Dec 2009 A61K-036/27 201006.

FAHEL, J. S. *et al.* IPSE/alpha-1 of *Schistosoma mansoni* egg induces enlargement of granuloma but does not alter Th2 balance after infection. *Parasite Immunology* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 345-353, May 2010.

- FILARETOVA, L. P. *et al.* Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [S.I.], v. 274, n. 6, p. G1024-G1030, Jun 1998.
- FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento, 2007.
- GALVEZ, J. *et al.* Antidiarrheic activity of quercitrin in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [S.I.], v. 45, n. 2, p. 157-159, Feb 1993.
- GEE, J. M. *et al.* Absorption and twenty-four-hour metabolism time-course of quercetin-3-O-glucoside in rats, in vivo. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [S.I.], v. 84, n. 11, p. 1341-1348, Aug 2004.
- GHAYUR, M. N. *et al.* Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Archives of Pharmacal Research* [S.I.], v. 30, n. 8, p. 970-975, Aug 2007.
- GOMES, S. M. *et al.* Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Botânica Brasílica*, v. 23, n. 1, p. 224-238, 2009.
- GRESSLER E. P. *et al.* Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, n. 4, p.509-530, 2006.
- GUBBELS-VAN HAL, W. *et al.* An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [S.I.], v. 42, n. 3, p. 284-295, Aug 2005.
- GUIDOBONO, F. *et al.* Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *British Journal of Pharmacology* [S.I.], v. 120, n. 4, p. 581-586, Feb 1997.
- GUIMARÃES, A. G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 883-887, 2009.
- GUSTAFSON, J.; WELLING, D. "No Acid, No Ulcer"-100 Years Later: A Review of the History of Peptic Ulcer Disease. *Journal of the American College of Surgeons* [S.I.], v. 210, n. 1, p. 110-116, Jan 2010.
- GYIRES, K. *et al.* Activation of central opioid receptors may induce gastric mucosal defence in the rat. *Journal of Physiology-Paris* [S.I.], v. 95, n. 1-6, p. 189-196, Jan-Dec 2001.
- HALDER, S. *et al.* Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. *Planta Medica* [S.I.], Article in press, artigo aceito, em processo de publicação, disponível online em: <<https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1250605>>, 2011.
- HARI KUMAR, C. *et al.* Antidiabetic activity of a polyherbal preparation. *Pharmacologyonline* [S.I.], v. 2, p. 780-787, 2010.

- HASSAN, A. *et al.* Role of antioxidants in gastric mucosal damage induced by indomethacin in rats. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* [S.I.], v. 20, n. 10, p. 849-854, Dec 1998.
- HEEBA, G. H. *et al.* Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Role of nitric oxide and prostaglandins. *European Journal of Pharmacology* [S.I.], v. 607, n. 1-3, p. 188-193, Apr 2009.
- HERMAN, M. A. *et al.* μ -Opioid receptor stimulation in the medial subnucleus of the tractus solitarius inhibits gastric tone and motility by reducing local GABA activity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [S.I.], v. 299, n. 2, p. G494-G506, Aug 2010.
- HERNANDEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ, L. A. G. Incidence of serious upper gastrointestinal bleeding/perforation in the general population: Review of epidemiologic studies. *Journal of Clinical Epidemiology* [S.I.], v. 55, n. 2, p. 157-163, Feb 2002.
- HODEK, P. *et al.* Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* [S.I.], v. 139, n. 1, p. 1-21, Jan 2002.
- HOSHINO, T. *et al.* Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 24-27, Jan 2003.
- ITOKAWA, H. *et al.* Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *Journal of Natural Medicines* [S.I.], v. 62, n. 3, p. 263-280, Jul 2008.
- IWABUCHI, K. A study on the aging of the stomach: Especially from the viewpoint of mural alteration. *Tokyo Jikeikai Medical Journal* [S.I.], v. 123, n. 4, p. 197-210, 2008.
- JAIN, K. S. *et al.* Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 1181-1205, Feb 2007.
- JASMINE, R. *et al.* Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug-resistant bacteria. *Pharmaceutical Biology* [S.I.], v. 48, n. 4, p. 405-410, 2010.
- JOHNSON, L. R. *et al.* *Physiology of the gastrointestinal track*. 4. ed.: Elsevier Inc., 2006.
- JORGE, R. M. *et al.* Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 94, n. 1, p. 93-100, Sep 2004.
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10.ed., Editora GuanabaraKoogan, Rio de Janeiro, 2004. 488p.
- KAHRAMAN, A. *et al.* The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* [S.I.], v. 183, n. 1-3, p. 133-142, Feb 2003.

KANG, T. H. *et al.* Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 71, n. 1-2, p. 321-323, Jul 2000.

KANO, R. *et al.* Effects of tannins and related polyphenols on superoxide-induced histamine release from rat peritoneal mast cells (vol 7, pg 297, 2000). *Phytomedicine* [S.I.], v. 8, n. 1, p. 82-82, Jan 2001.

KARAM, S.; LEBLOND, C. P. Origin and migratory pathways of the 11 epithelial -cell types present in the body of mouse stomach. *Microscopy Research and Technique* [S.I.], v. 31, n. 3, p. 193-214, Jun 1995.

KATO, S. *et al.* Ulcerogenic influence of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the rat stomach with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [S.I.], v. 303, n. 2, p. 503-509, Nov 2002.

KHAZAEINIA, T.; JAMALI, F. Effect of drug release rate on therapeutic outcomes: formulation dependence of gastrointestinal toxicity of diclofenac in the rat. *Inflammopharmacology* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 69-80, 2004.

KLEIN, T. *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KIM, D. S. H. L. *Pharmaceutical formulation e.g. for treating inflammation-associated disorder such as pain, comprises at least two of baicalein, baicalin, beta-glucan, beta-sitosterol, curcuminoid, docosahexaenoic acid, shogaol, and eicosapentaenoic acid.* n. US2009304827-A1, US2009304827-A1 10 Dec 2009 A61K-036/00 201002.

KISHIMOTO, M. *et al.* Characteristics of gastric mucus in elderly patients with gastric ulcers. *Hepato-Gastroenterology* [S.I.], v. 48, n. 42, p. 1594-1598, Nov-Dec 2001.

KOŁODZIEJ, H. *et al.* Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [S.I.], v. 13, n. 23, p. 6470-6476, Dec 2005.

KONTUREK, S. J. *et al.* Role of nitric-oxide and prostaglandins in sucralfate-induced gastroprotection. *European Journal of Pharmacology* [S.I.], v. 211, n. 2, p. 277-279, Feb 1992.

KTAFKE, J. Z. *et al.* Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 299-305, Feb 2010.

LAINE, L. *et al.* Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology* [S.I.], v. 135, n. 1, p. 41-60, Jul 2008.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: An illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* [S.I.], v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LANGHORST, J. *et al.* Amount of systemic steroid medication is a strong predictor for the use of complementary and alternative medicine in patients with inflammatory

bowel disease - Results from a German national survey. *Inflammatory Bowel Diseases* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 287-295, Mar 2005.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease - benefits and dangers. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [S.I.], v. 15, n. 9, p. 1239-1252, Sep 2001.

LEONTIADIS, G. I. *et al.* Systematic reviews of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of proton pump inhibitors in acute upper gastrointestinal bleeding. *Health Technology Assessment* [S.I.], v. 11, n. 51, p. 1-+, Dec 2007.

LE TRAON, G. *et al.* Pharmacokinetics of cimetidine in dogs after oral administration of cimetidine tablets. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [S.I.], v. 32, n. 3, p. 213-218, Jun 2009.

LEWIS, D. A. *et al.* A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisica*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 65, n. 3, p. 283-288, Jun 1999.

LORENZI, H. *Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: (de consumo in natura)*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2006. 670p.

LU, X. Y. *et al.* Relative Contribution of Small and Large Intestine to Deglycosylation and Absorption of Flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 58, n. 19, p. 10661-10667, Oct 2010.

LUCIO, E. M. R. *et al.* Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da episopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 9-10, n. 1, p. 23-35, 2000.

MACHADO, M. *et al.* Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Natural Product Communications* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 137-141, 2010.

MALAIRAJAN, P. *et al.* Anti-ulcer activity of crude alcoholic extract of *Toona ciliata* Roemer (heart wood). *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 110, n. 2, p. 348-351, Mar 2007.

MALFERTHEINER, P. *et al.* Peptic ulcer disease. *Lancet* [S.I.], v. 374, n. 9699, p. 1449-1461, Oct 2009.

MARIDASS, M. Composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Eugenia discifera* (Myrtaceae). *International Journal of Essential Oil Therapeutics* [S.I.], v. 2, n. 4, p. 163-166, 2008.

MARIN, R. *et al.* Volatile components and antioxidant activity from some myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy* [S.I.], v. 27, n. 2, p. 172-177, Mar-Apr 2008.

MARKMAN, B. E. O. *et al.* Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 94, n. 1, p. 55-57, Sep 2004.

MCCARTHY, D. M. Adverse effects of proton pump inhibitor drugs: Clues and conclusions. *Current Opinion in Gastroenterology* [S.I.], v. 26, n. 6, p. 624-631, 2010.

MICHELFELDER, A. J. *et al.* Integrative medicine and gastrointestinal disease. *Primary Care - Clinics in Office Practice* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 255-267, 2010.

MORINI, G. *et al.* Indomethacin-induced morphological changes in the rat gastric mucosa, with or without prior treatment with two proton pump inhibitors. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 615-623, Dec 1995.

MOTA, K. S. D. *et al.* Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* [S.I.], v. 14, n. 3, p. 979-1012, Mar 2009.

MUSUMBA, C. *et al.* Review article: cellular and molecular mechanisms of NSAID-induced peptic ulcers. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [S.I.], v. 30, n. 6, p. 517-531, Sep 2009.

NAGAI, N. *et al.* Involvement of interleukin 18 in indomethacin-induced lesions of the gastric mucosa in adjuvant-induced arthritis rat. *Toxicology* [S.I.], v. 255, n. 3, p. 124-130, Jan 2009.

NÄRHI, U. *et al.* Switching of H₂-receptor antagonists to over-the-counter status in Finland: Implications for consumption and adverse effects. *Clinical Drug Investigation* [S.I.], v. 25, n. 4, p. 243-248, 2005.

NATALE, G. *et al.* Seriate histomorphometry of whole rat stomach: An accurate and reliable method for quantitative analysis of mucosal damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* [S.I.], v. 174, n. 1, p. 17-26, Jul 2001.

NEMETH, K. *et al.* Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition* [S.I.], v. 42, n. 1, p. 29-42, Jan 2003.

NEWTON, J. L. *et al.* The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* [S.I.], v. 46, n. 3, p. 312-320, Mar 2000.

NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences). *Report of the international workshop on in vitro methods for assessing acute systemic toxicity*. NIH Publication 01-4499. NIEHS, Research Triangle Park, North Carolina, 2001.

NOROOZI, M. *et al.* Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition* [S.I.], v. 67, n. 6, p. 1210-1218, Jun 1998.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guideline 401: Acute Oral Toxicity*. Paris: Head of Publications Service, 1981.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19*, 2000.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guideline 420: Acute Oral Toxicity: Fixed Dosing Method*. Paris: Head of Publications Service, 2001a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. Paris: Head of Publications Service, 2001b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Modified Up-and-Down Procedure*. Paris: Head of Publications Service, 2006.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* [S.I.], v. 66, n. 17, p. 2012-2031, Sep 2005.

OSORIO, C. *et al.* Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [S.I.], v. 54, n. 2, p. 509-516, Jan 2006.

PAL, S. K.; SHUKLA, Y. Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 281-288, 2003.

PAVAN, F. R. *et al.* Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). *Quimica Nova* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

PHILLIPSON, M. *et al.* The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [S.I.], v. 295, n. 4, p. G806-G812, Oct 2008.

PINTO, A.C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

POLAT, B. *et al.* Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chemico-Biological Interactions* [S.I.], v. 186, n. 1, p. 82-89, Jun 2010.

POTRICH, F. B. *et al.* Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 130, n. 1, p. 85-92, Jul 2010.

RAO, C. V.; VIJAYAKUMAR, M. Protective effect of (+)-catechin against gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [S.I.], v. 59, n. 8, p. 1103-1107, Aug 2007.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [S.I.], v. 35, n. 5, p. 523-534, May 2002.

ROBERFROID, M. B.; CALDERON, P. B. *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*. 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 1995.

ROBERT, A. *et al.* Mild irritants prevent gastric necrosis through adaptative cytoprotection mediated by. *American Journal of Physiology* [S.I.], v. 245, n. 1, p. G113-G121, 1983.

ROZZA, A. L. *et al.* Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds,

nitric oxide and prostaglandin E2. *Chemico-Biological Interactions* [S.I.], v.189, n.1, p.82-89, 2011.

SAHOO, N. *et al.* Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* [S.I.], v. 81, n. 6, p. 462-471, Sep 2010.

SAIRAM, K. *et al.* Prophylactic and curative effects of *Bacopa monniera* in gastric ulcer models. *Phytomedicine* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 423-430, Nov 2001.

SANTOS-OLIVEIRA, R. *et al.* Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties. *Revisão da Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas* [S.I.], v. 19, n. 2 B, p. 650-659, 2009.

SATO, H. *et al.* The protective effect of catechin on gastric mucosal lesions in rats, and its hormonal mechanisms. *Journal of Gastroenterology* [S.I.], v. 37, n. 2, p. 106-111, Feb 2002.

SAX, M. J. Clinically important adverse effects and drug interactions with H2-receptor antagonists: An update. *Pharmacotherapy* [S.I.], v. 7, n. 7 II, p. 110S-115S, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia* [S.I.], v. 66, n. 4, p. 373-374, 1995.

SCHNITZER, T. J. *et al.* Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: Randomised controlled trial. *Lancet* [S.I.], v. 364, n. 9435, p. 665-674, 2004.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology* [S.I.], v. 134, n. 7, p. 1842-1860, Jun 2008.

SIKIRIC, P. *et al.* New model of cytoprotection adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *European Journal of Pharmacology* [S.I.], v. 364, n. 1, p. 23-31, Jan 1999.

SILVERSTEIN, F. E. *et al.* Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis - The CLASS study: A randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* [S.I.], v. 284, n. 10, p. 1247-1255, Sep 2000.

SILVERSTEIN, F. E.; GEIS, G. S. Misoprostol and gastrointestinal complications in patients taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs for rheumatoid arthritis - Response. *Annals of Internal Medicine* [S.I.], v. 124, n. 10, p. 927-927, May 1996.

SISODIA, S. S.; BHATNAGAR, M. Hepatoprotective activity of *eugenia jambolana* Lam. in carbon tetrachloride treated rats. *Indian Journal of Pharmacology* [S.I.], v. 41, n. 1, p. 23-27, 2009.

SIVRI, B. Trends in peptic ulcer pharmacotherapy. *Fundamental & Clinical Pharmacology* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 23-31, Feb 2004.

SRINIVAS, N. R. Antacid use and reduced bioavailability of oral drugs case studies, overview and perspectives. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* [S.I.], v. 59, n. 7, p. 327-334, 2009.

SUCKOW, M. A. *et al.* *The Laboratory rat*. 2. ed. Londres: Elsevier, 2006.

SULEYMAN, H. *et al.* Comparative study on the gastroprotective potential of some antidepressants in indomethacin-induced ulcer in rats. *Chemico-Biological Interactions* [S.I.], v. 180, n. 2, p. 318-324, Jul 2009.

SULEYMAN, H. *et al.* Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-induced Gastric Ulcers. *Inflammation* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 224-234, Aug 2010.

TAGLIATI, C. A.; FÉRES, C. A. O. Pesquisas toxicológicas e farmacológicas. In: LEITE, J. P. V. (Ed.). *Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu, 2009. Cap.5. p. 119-140.

TAKEUCHI, K. *et al.* Roles of COX-1 and COX-2 inhibition in NSAID-induced gastric damage in rats: Relation to gastric hypermotility response. *Gastroenterology* [S.I.], v. 120, n. 5, p. 3020, Apr 2001.

TANAKA, A. *et al.* Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [S.I.], v. 16, p. 90-101, Apr 2002.

TAYLOR, D. *et al.* Use of antacid medication in patients receiving clozapine: A comparison with other second-generation antipsychotics. *Journal of Clinical Psychopharmacology* [S.I.], v. 30, n. 4, p. 460-461, 2010.

THAMLIKITKUL, V. *et al.* Randomized double blind study of Curcuma domestica Val. for dyspepsia. *Journal of the Medical Association of Thailand* [S.I.], v. 72, n. 11, p. 613-620, 1989.

THOMSON, A. B. R. *et al.* Safety of the long-term use of proton pump inhibitors. *World Journal of Gastroenterology* [S.I.], v. 16, n. 19, p. 2323-2330, 2010.

TOLIA, V.; BOYER, K. Long-term proton pump inhibitor use in children: A retrospective review of safety. *Digestive Diseases and Sciences* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 385-393, 2008.

TOMISATO, W. *et al.* NSAIDs induce both necrosis and apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [S.I.], v. 281, n. 4, p. G1092-G1100, Oct 2001.

TULASSAY, Z.; HERSZENYI, L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* [S.I.], v. 24, n. 2, p. 99-108, Apr 2010.

UGBABE, G. E. *et al.* Preliminary phytochemical, antimicrobial and acute toxicity studies of the stem, bark and the leaves of a cultivated *Syzygium cumini* Linn. (family: Myrtaceae) in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* [S.I.], v. 9, n. 41, p. 6943-6747, 2010.

UMAMAHESWARI, M. *et al.* Antiulcer and in vitro antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 110, n. 3, p. 464-470, Apr 2007.

UMEGAKI, E. *et al.* Protective effect of roxatidine against indomethacin-induced small intestinal mucosal injury in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [S.I.], v. 25, p. S35-S40, May 2010.

UTSUMI, H. *et al.* Noninvasive mapping of reactive oxygen species by in vivo electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [S.I.], v. 317, n. 1, p. 228-235, Apr 2006.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research* [S.I.], v. 47, p. S78-S87, Oct 1998.

VASCONCELOS, P. C. P. *et al.* Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology* [S.I.], v. 131, n. 1, p. 146-153, Aug 2010.

WAGNER, H. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21(st) century: New developments and challenges. *Pure and Applied Chemistry* [S.I.], v. 77, n. 1, p. 1-6, Jan 2005.

WAGNER, H. *et al.* Synergy Research: Natural Products for rational comedication with Chemotherapeutics and Antibiotics. *Phytomedicine* [S.I.], v. 18, n. 1, p. 1-1, Dec 2010.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? *Physiological Reviews* [S.I.], v. 88, n. 4, p. 1547-1565, Oct 2008.

WALLACE, J. L.; FERRAZ, J. G. P. New Pharmacologic Therapies in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* [S.I.], v. 39, n. 3, p. 709-720, 2010.

WANG S, C. N. *et al.* Anti-aging Chinese herbal medicinal mask, useful for e.g. dissipating fatigue, comprises: an effective component containing Chinese herbal extract obtained by decocting e.g. radix *Codonopsis* and tuckahoe and mint oil; and an adjuvant. n. CN101829042-A, CN101829042-A 15 Sep 2010 A61K-008/99 201073.

YELE, S. U.; VEERANJANEYULU, A. Toxicological assessments of aqueous extract of *Eugenia jambolana* stem bark. *Pharmaceutical Biology* [S.I.], v. 48, n. 8, p. 849-854, 2010.

YEOH, K. G. *et al.* Chili protects against aspirin-induced gastroduodenal mucosal injury in humans. *Digestive Diseases and Sciences* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 580-583, Mar 1995.

YEOMANS, N. D. Overview of 50 years' progress in upper gastrointestinal diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [S.I.], v. 24, p. S2-S4, Oct 2009.

YU, E. W. *et al.* Acid-Suppressive Medications and Risk of Bone Loss and Fracture in Older Adults. *Calcified Tissue International* [S.I.], v. 83, n. 4, p. 251-259, Oct 2008.

ZAMORA, Z. *et al.* Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflammation Research* [S.I.], v. 57, n. 1, p. 39-43, Jan 2008.

APÊNDICE A – Ficha de *screening* toxicológico

Ficha de screenig toxicológico

Experimento:	toxicidade aguda	projeto:	Campomanesia	Local:	Lab exp animal FAFAR/UFMG	data:	
Animal:	rato wistar	sexo:	F	via ad:	oral	dose:	
				ID			

	Tempo	0-5min	15min	30min	45min	1h	2h	3h	4h	8h	24h	2ºdia	3ºdia	4ºdia	5ºdia	6ºdia	7ºdia	8ºdia	9ºdia	10ºdia	11ºdia	12ºdia	13ºdia	14ºdia
I	atividade geral																							
	irritabilidade / vocalização																							
	recumbência / posição lateral																							
	grooming																							
	comp. compulsivo/ auto-mutilação																							
	canto de gaiola																							
II	resp aperto cauda																							
	endireitamento																							
	força p/ agarrar																							
	tonus muscular																							
	ataxia																							
III	reflexo corneal																							
	reflexo auricular																							
IV	tremores																							
	convulsão																							
	straub																							
	hipnose																							
V	lacrimejamento																							
	salivação																							
	micção																							
	defecação																							
	piloereção																							
VI	respiração																							
	hipotermia																							
	edema																							
	prurido/ alterações da pele																							
	rigidez abdominal																							
	diarréia																							
	sangramento de orifícios																							
outros																								
morte																								

I - Estado consciente, disposição e comportamento; II - Atividade motora e tônus muscular; III - Reflexos; IV - Sistema Nervoso Central; V - Sistema Nervoso Autônomo; VI - alterações diversas
 Norma "0" - escala de 0 a 4; Normal "4" - escala de 0 a 8

APÊNDICE B - Avaliação das massas dos órgãos (gramas por 200 gramas de animal) após catorze dias da administração de dose única *per os* de CMC 0,5% (controle), EEC e FAEC 2000mg/kg em ratas, no teste de toxicidade aguda.

	Controle	EEC	FAEC
Fígado	8,97 ± 0,15 ^a	8,10 ± 0,09 ^b	8,04 ± 0,39 ^b
Baço	1,04 ± 0,09	0,91 ± 0,02	1,15 ± 0,12
Rins	2,14 ± 0,09	2,13 ± 0,09	2,06 ± 0,11
Coração	0,88 ± 0,02	0,79 ± 0,03	0,77 ± 0,04
Pulmões	1,48 ± 0,06 ^a	1,28 ± 0,03 ^b	1,25 ± 0,05 ^b
Estômago	1,28 ± 0,07	1,38 ± 0,05	1,23 ± 0,05
Cérebro	1,57 ± 0,06	1,61 ± 0,04	1,61 ± 0,04

Nota: Os valores representam média ± erro padrão da média. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo teste de comparações múltiplas *Tukey's* ($p < 0,05$) (n=6 animais por grupo).

APÊNDICE C - Áreas de necrose na mucosa gástrica (μm^2) e porcentagem (%) em relação à área de parede gástrica analisada (mm^2), após administração de EEC e FAEC (100, 200 ou 400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) em ratos com lesões gástricas induzidas por etanol absoluto.

Grupo	Dose (mg/kg)	Área de parede gástrica (mm^2)	Área de necrose (μm^2) $\times 10^5$	Área de necrose normalizada (μm^2) $\times 10^5$	Necrose (%)
Controle	-	91,43 \pm 13,31	45,25 \pm 6,80	22,42 \pm 3,42 ^a	4,95
EEC	100	65,25 \pm 15,46	13,61 \pm 1,33	9,45 \pm 0,971 ^b	2,09
FAEC	100	92,17 \pm 13,11	4,80 \pm 0,32	2,36 \pm 0,47 ^c	0,52
EEC	200	106,7 \pm 15,84	9,96 \pm 2,04	4,23 \pm 1,29 ^c	0,93
FAEC	200	75,05 \pm 6,94	2,00 \pm 0,59	1,21 \pm 0,27 ^c	0,27
EEC	400	81,22 \pm 10,37	2,01 \pm 0,29	1,12 \pm 0,27 ^c	0,25
FAEC	400	84,17 \pm 6,05	0,15 \pm 0,10	0,08 \pm 0,05 ^c	0,02
Sucralfato	200	89,05 \pm 14,25 [§]	1,40 \pm 0,27	0,71 \pm 0,16 ^c	0,16
Cimetidina	50	60,45 \pm 8,09 [§]	15,11 \pm 2,41	11,32 \pm 1,94 ^b	2,50

Nota: Os valores representam média \pm erro padrão da média. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo teste de comparações múltiplas *Newman-Keus* ($p < 0,05$) ($n=6$ animais por grupo). Área de necrose normalizada: $\mu\text{m}^2/45,30\text{mm}^2$ parede gástrica.

APÊNDICE D - Efeitos induzidos pela administração de EEC ou FAEC (100, 200 ou 400 mg/kg), sucralfato (200 mg/kg), cimetidina (50 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) na área de mucosa (μm^2), índice de muco (I.M.) e área de necrose (μm^2) em ratos com lesões gástricas induzidas por etanol absoluto.

Grupo	Dose (mg/kg)	Área de mucosa (μm^2)x10 ³	Área PAS+ (μm^2)x10 ³	I.M.
Intacto	-	475,1 ± 12,9*	57,84 ± 12,04*	0,122 ± 0,025*
Controle	-	385,9 ± 12,7	6,74 ± 2,02	0,018 ± 0,005
EEC	100	414,4 ± 24,0	15,03 ± 1,53	0,036 ± 0,003
FAEC	100	437,1 ± 6,9	14,16 ± 0,22	0,032 ± 0,001
EEC	200	378,4 ± 15,3	19,61 ± 4,25	0,051 ± 0,010
FAEC	200	379,3 ± 11,0	15,53 ± 1,52	0,041 ± 0,004
EEC	400	385,0 ± 14,7	9,30 ± 1,55	0,024 ± 0,003
FAEC	400	405,2 ± 5,5	42,70 ± 1,78*	0,104 ± 0,003*
Sucralfato	200	398,1 ± 19,8	8,76 ± 2,05	0,021 ± 0,004
Cimetidina	50	342,1 ± 11,6	7,38 ± 2,33	0,022 ± 0,007

Nota: Os valores representam média ± erro padrão da média. (n=6 animais por grupo);
 * significativamente diferente do grupo controle - *Newman-Keus* (p<0,05).
 I.M.: área PAS+/área mucosa

APÊNDICE E - Área de necrose na mucosa gástrica (μm^2) e porcentagem (%) em relação à área de parede gástrica analisada (mm^2), após administração *per os* de EEC ou FAEC (400, 800 ou 1200 mg/kg), sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) em ratos com lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg.

Grupo	Dose (mg/kg)	Área de parede gástrica (mm^2)	Área de necrose (μm^2) $\times 10^5$	Área de necrose normalizada (μm^2) $\times 10^5$	Necrose (%)
Controle	-	100,30 \pm 7,57	16,87 \pm 1,27	7,62 \pm 0,72 ^a	1,68
EEC	400	97,86 \pm 13,24	5,18 \pm 0,26	2,40 \pm 0,22 ^c	0,53
FAEC	400	78,78 \pm 6,18	8,31 \pm 1,02	4,78 \pm 0,49 ^b	1,06
EEC	800	95,94 \pm 8,11	1,57 \pm 0,78	0,74 \pm 0,37 ^d	0,16
FAEC	800	98,71 \pm 12,31	2,48 \pm 0,80	1,14 \pm 0,45 ^d	0,25
EEC	1200	95,27 \pm 10,82	1,14 \pm 0,99	0,54 \pm 0,39 ^d	0,12
FAEC	1200	117,2 \pm 13,81	2,01 \pm 0,23	0,78 \pm 0,10 ^d	0,17
Sucralfato	400	110,70 \pm 5,45	2,03 \pm 0,36	0,83 \pm 0,20 ^d	0,18
Cimetidina	100	105,40 \pm 8,18	1,19 \pm 0,17	0,51 \pm 0,59 ^d	0,11

Nota: Os valores representam média \pm erro padrão da média. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente pelo teste de comparações múltiplas *Newman-Keus* ($p < 0,05$) ($n=6$ animais por grupo). Área de necrose normalizada: $\mu\text{m}^2/45,30\text{mm}^2$ parede gástrica.

APÊNDICE F - Efeitos induzidos pela administração de EEC ou FAEC (400, 800 ou 1200 mg/kg), sucralfato (400 mg/kg), cimetidina (100 mg/kg) ou controle (CMC 0,5%) na área de mucosa (μm^2), índice de muco (I.M.) e área de necrose (μm^2) em ratos com lesões gástricas induzidas por indometacina 40 mg/kg.

Grupo	Dose (mg/kg)	Área de mucosa (μm^2)x10 ³	Área PAS+ (μm^2)x10 ³	I.M.
Intacto	-	475,1 ± 12,9	57,84 ± 12,04*	0,122 ± 0,025*
Controle	-	411,6 ± 11,5	13,97 ± 1,01	0,034 ± 0,003
EEC	400	417,1 ± 27,3	17,12 ± 2,75	0,041 ± 0,004
FAEC	400	459,8 ± 22,7	19,86 ± 3,12	0,043 ± 0,006
EEC	800	406,0 ± 33,1	16,40 ± 2,40	0,040 ± 0,004
FAEC	800	400,4 ± 23,5	11,34 ± 3,56	0,028 ± 0,007
EEC	1200	380,1 ± 12,2	9,88 ± 2,28	0,026 ± 0,004
FAEC	1200	432,0 ± 26,5	21,92 ± 2,24	0,051 ± 0,004
Sucralfato	400	379,0 ± 10,3	13,84 ± 1,41	0,036 ± 0,003
Cimetidina	100	373,8 ± 3,7	15,15 ± 1,29	0,041 ± 0,004

Nota: Os valores representam média ± erro padrão da média. (n=6 animais por grupo);
 * significativamente diferente do grupo controle - *Newman-Keus* (p<0,05).
 I.M.: área PAS+/área mucosa

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 52/2010**, relativo ao projeto intitulado "***Campomanesia lineatifolia ruiz e pav.: fitoquímica, atividade antioxidante e antiúlcera gástrica***", que tem como responsável(is) **Rachel Oliveira Castilho**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 05/2010**.

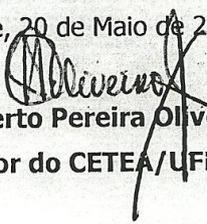
Este certificado expira-se em **12/ 05/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 52/2010**, related to the project entitled "***Campomanesia lineatifolia ruiz e pav.: phytochemistry, antioxidant and antiulcerogenic activity***", under the supervisors of **Rachel Oliveira Castilho**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 12, 2010**.

This certificate expires in **May 12, 2015**.

Belo Horizonte, 20 de Maio de 2010.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br